

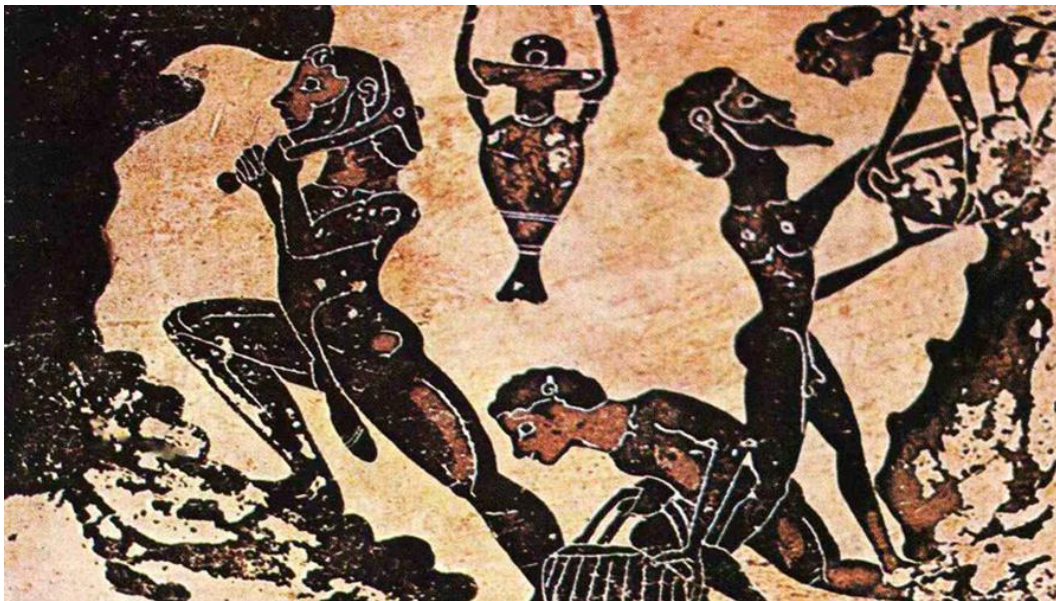


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ &
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΔΑΦΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΚΑΛΥΒΑΣ Σ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ

M.Sc. Γεωπόνος

Επίδραση χηλικοποιητικών και αναγωγικών μέσων στη γεωχημική συμπεριφορά των As, Pb και Zn σε ρυπασμένα εδάφη του Λαυρίου και μελέτη σχημάτων ενισχυμένης φυτοεξαγωγής για την απορρύπανση τους

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: Ιωάννης Μάσσας

ΑΘΗΝΑ 2018

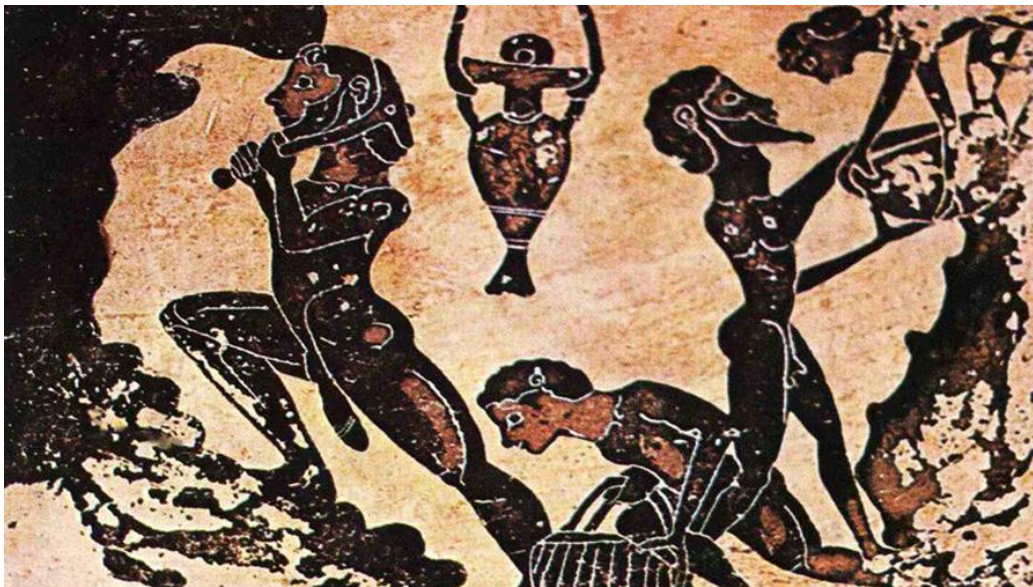


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ &
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΔΑΦΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΚΑΛΥΒΑΣ Σ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ
M.Sc. Γεωπόνος

**Επίδραση χηλικοποιητικών και αναγωγικών μέσων στη γεωχημική
συμπεριφορά των As, Pb και Zn σε ρυπασμένα εδάφη του Λαυρίου
και μελέτη σχημάτων ενισχυμένης φυτοεξαγωγής για την
απορρύπανση τους**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: Ιωάννης Μάσσας

ΑΘΗΝΑ 2018

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ &
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ**

ΚΑΛΥΒΑΣ Σ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ
M.Sc. Γεωπόνος

**Επίδραση χηλικοποιητικών και αναγωγικών μέσων στη
γεωχημική συμπεριφορά των As, Pb και Zn σε ρυπασμένα
εδάφη του Λαυρίου και μελέτη σχημάτων ενισχυμένης
φυτοεξαγωγής για την απορρύπανση τους**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Υποβλήθηκε στο Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων & Γεωργικής
Μηχανικής, Τομέας Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

| | | |
|----------------------------|-------------------------|---------------------------------------------|
| Αναπληρωτής Καθηγητής | Μάσσας Ιωάννης | Επιβλέπων |
| Αναπληρωτής Καθηγητής | Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος | Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής |
| Καθηγήτρια | Παπασιώπη Νυμφοδόρα | Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής |
| Καθηγητής | Μουστάκας Νικόλαος | Μέλος |
| Αναπληρώτρια Καθηγήτρια | Ματσή Θεοδώρα | Μέλος |
| Αναπληρωτής Καθηγητής | Σαϊτάνης Κωνσταντίνος | Μέλος |
| Επίκουρος Καθηγητής | Γασπαράτος Διονύσιος | Μέλος |

ΑΘΗΝΑ 2018

© ΓΕΩΡΓΙΟΣ Σ. ΚΑΛΥΒΑΣ

© Γ.Π.Α.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επίδραση χηλικοποιητικών και αναγωγικών μέσων στη γεωχημική συμπεριφορά των As, Pb και Zn σε ρυπασμένα εδάφη του Λαυρίου και μελέτη σχημάτων ενισχυμένης φυτοεξαγωγής για την απορρύπανση τους

Λέξεις-Κλειδιά: Αρσενικό, Μόλυβδος, Ψευδάργυρος, Κλασμάτωση, Βαρέα μέταλλα, Περιοχές εξόρυξης, Έδαφος, Wenzel, BCR, EDTA, Διθειονώδες νάτριο, Υγρά απόβλητα ελαιουργείων, Ενισχυμένη φυτοεξαγωγή, Pteris Vittata L.

Effect of chelating and reducing agents on the geochemical behavior of As, Pb and Zn in mine polluted soils of Lavrion (Greece) and application of enhanced phytoextraction schemes for their decontamination

Keywords: Arsenic, Lead, Zinc, Sequential extraction, Heavy metals, Mining areas, Soil, Wenzel, BCR, EDTA, Sodium Dithionite, Olive mill wastewaters, Enhanced phytoextraction, Pteris Vittata L.

Επιστημονική Περιοχή: Περιβαλλοντική Εδαφολογία

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2).

στα παιδιά μου Σπύρο και Δημοσθένη,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η οικεία διδακτορική διατριβή αποτελεί το τέλος ενός μεγάλου, επίπονου αλλά και συναρπαστικού ταξιδιού που αποφάσισα να ξεκινήσω πριν κάποια χρόνια παρασυρόμενος από την μεγάλη μου επιθυμία να αυξήσω το επίπεδο των γνώσεων μου στο αντικείμενο της εδαφολογίας και μιας υποβόσκουσας αγάπης για την έρευνα. Στο ταξίδι αυτό, είμαι ευτυχής διότι γνώρισα, μοιράστηκα, δέθηκα με ανθρώπους, αντάλλαξα ιδέες και προβληματισμούς τόσο σε επιστημονικό αλλά και σε διαπροσωπικό επίπεδο.

Πρώτον από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή αυτής της διατριβής κ. Ιωάννη Μάσσα, που με εμπιστεύθηκε και μου έκανε την τιμή να κάνουμε μαζί αυτό το ταξίδι. Όλα αυτά τα χρόνια ο κ. Μάσσας έκλεινε επίμονα τα μάτια του σε όλα μου τα ελαττώματα και εστίαζε μόνο σε ότι καλό μπορεί να με χαρακτηρίζει, διατηρώντας έτσι μια συνεχή θετική ενέργεια η οποία στάθηκε ικανή να με βοηθήσει να ξεπεράσω όλα αυτά τα εμπόδια που εμφανίστηκαν στη πορεία μου που τη δεδομένη στιγμή μου φαινόταν ανυπέρβλητα. Τον θεωρώ μεγάλο μου δάσκαλο στο αντικείμενο της εδαφολογίας, με καθοδήγησε ορθά ώστε να επιτευχθεί η διενέργεια ενός μεγάλου όγκου εργαστηριακών αναλύσεων και πειραματικών, με έμαθε πως να σκέφτομαι και να ψάχνω για λύσεις, με μύησε στη συγγραφή άρθρων καθώς επίσης με οδήγησε και σε ανεξερεύνητα για μένα μονοπάτια όπως εκείνο της στατιστικής. Τον ευχαριστώ για όλες εκείνες τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσε σε μένα, σκληρής δουλειάς, για να βγει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Τέλος, δεν μπορώ να μην αναφέρω ότι ο κ. Μάσσας δεν στάθηκε δίπλα μου μόνο ως καθηγητής αλλά με στήριξε και σε προσωπικό επίπεδο και πραγματικά τον ευχαριστώ γι' αυτό.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επίκουρο καθηγητή και μέλος της επταμελούς επιτροπής κ Διονύση Γασπαράτο που για ακόμα μια φορά έδωσε το παρόν και σε αυτή μου τη προσπάθεια. Ο κ. Γασπαράτος είναι ο άνθρωπος που με στηρίζει ανελλιπώς από τα προπτυχιακά μου χρόνια έως τώρα, αγόγγυστα και με αστείρευτη θέληση και υπομονή, με βοηθά να ξεπεράσω εμπόδια και αδιέξοδα που εμφανίζονται σε αυτή μου τη πορεία, και πραγματικά αποτελεί τιμή για εμένα που τον έχω δάσκαλο και φίλο.

Να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην καθηγήτρια κ. Παπασιώπη Νυμφοδόρα μέλος της τριμελούς επιτροπής, που η στήριξη της σε κομβικό σημείο αυτού του διδακτορικού, μου έδωσε τη δυνατότητα να συνεχίσω την πορεία μου προς την εκπλήρωση των στόχων μου. Θερμές ευχαριστίες να εκφράσω επίσης και στον αναπληρωτή καθηγητή κ. Οιχαλιώτη Κων/νο μέλους της τριμελούς επιτροπής, όπου οι συχνές συζητήσεις μας και η ανταλλαγή απόψεων με βοήθησε τα μέγιστα στη λύση πολλών προβλημάτων. Να ευχαριστήσω τον καθηγητή και διευθυντή του εργαστηρίου Εδαφολογίας & Γεωργικής Χημείας, κ. Μουστάκα Νικόλαο, που μου παρείχε κάθε δυνατή διευκόλυνση τόσο όσον αφορά στις εργαστηριακές υποδομές αλλά και του ευέλικτου ωραρίου εργασίας. Ο κ. Μουστάκας υπήρξε δάσκαλός μου καθ' όλη τη γεωπονική μου πορεία, και δεν αρνήθηκε ποτέ να μου αφιερώσει χρόνο όποτε το χρειαζόμουν. Θερμά ευχαριστώ επίσης τον αν. καθηγητή κ. Σαϊτάνη Κωνσταντίνο και την αν. καθηγήτρια κα. Ματσή Θεοδώρα, μέλη της επταμελούς επιτροπής, που μου έκαναν την τιμή να είναι αξιολογητές της διδακτορικής διατριβής μου.

Στους χώρους του εργαστηρίου εδαφολογίας, συναναστρεφόμουν καθημερινά με πολλούς και καλούς συναδέλφους τους οποίους θα ήθελα να αναφέρω. Τον Δρ. Ορέστη Καΐρη που δεν με άφησε στιγμή να λιποψυχήσω και μου έδινε πάντα

κουράγιο και κάθε δυνατή βοήθεια. Τον παρασκευαστή του εργαστηρίου μας κ. Στέλιο Δάλλα πάντα με το χαμόγελο, πρόθυμος να παράσχει κάθε εργαστηριακή διευκόλυνση. Να ευχαριστήσω τους Δρ. Δάφνη Ιωάννου, υποψ. Διδάκτωρ Στέλιο Γεροντίδη, Δρ. Γιάννη Αναστόπουλο, υποψ. Διδάκτωρ Ρία Παναγιώτου, υποψ. Διδάκτωρ Σταμάτη Καβασίλη, Δρ. Μυρτώ Τσικνιά, Δρ. Νάνα Καββαδία, όλοι τους εξαίρετοι συνάδελφοι. Να ευχαριστήσω επίσης τους προπτυχιακούς φοιτητές Ράνια Εϊσσα, Ελευθερία Καραμούντζου, Χριστίνα Αναστασία Λίζα και Γεράσιμο Τσιτσέλη που πραγματοποίησαν τις πτυχιακές τους μελέτες συμμετέχοντας στα πειραματικά του 3^{ου} και 4^{ου} μέρους αυτού του διδακτορικού.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τα μέλη τις οικογένειάς μου, που όλον αυτό τον καιρό μου συμπαραστάθηκαν, με στήριξαν υλικά και ηθικά σε αυτή τη δύσκολη επιλογή μου και έδειξαν αστείρευτη υπομονή αντιλαμβανόμενοι την μεγάλη προσπάθεια που έπρεπε να καταβάλλω ώστε να υπάρχει ένα επιτυχές αποτέλεσμα.

Abstract

From ancient times until recently, mining and metallurgical activities in the greater Lavrion area, Greece, have resulted in the production of large amounts of metal wastes that enrich the surrounding soils with toxic metal(loid)s. Since the area is inhabited, soil dust inhalation, consumption of vegetables grown on the contaminated soils and of dairy products from small ruminants grazing in the area, may impose a real threat for the health of the local residents.

The main targets of this research were to study the geochemical behavior of As and heavy metals in the surface soils of Lavrio, to assess the effect of chelating and reducing agents on the availability of As, Pb and Zn in a mine affected soil from the Lavrio area and to test the possibility to remediate the Lavrion surface soils by enhanced phytoextraction using the Chinese brake fern *Pteris vittata* L. This study is divided in four sections.

In the first section the chemical partitioning and behavior of Zn, Cu, Ni, Cr, Cd, Pb, and As was investigated in the top soils (0-15cm) of Lavrion. BCR sequential extraction was applied to 29 topsoil samples and four chemical fractions of the studied elements were defined i) exchangeable / acid soluble (F1) ii) reducible (F2) iii) oxidisable (F3) and iv) residual (RF). Total concentrations of all elements were above the geochemical background. Zinc, Pb, Cd, and As median total concentration values were 4, 9, 1.4, and 17 times higher than the respective Dutch intervention thresholds, indicating severe soil pollution. Most of Cd (78.2%), Pb (69.7%), and Zn (53.3%) were found in F1+F2 sum, suggesting high availability under modified conditions that periodically can occur in soils. Copper, Ni, As, and Cr were mainly associated with the residual fraction. Principal component analysis results showed that

F2 fraction of all studied elements was associated to Fe oxides, confirming the crucial role of Fe oxides in metal(loid)s sequestration in the soil matrix.

The aim of the second section was to assess As partitioning in the soils of the Lavrion area, by applying Wenzel and BCR (Community Bureau of Reference) sequential extraction procedures (SEP) to 29 top soils and to correspondingly discuss on the findings. The results of the Wenzel SEP showed that As was mainly bound to the well-crystallized (33.3%) and to the amorphous / poorly-crystalline (30.1%) oxides of Fe, Al, and Mn. According to the BCR scheme, most of the total As (78.4%) was retained in the residual phase. Low mobility factor values (Wenzel: 0.34%; BCR: 1.56%) clearly demonstrate the low availability and mobility of As in the studied soils. The specifically-sorbed / inner-sphere and the reducible fractions of As, obtained by the Wenzel SEP, were positively correlated with clay and Fe oxides content, respectively. The reducible As fractions of both SEPs were negatively correlated with carbonates content indicating that carbonates may partially influence As sorption on Fe oxides. The comparative evaluation of the two SEPs showed that the application of the BCR protocol in contaminated soils cannot provide reliable information on As sequestration in soils but it can be a first estimate of As labile forms.

In the third section, a laboratory incubation experiment was conducted using a top soil (0-15 cm) from the studied area in order to investigate the effect of EDTA, Sodium dithionite, Olive mill wastewater and their combinations, on As, Pb, and Zn mobility and partitioning over time. Soil samples were incubated for 1, 3, 7, 15, 30, 60, and 90 days. At each incubation time the easily mobilizable fraction of the elements was obtained by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (for As) and CH_3COOH (for Pb / Zn). EDTA and all treatments that contained EDTA resulted to significantly higher available

concentrations of the metal(loid)s than the non-EDTA treatments. Sodium dithionite, as reducing agent, did not alter the mobility of the studied elements and when combined with EDTA suppressed the efficacy of EDTA. Olive mill wastewater (OMW) enhanced only As mobility, probably due to competition between As and P added with OMW for sorption sites. To investigate the treatment effect on elements distribution among the soil chemical fractions, two different sequential extraction protocols (SEPs), Wenzel (for As) and BCR (for Pb, Zn, Fe, and Mn) were applied to the soil samples incubated for 90 days. The results of both SEPs strongly indicated that the increased amounts of As, Pb, and Zn in the easily mobilizable / exchangeable fractions obtained for the EDTA treatments were mainly due to the ability of EDTA to complex metal(loid)s bound to amorphous oxides of Fe / Mn.

Finally, in the fourth section, a pot experiment was conducted to evaluate the effect of Na₂-EDTA 0.01 M (E) and olive mill wastewater 15% (OMW) on As, Pb, and Zn uptake by *Pteris vittata* L. grown in a soil from the Lavrio area. A two-factor experimental design was followed; 3 treatments (E, OMW, and E + OMW) × 2 batches (single or double dose). Six weeks after the *P. vittata* transplanting, all pots received the selected dose of each treatment (Batch I). At 8 weeks, in half of the pots, a second dose of the same treatments was added (Batch II). Plants were harvested after 10 weeks and As, Pb, and Zn concentrations were determined in fronds and roots. Depending on the element, both treatment and batch effects were significant. In Batch II, EDTA application resulted in a 55% increase of As and 9- and 4-fold of Pb and Zn concentrations in the fronds, while OMW treatment substantially reinforced plant uptake when combined with EDTA. Roots to fronds translocation of the metal(loid)s highly increased in Batch II. After harvest, composite soil samples of all treatment–batch combinations were subjected to sequential extraction (Wenzel for As

and BCR for Zn / Pb), but no significant alteration of As, Pb, and Zn partitioning in the soil phases was detected.

Περίληψη

Από την αρχαιότητα μέχρι πρόσφατα, οι μεταλλευτικές και μεταλλουργικές δραστηριότητες στην ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου, είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων μεταλλευτικών / μεταλλουργικών αποβλήτων τα οποία εμπλούτισαν σταδιακά τα εδάφη της ευρύτερης περιοχής με τοξικά στοιχεία. Δεδομένου ότι η περιοχή είναι κατοικημένη, η εισπνοή εδαφικού κονιορτού, η κατανάλωση λαχανικών που καλλιεργούνται σε ρυπασμένα εδάφη και γαλακτοκομικών προϊόντων από μηρυκαστικά που βόσκουν στην περιοχή, μπορεί να αποτελέσουν πραγματική απειλή για την υγεία των κατοίκων της περιοχής.

Οι κύριοι στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της γεωχημικής συμπεριφοράς του As και βαρέων μετάλλων σε επιφανειακά εδάφη του Λαυρίου, η εκτίμηση της επίδρασης χηλικοποιητικών και αναγωγικών παραγόντων στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn σε ρυπασμένο έδαφος από εξορυκτικές / μεταλλευτικές δραστηριότητες και η διερεύνηση της δυνατότητας φυτοαπορρόπανσης των επιφανειακών εδαφών του Λαυρίου με τη μέθοδο της ενισχυμένης φυτοεξαγωγής χρησιμοποιώντας το φυτό *Pteris vittata* L. Η μελέτη αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα τέσσερα μέρη.

Στο πρώτο μέρος διερευνήθηκαν οι χημικές μορφές και η γεωχημική συμπεριφορά των Zn, Cu, Ni, Cr, Cd, Pb, και As σε επιφανειακά εδάφη (0-15cm) του Λαυρίου. Η μέθοδος διαδοχικής εκχύλισης BCR εφαρμόστηκε σε 29 δείγματα επιφανειακού εδάφους και προσδιορίστηκαν τέσσερα χημικά κλάσματα των υπό μελέτη στοιχείων i) ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ (F1) ii) αναγωγίμο (F2) iii) οξειδώσιμο (F3) και iv) υπολειμματικό (RF). Οι ολικές συγκεντρώσεις όλων των στοιχείων ήταν πάνω από το γεωχημικό υπόβαθρο. Οι διάμεσες ολικές τιμές των

συγκεντρώσεων των Zn, Pb, Cd και As ήταν 4.9, 1.4 και 17 φορές υψηλότερες από τα αντίστοιχα Ολλανδικά όρια παρέμβασης, υποδηλώνοντας σημαντική ρύπανση του εδάφους. Το μεγαλύτερο μέρος των Cd (78.2%), Pb (69.7%) και Zn (53.3%) βρέθηκαν στα κλάσματα F1 + F2, υποδηλώνοντας υψηλή διαθεσιμότητα των στοιχείων αυτών σε περίπτωση αλλαγής των εδαφικών συνθηκών. Ο Cu, το Ni, το As και το Cr βρέθηκαν να συνδέονται κυρίως με το υπολειμματικό κλάσμα. Τα κυριότερα αποτελέσματα της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA analysis) έδειξαν ότι το κλάσμα F2 όλων των στοιχείων που μελετήθηκαν συνδέεται με τα οξείδια του Fe, επιβεβαιώνοντας τον κρίσιμο ρόλο των οξειδίων του Fe στη συγκράτηση των μετάλλων και των μεταλλοειδών στο έδαφος.

Ο στόχος του δεύτερου μέρους ήταν η μελέτη της γεωχημικής συμπεριφοράς του As σε 29 επιφανειακά εδάφη της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου, με την εφαρμογή των δυο διαφορετικών μεθόδων διαδοχικής εκχύλισης, Wenzel και BCR. Τα αποτελέσματα της μεθόδου κλασμάτωσης Wenzel έδειξαν ότι το As συνδέεται κυρίως με τα κρυσταλλικά (33.3%) και τα άμορφα (30.1%) οξείδια των Fe, Al και Mn. Σύμφωνα με τη μέθοδο BCR, το μεγαλύτερο μέρος της ολικής συγκέντρωσης του As (78.4%) εμφανίστηκε συνδεδεμένο στην υπολειμματική φάση. Οι χαμηλές τιμές του συντελεστή κινητικότητας (Wenzel: 0.34%, BCR: 1.56%) καταδεικνύουν σαφώς τη χαμηλή διαθεσιμότητα και κινητικότητα του As στα υπό μελέτη εδάφη. Το ειδικώς προσροφημένο (σύμπλοκα εσωτερικής στιβάδας) και το αναγώγιμο κλάσμα του As, σύμφωνα με τη μέθοδο Wenzel, συσχετίστηκαν θετικά με την περιεκτικότητα των εδαφών σε άργιλο και με τα οξείδια του Fe αντίστοιχα. Το αναγώγιμο κλάσμα αμφοτέρων των δυο μεθόδων συσχετίστηκε αρνητικά με την περιεκτικότητα σε ισοδύναμο ανθρακικό ασβέστιο, γεγονός που δείχνει ότι τα ανθρακικά μπορούν να επηρεάσουν μερικώς την προσρόφηση του As στα οξείδια του Fe. Η συγκριτική

αξιολόγηση των δύο μεθόδων κλασμάτωσης έδειξε ότι η εφαρμογή του πρωτοκόλλου BCR σε ρυπασμένα εδάφη δεν μπορεί να παράσχει αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με τις χημικές μορφές του As στο έδαφος, αλλά μπορεί να αποτελέσει μια πρώτη εκτίμηση της διαθεσιμότητας του.

Στο τρίτο μέρος της διατριβής αυτής διεξήχθη ένα πείραμα επώσεων χρησιμοποιώντας επιφανειακό έδαφος (0-15 cm) από την υπό μελέτη περιοχή για να διερευνηθεί η επίδραση του EDTA, του διθειονώδους νατρίου, των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων και των συνδυασμών τους στη κινητικότητα και τις χημικές μορφές των As, Pb και Zn με τον χρόνο. Δείγματα εδάφους επώστηκαν για 1, 3, 7, 15, 30, 60 και 90 ημέρες. Σε κάθε χρόνο επώασης το εύκολα κινητοποιήσιμο κλάσμα των στοιχείων εκχυλίστηκε με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (για το As) και με CH_3COOH (για τα Pb / Zn). Το EDTA και όλες οι μεταχειρίσεις που περιείχαν EDTA οδήγησαν σε σημαντικά υψηλότερες διαθέσιμες συγκεντρώσεις των στοιχείων από ότι εκείνες που δεν περιείχαν EDTA. Το διθειονώδες νάτριο, ως αναγωγικό μέσο, δεν επηρέασε την κινητικότητα των στοιχείων που μελετήθηκαν, ενώ όταν συνδυάστηκε με EDTA κατέστειλε την αποτελεσματικότητα του EDTA. Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων (OMW) ενίσχυσαν την κινητικότητα μόνο του As, πιθανώς λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ του As και του P που προστέθηκε με τα OMW για τις θέσεις προσρόφησης. Για τη διερεύνηση της επίδρασης των μεταχειρίσεων στην κατανομή των στοιχείων στα κλάσματα του εδάφους στις 90 ημέρες, εφαρμόστηκαν τα δύο πρωτόκολλα διαδοχικών εκχυλίσεων (SEPs), Wenzel (για το As) και BCR (για τα Pb, Zn, Fe και Mn). Τα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων κλασμάτωσης έδειξαν έντονα ότι οι αυξημένες ποσότητες As, Pb και Zn στα εύκολα κινητοποιήσιμα / ανταλλάξιμα κλάσματα που παρατηρήθηκαν με τις μεταχειρίσεις που περιείχαν EDTA οφειλόταν κυρίως στην ικανότητα του

EDTA να σχηματίζει σύμπλοκα με τα υπό μελέτη στοιχεία τα οποία ήταν συνδεδεμένα κυρίως με τα άμορφα οξείδια του Fe / Mn.

Τέλος, στο τέταρτο μέρος διεξήχθη πείραμα θερμοκηπίου για να αξιολογηθεί η επίδραση του EDTA και των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (15% ΥΑΕ) στη πρόσληψη των As, Pb και Zn από το φυτό *Pteris vittata* L. η οποία καλλιεργήθηκε σε γλάστρες με έδαφος από την περιοχή του Λαυρίου. Ακολούθηθηκε πειραματικός σχεδιασμός με δύο παράγοντες και 8 επαναλήψεις [3 μεταχειρίσεις (E, ΥΑΕ, και E + ΥΑΕ) × 2 σειρές (μονή ή διπλή εφαρμογή των μεταχειρίσεων)]. Έξι εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση των φυτών φτέρης, σε όλες τις γλάστρες προστέθηκε η επιλεγμένη δόση κάθε μεταχείρισης (Δόση I). Στις 8 εβδομάδες, στις μισές από τις γλάστρες, προστέθηκε μια δεύτερη δόση των ίδιων μεταχειρίσεων (Δόση II). Τα φυτά συγκομίσθηκαν 10 εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση και οι συγκεντρώσεις των As, Pb και Zn προσδιορίστηκαν σε φύλλα και ρίζες. Ανάλογα με το στοιχείο, η επίδραση του παράγοντα μεταχείριση και δόσης ήταν σημαντική. Στη Δόση II, η εφαρμογή EDTA είχε ως αποτέλεσμα αύξηση κατά 55% της συγκέντρωσης του As και κατά 9 και 4 φορές των συγκεντρώσεων των Pb και Zn στα φύλλα της φτέρης, ενώ η μεταχείριση με ΥΑΕ ενίσχυσε σημαντικά την πρόσληψη των στοιχείων από τα φυτά όταν συνδυάστηκε με EDTA. Ο συντελεστής ανακατανομής (TF) των στοιχείων από τις ρίζες στα φύλλα της φτέρης αυξήθηκε σημαντικά στη Δόση II. Μετά τη συγκομιδή των φυτών, τα εδαφικά δείγματα από όλους τους συνδυασμούς μεταχείρισης - δόσης υποβλήθηκαν σε διαδοχική εκχύλιση (Wenzel για το As και BCR για τα Pb / Zn), αλλά δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στις χημικές μορφές των As, Pb και Zn στο έδαφος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. | ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 22 |
| 1.1 | Ρύπανση του εδάφους με βαρέα μέταλλα | 22 |
| 1.2 | Περιβαλλοντικές επιπτώσεις από την εξορυκτική / μεταλλευτική δραστηριότητα | 22 |
| 1.3 | Ανάπτυξη μεθόδων διαδοχικών εκχυλίσεων | 23 |
| 1.4 | Φυτοεξυγίανση – Ενισχυμένη φυτοεξαγωγή | 25 |
| 1.5 | Το αρσενικό (As) | 29 |
| 1.6 | Ο Ψευδάργυρος (Zn) | 30 |
| 1.7 | Ο Μόλυβδος (Pb) | 32 |
| 1.8 | Η φτέρη <i>Pteris vittata</i> L. | 34 |
| 2. | ΣΚΟΠΟΣ | 35 |
| 3. | ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ | 37 |
| 3.1 | Ιστορική αναδρομή | 37 |
| 3.2 | Γεωλογία της Λαυρεωτικής | 41 |
| 3.3 | Μεταλλοφορία – Ορυκτολογία - Χημισμός κοιτάσματος Λαυρίου | 45 |
| 3.4 | Κλιματικά στοιχεία – Γεωμορφολογία | 46 |
| 4. | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 48 |
| 4.1 | Δειγματοληψία εδάφους | 48 |
| 4.2 | Μέθοδοι προσδιορισμού των εδαφικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών | 50 |
| 4.3 | Ανάλυση φυτικών ιστών | 51 |
| 4.4 | Πρωτόκολλα διαδοχικών εκχυλίσεων | 52 |
| 4.5 | Συντελεστής Κινητικότητας (<i>Mobility Factor, MF</i>) | 54 |
| 4.6 | Αναλυτικές μέθοδοι | 54 |
| 4.7 | Πειραματικός σχεδιασμός 1 ^{ου} Μέρους | 55 |
| 4.8 | Πειραματικός σχεδιασμός 2 ^{ου} Μέρους | 55 |
| 4.9 | Πειραματικός σχεδιασμός 3 ^{ου} Μέρους | 56 |
| 4.10 | Πειραματικός σχεδιασμός 4 ^{ου} Μέρους | 59 |
| 4.11 | Στατιστική Επεξεργασία | 62 |

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 63 |
| 5.1 | <i>Μέρος 1^ο – Ρύπανση των επιφανειακών εδαφών της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου ως αποτέλεσμα των εξορυκτικών / μεταλλουργικών δραστηριοτήτων</i> | 63 |
| 5.1.1 | <i>Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών</i> | 63 |
| 5.1.2 | <i>Ολικές συγκεντρώσεις των στοιχείων</i> | 64 |
| 5.1.3 | <i>Κλασμάτωση και κινητικότητα των στοιχείων</i> | 66 |
| 5.1.4 | <i>Προέλευση των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd και As στα εδάφη του Λαυρίου</i> | 73 |
| 5.1.5 | <i>Σχέσεις μεταξύ των γεωχημικών μορφών των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, As στα εδάφη και των εδαφικών ιδιοτήτων</i> | 76 |
| 5.2 | <i>Μέρος 2^ο – Κλασμάτωση του As σε ρυπασμένα επιφανειακά εδάφη της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου χρησιμοποιώντας δυο μεθόδους διαδοχικής εκχύλισης Wenzel και BCR</i> | 79 |
| 5.2.1 | <i>Μέθοδοι διαδοχικής εκχύλισης Wenzel και BCR</i> | 79 |
| 5.2.2 | <i>Κλασμάτωση του As με τη μέθοδο Wenzel</i> | 81 |
| 5.2.3 | <i>Κλασμάτωση του As με τη μέθοδο BCR</i> | 87 |
| 5.2.4 | <i>Ανάλυση κατά συστάδες (Cluster analysis)</i> | 91 |
| 5.3 | <i>Μέρος 3^ο – Επίδραση αναγωγικών και χηλικοποιητικών μέσων στην κινητικότητα / διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn σε ρυπασμένο επιφανειακό έδαφος από την ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου</i> | 93 |
| 5.3.1 | <i>Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα των επώασεων</i> | 93 |
| 5.3.2 | <i>Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) των αποτελεσμάτων της επίδρασης του χρόνου επώασης και των μεταχειρίσεων στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn</i> | 94 |
| 5.3.3 | <i>Επίδραση του χρόνου επώασης και των μεταχειρίσεων στην διαθεσιμότητα των As, Pb, και Zn</i> | 95 |
| 5.3.4 | <i>Επίδραση των μεταχειρίσεων στην κλασμάτωση των As, Pb, και Zn</i> | 106 |
| 5.3.5 | <i>Ο ρόλος των οξειδίων του Fe / Mn στην κινητικότητα των As, Pb και Zn</i> | 112 |
| 5.4 | <i>Μέρος 4^ο – Μελέτη σχημάτων ενισχυμένης φυτοεξαγωγής με τη χρήση EDTA, Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργιών και του φυτού Pteris vittata L. για την απορρύπανση ρυπασμένου εδάφους από την ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου</i> | 115 |
| 5.4.1 | <i>Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα θερμοκηπίου</i> | 115 |
| 5.4.2 | <i>Ανάπτυξη της φτέρης P. vittata L.</i> | 115 |

| | | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.4.3 | Συντελεστής ανακατανομής (<i>Translocation Factor, TF</i>) και συγκεντρώσεις των <i>As, Pb</i> και <i>Zn</i> στη φτέρη <i>P. vittata L.</i> | 117 |
| 5.4.4 | Χημικές μορφές των <i>As, Pb</i> και <i>Zn</i> στο έδαφος | 122 |
| 5.4.5 | Επίδραση των μεταχειρίσεων στις συγκεντρώσεις των <i>As, Pb</i> και <i>Zn</i> στο υπέργειο μέρος της <i>P. Vittata L.</i> | 124 |
| 5.4.6 | Απομάκρυνση των <i>As, Pb,</i> και <i>Zn</i> από το έδαφος ανά γλάστρα | 127 |
| 5.4.7 | Επίδραση των μεταχειρίσεων στις χημικές μορφές των <i>As, Pb</i> και <i>Zn</i> στο έδαφος | 130 |
| 6. | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 131 |
| 6.1 | Μέρος 1 ^ο | 131 |
| 6.2 | Μέρος 2 ^ο | 132 |
| 6.3 | Μέρος 3 ^ο | 133 |
| 6.4 | Μέρος 4 ^ο | 134 |
| 7. | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 136 |
| 7.1 | Ξένη Βιβλιογραφία | 136 |
| 7.2 | Ελληνική Βιβλιογραφία | 156 |
| | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ | 157 |
| | Δημοσιευμένα Άρθρα | 158 |
| | ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ | |
| Πίνακας 1 | Μέθοδοι διαδοχικών εκχυλίσεων <i>BCR</i> και <i>Wenzel</i> | 53 |
| Πίνακας 2 | Πειραματικός σχεδιασμός 3 ^ο μέρους | 58 |
| Πίνακας 3 | Πειραματικός σχεδιασμός 4 ^ο μέρους | 61 |
| Πίνακας 4 | Κύριες εδαφικές φυσικοχημικές ιδιότητες | 65 |
| Πίνακας 5 | Ολικές συγκεντρώσεις των <i>Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd,</i> και <i>As</i> σε επιφανειακά εδάφη του Λαυρίου, γεωχημικό υπόβαθρο της περιοχής και Ολλανδικά όρια παρέμβασης | 67 |
| Πίνακας 6 | Περιγραφικά στατιστικά των συγκεντρώσεων των <i>Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd,</i> και <i>As</i> στις τέσσερις εδαφικές χημικές φάσεις σύμφωνα με τη μέθοδο <i>BCR</i> και <i>% Recovery</i> | 68 |

| | | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Πίνακας 7 | Πίνακας συντελεστών συσχέτισης μεταξύ των εδαφικών ιδιοτήτων και των ολικών συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As | 74 |
| Πίνακας 8 | Περιγραφικά στατιστικά των συγκεντρώσεων του As στα εδαφικά κλάσματα σύμφωνα με τη μέθοδο Wenzel | 83 |
| Πίνακας 9 | Πίνακας συντελεστών συσχέτισης μεταξύ των μορφών του As σύμφωνα με τις μεθόδους Wenzel και BCR και των εδαφικών ιδιοτήτων | 86 |
| Πίνακας 10 | Περιγραφικά στατιστικά των συγκεντρώσεων του As στα εδαφικά κλάσματα σύμφωνα με τη μέθοδο BCR | 89 |
| Πίνακας 11 | Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα των επώασεων | 93 |
| Πίνακας 12 | Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA). Επίδραση του χρόνου επώασης και των μεταχειρίσεων στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn | 94 |
| Πίνακας 13 | Πίνακας συντελεστών συσχέτισης των διαθέσιμων κλασμάτων (W1 / B1) των As, Pb, Zn, Fe και Mn για όλες τις μεταχειρίσεις και τους χρόνους επώασης | 113 |
| Πίνακας 14 | Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα θερμοκηπίου | 115 |
| Πίνακας 15 | Συντελεστές ανακατανομής των As, Pb και Zn, στη <i>Pteris vittata</i> L. μεταξύ των διαφορετικών Μεταχειρίσεων για κάθε Δόση | 121 |
| Πίνακας 16 | Απομάκρυνση των As, Pb, και Zn από το έδαφος εκφραζόμενη ως mg ανά γλάστρα | 129 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

| | | |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Σχήμα 1 | Επί της εκατό ποσοστά των μέσων όρων των συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As στα εδαφικά κλάσματα σύμφωνα με τη μέθοδο BCR | 69 |
| Σχήμα 2 | Ιεραρχικό δενδρόγραμμα των ολικών συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As στα επιφανειακά εδάφη του Λαυρίου | 75 |
| Σχήμα 3 | Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA analysis) μεταξύ των συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As στα εδαφικά κλάσματα και των βασικών εδαφικών ιδιοτήτων | 78 |

| | | |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Σχήμα 4 | Ιεραρχικό δενδρόγραμμα (<i>Cluster analysis</i>) των συγκεντρώσεων του <i>As</i> στα διάφορα στάδια κλασμάτωσης σύμφωνα με τις μεθόδους <i>Wenzel</i> και <i>BCR</i> | 92 |
| Σχήμα. 5 | Επίδραση του χρόνου και των μεταχειρίσεων στις διαθέσιμες συγκεντρώσεις των <i>As</i> , <i>Pb</i> , και <i>Zn</i> | 98 |
| Σχήμα 6 | Επίδραση των μεταχειρίσεων επί των διαθέσιμων συγκεντρώσεων των <i>As</i> , <i>Pb</i> και <i>Zn</i> για όλα τα χρονικά διαστήματα επώασης | 99 |
| Σχήμα 7 | Επίδραση των μεταχειρίσεων επί του ποσοστού του <i>As</i> (<i>a</i>) στα κλάσματα (<i>W1</i>) μη ειδικώς προσροφημένο, (<i>W2</i>) ειδικώς προσροφημένο, (<i>W3</i>) άμορφα και ασθενώς κρυσταλλικά οξείδια του <i>Fe</i> και <i>Al</i> , (<i>W4</i>) κρυσταλλικά ένυδρα οξείδια του <i>Fe</i> και <i>Al</i> , (<i>WRF</i>) υπολειμματικό, και επί των ποσοστών των <i>Pb</i> και <i>Zn</i> στα κλάσματα (<i>B1</i>) ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ, (<i>B2</i>) αναγώγιμο, (<i>B3</i>) οξειδώσιμο και (<i>BRF</i>) υπολειμματικό | 108 |
| Σχήμα 8 | Αποτελέσματα της <i>PCA</i> ανάλυσης για τα διαθέσιμα κλάσματα των <i>As</i> , <i>Pb</i> , και <i>Zn</i> (<i>W1 / B1</i>) και του ανταλλάξιμου / διαλυτό σε ασθενές οξύ (<i>B1</i>), αναγώγιμου (<i>B2</i>), οξειδώσιμου (<i>B3</i>) και υπολειμματικού (<i>BRF</i>) κλάσματος των <i>Fe</i> και <i>Mn</i> | 114 |
| Σχήμα 9 | Επίδραση των παραγόντων Μεταχείριση και Δόση στην υπέργεια βιομάζα (ξηρό βάρος) της <i>P. Vittata</i> | 119 |
| Σχήμα 10 | Επίδραση των μεταχειρίσεων στη συγκέντρωση των <i>As</i> , <i>Pb</i> , και <i>Zn</i> στο υπέργειο μέρος της <i>P. Vittata</i> | 120 |
| Σχήμα 11 | Μέσος όρος των ποσοστών και των τιμών των <i>As</i> , <i>Pb</i> , και <i>Zn</i> , στα διάφορα εδαφικά κλάσματα | 123 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | | |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εικόνα 1 | Απλοποιημένος γεωλογικός χάρτης της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου | 44 |
| Εικόνα 2 | Περιοχή μελέτης, σημεία δειγματοληψίας και βασικά γεωμορφολογικά χαρακτηριστικά | 49 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ρύπανση του εδάφους με βαρέα μέταλλα

Η ρύπανση των εδαφών με βαρέα μέταλλα προέρχεται είτε από το μητρικό υλικό είτε από ανθρωπογενείς πηγές όπως αστικά / βιομηχανικά απόβλητα, εξόρυξη / επεξεργασία μεταλλευμάτων, κατάλοιπα της καύσης του άνθρακα, φυτοφάρμακα, λιπάσματα, υλικά ασβέστωσης, ιλύς επεξεργασίας λυμάτων, αέριες αποθέσεις κλπ., που επηρεάζουν τόσο τα αστικά όσο και τα γεωργικά εδάφη. Οι ρύποι που απελευθερώνονται από τις ανθρώπινες δραστηριότητες εισέρχονται στο έδαφος ακολουθώντας συγκεκριμένους βιοχημικούς κύκλους και η «τύχη» τους δεν εξαρτάται μόνο από τις χημικές και φυσικές ιδιότητες του εδάφους (όπως η μηχανική σύσταση, η ποσότητα και το είδος των αργιλοπηριτικών ορυκτών, τα οξειδία / υδροξειδία Fe και Mn, το pH, το ποσοστό της οργανικής ουσίας, το δυναμικό οξειδοαναγωγής κ.λπ.) αλλά και από τα ειδικά χημικά χαρακτηριστικά του κάθε στοιχείου, τις χημικές μορφές με τις οποίες εμφανίζεται και τις ενώσεις που δημιουργεί με άλλα συστατικά του εδάφους (Kabata-Pendias και Pendias 2001; Pérez-López et al. 2008; Massas et al. 2013; Dousis et al. 2013; Gasparatos et al. 2015).

1.2 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις από την εξορυκτική / μεταλλευτική δραστηριότητα

Οι μεγάλες ποσότητες μεταλλευτικών αποβλήτων πλούσιων σε βαρέα μέταλλα και μεταλλοειδή που παράγονται από την εξόρυξη και επεξεργασία των μεταλλευμάτων αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία

σε παγκόσμιο επίπεδο. Μετά την παύση της λειτουργίας ενός ορυχείου οι εναπομείνουσες αποθέσεις των παραπροϊόντων εξόρυξης και επεξεργασίας των μεταλλευμάτων, αντιπροσωπεύουν μια συνεχή πηγή ρύπανσης λόγω της σταδιακής απελευθέρωσης τοξικών στοιχείων στην ατμόσφαιρα και στα χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα. Πιο συγκεκριμένα, η αποσάθρωση των θειούχων και πυριτικών μεταλλευτικών απορριμμάτων οδηγεί στην απελευθέρωση βαρέων μετάλλων και μεταλλοειδών όχι μόνο τοπικά και στα γειτονικά εδάφη αλλά σε μια πιο εκτεταμένη περιοχή ανάλογα με την τοπογραφία, το κλίμα, τα γεωχημικά χαρακτηριστικά, το είδος της επεξεργασίας των μεταλλευμάτων κλπ. (Root et al. 2015). Ως αποτέλεσμα, τα εδάφη αυτά (ανάλογα με το βαθμό που έχουν επηρεαστεί) εκτός από τις υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων τις οποίες περιέχουν, χαρακτηρίζονται και από μεταβολές στη δομή, είναι φτωχά σε θρεπτικά στοιχεία και εμφανίζουν χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία (Martínez-Sánchez et al. 2008; Anju και Banerjee 2010)

1.3 Ανάπτυξη μεθόδων διαδοχικών εκχυλίσεων

Στο παρελθόν, οι περισσότερες μελέτες ρύπανσης των εδαφών με βαρέα μέταλλα επικεντρώνονταν στις ολικές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα. Αν και ο προσδιορισμός των ολικών συγκεντρώσεων δίνει κάποιες πληροφορίες σχετικά με τον πιθανό εμπλουτισμό του εδάφους με βαρέα μέταλλα, είναι πλέον αποδεκτό ότι κυρίως η χημική μορφή ενός μετάλλου καθορίζει την κινητικότητα και τη βιολογική διαθεσιμότητα των βαρέων μετάλλων στα εδάφη. Σε κάθε περίπτωση, οι επιπτώσεις των ιχνοστοιχείων στη ρύπανση του περιβάλλοντος εξαρτώνται από την κινητικότητα

και τη διαθεσιμότητά τους. Οι χημικές μορφές με τις οποίες εμφανίζονται στο έδαφος, καθορίζουν την κινητικότητα και τη χημική συμπεριφορά τους. Επομένως, είναι σημαντική η γνώση των χημικών μορφών των διαφόρων στοιχείων στο έδαφος και ο τρόπος με τον οποίο αυτά προσροφούνται στα συστατικά του εδάφους. (Sahuquillo και Rauret 2003).

Για την εκτίμηση των γεωχημικών μορφών των μετάλλων και μεταλλοειδών στο έδαφος αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα διαδοχικών εκχυλίσεων (Sequential Extraction Procedures, SEPs) (Kim et al. 2014). Παρά τις εγγενείς αδυναμίες αυτών των μεθόδων, όπως η περιορισμένη εκλεκτικότητα των εκχυλιστικών μέσων, η επαναπροσρόφηση των εκχυλιζόμενων στοιχείων σε διαφορετικά κλάσματα του εδάφους, τα φαινόμενα κατακρύμνισης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και η σχετικά χαμηλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, οι μέθοδοι κλασμάτωσης χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση περιβαλλοντικών κινδύνων καθώς επίσης και για τη μελέτη της συμπεριφοράς των μετάλλων και των μεταλλοειδών στα εδάφη (Drahota et al. 2014; Bacon and Davidson 2008).

Στα σχεδόν 40 χρόνια που χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι διαδοχικής εκχύλισης, πολλοί ερευνητές ανέπτυξαν περισσότερο ή λιγότερο σύνθετες διαδικασίες χρησιμοποιώντας μια μεγάλη γκάμα αντιδραστηρίων με διαφορετική ικανότητα εκχύλισης. Προκειμένου να επιτευχθεί εναρμόνιση μεταξύ των διαφόρων πρωτοκόλλων κλασμάτωσης, το Κοινοτικό Γραφείο Αναφοράς (Community Bureau of Reference, BCR), πρότεινε μια τυποποιημένη διαδικασία εκχύλισης τριών σταδίων για την κλασμάτωση βαρέων μετάλλων σε ιζήματα και εδάφη (Ure et al. 1993; Quevauviller et al. 1994; Quevauviller 2002). Ωστόσο, αν και είχε αρχικά δοκιμαστεί για βαρέα μέταλλα, η μέθοδος BCR έχει χρησιμοποιηθεί επίσης από πολλούς

ερευνητές για την κλασμάτωση του αρσενικού σε εδάφη και ιζήματα (Liu and Cai 2007; Larios et al. 2012).

Καθώς όμως οι περισσότερες μέθοδοι κλασμάτωσης βασίζονται στην κατιονική φύση των βαρέων μετάλλων, προέκυψε η αναγκαιότητα να αναπτυχθούν κατάλληλα πρωτόκολλα κλασμάτωσης συμβατά με την ανιονική φύση του αρσενικού στα εδάφη. Δεδομένου ότι το αρσενικό και ο φώσφορος έχουν παρόμοια χημική συμπεριφορά στα εδάφη (και τα δύο σχηματίζουν οξυανιόντα), πολλές μέθοδοι κλασμάτωσης του αρσενικού είναι τροποποιήσεις διαδικασιών διαδοχικής εκχύλισης του φωσφόρου (Gruebel et al. 1988; Van Herreweghe 2003). Ωστόσο, ο P είναι πιο σταθερός από το As σε ένα μεγαλύτερο εύρος τιμών Eh και pH και εμφανίζει μικρότερη συγγένεια με το θείο (S) και τον άνθρακα (C) απ' ότι το As. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις οργανικές μορφές του P, οι οργανικές μορφές του As αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό μέρος της ολικής συγκέντρωσης του As στα εδάφη. Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα κλασμάτωσης ειδικά σχεδιασμένα για το αρσενικό (O'Neill 1995; Hudson-Edwards et al. 2004). Λαμβάνοντας υπόψη τα γεωχημικά χαρακτηριστικά του As, οι Wenzel et al. (2001) τροποποίησαν τις μεθόδους κλασμάτωσης για τον P των Zeien και Brümmer (1991) και των Chang και Jackson (1957) και πρότειναν μια διαδικασία διαδοχικής εκχύλισης πέντε σταδίων για τον προσδιορισμό των χημικών μορφών As στα εδάφη.

1.4 Φυτοεξυγίανση – Ενισχυμένη φυτοεξαγωγή

Διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών με βαρέα μέταλλα και μεταλλοειδή (Gasparatos 2012; Yao et al. 2012). Λόγω του αυξημένου κόστους και του κινδύνου

μη αναστρέψιμων αλλαγών στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους και στη βιοποικιλότητα, οι συμβατικές μέθοδοι αποκατάστασης (π.χ. υαλοποίηση, υγειονομική ταφή, έκπλυση εδαφών, ηλεκτροχημικές μέθοδοι διαχωρισμού κλπ.) δεν μπορούν να εφαρμοστούν για την απορρύπανση μεγάλων εκτάσεων και η μέθοδος της φυτοεξυγίανσης μπορεί να θεωρηθεί ως μια εναλλακτική βιώσιμη τεχνολογία αποκατάστασης, περιβαλλοντικά και οικονομικά αποδοτική (Willscher et al. 2017; Ali et al. 2013).

Η φυτοεξαγωγή είναι μια μέθοδος φυτοεξυγίανσης των εδαφών και βασίζεται στη χρήση φυτών που μπορούν να υπερσυσσωρεύσουν μέταλλα και μεταλλοειδή στην υπέργεια βιομάζα, η οποία στη συνέχεια μπορεί να ανακτηθεί και να απομακρυνθεί (Kidd et al. 2009). Για να χαρακτηριστεί ένα φυτό ως υπερσυσσωρευτής μετάλλων, θα πρέπει να εμφανίζει ορισμένα χαρακτηριστικά όπως καλή προσαρμογή, εύκολη αναπαραγωγή, εκτεταμένο ριζικό σύστημα, υψηλή παραγωγή βιομάζας, ανοχή στις τοξικότητες και μεγάλο συντελεστή μεταφοράς των στοχευμένων στοιχείων από τις ρίζες στο υπέργειο μέρος (Mahar et al. 2016; Evangelou et al. 2007).

Παρ' όλα αυτά, η απορρύπανση εδαφών με την τεχνική της φυτοεξαγωγής είναι μια σχετικά αργή διαδικασία λόγω της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας των μετάλλων στο έδαφος, καθώς αυτά υπάρχουν κυρίως με χημικές μορφές χαμηλής διαλυτότητας και συνεπώς λίγο διαθέσιμες στα φυτά. Προκειμένου να ενισχυθεί η φυτοεξαγωγή, διάφοροι χηλικοποιητικοί και αναγωγικοί παράγοντες έχουν εφαρμοσθεί στο έδαφος προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα των μετάλλων (Sheoran et al. 2011; McGrath et al. 2002).

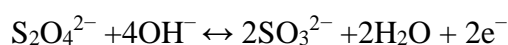
Του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) ως χηλικοποιητικό μέσο, το διθειονώδες νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ως αναγωγικό μέσο και τα υγρά απόβλητα

ελαιουργείων (Olive Mill Wastewaters, OMW) που εμφανίζουν τόσο συμπλοκοποιητικές όσο και αναγωγικές ιδιότητες στα εδάφη, συγκαταλέγονται μεταξύ εκείνων των πρόσθετων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανακατανομή των μετάλλων-ρύπων στα συστατικά της στερεής φάσης του εδάφους με σκοπό την αύξηση της κινητικότητας / βιοδιαθεσιμότητάς τους (Bolan et al. 2014; Jelusic et al. 2014).

Το EDTA είναι ένα αμινοπολυκαρβοξυλικό οξύ με εξαιρετικά υψηλή ικανότητα συμπλοκοποίησης που εκχυλίζει αποτελεσματικά τα τοξικά μέταλλα από τις επιφάνειες των κolloειδών του εδάφους (Manouchehri and Bermond, 2009). Τα σύμπλοκα μετάλλου - EDTA που δημιουργούνται είναι υδατοδιαλυτά και συνεπώς αυξάνουν τη διαθεσιμότητα των μετάλλων προάγοντας την πρόσληψη τους από τα φυτά (Udovic and Lestan 2012; Chen et al. 2007) . Το pH του εδάφους, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, οι χημικές μορφές των μετάλλων, ο ανταγωνισμός μεταξύ των ιόντων και ο τύπος του δεσμού των μετάλλων με τα κλάσματα του εδάφους συγκαταλέγονται μεταξύ των σημαντικότερων παραγόντων που ελέγχουν τη χημική συμπεριφορά και την αποτελεσματικότητα του EDTA ως χηλικοποιητικού παράγοντα στο έδαφος (Bolan et al. 2014; Nowack 2002).

Οι οξειδοαναγωγικές συνθήκες αποτελούν κρίσιμη παράμετρο και επηρεάζουν τη γεωχημική συμπεριφορά των μετάλλων και μεταλλοειδών στο έδαφος (Chuan et al. 1996; Gasparatos 2012). Με τη ρύθμιση των συνθηκών οξειδοαναγωγής, μπορεί να αυξηθεί η διαλυτότητα των μετάλλων στο έδαφος. Πράγματι, οι αναγωγικές εδαφικές συνθήκες προάγουν την αναγωγική διαλυτοποίηση των οξυ-υδροξειδίων του Fe-Mn και οδηγούν στην απελευθέρωση σημαντικών ποσοτήτων προσροφημένων μετάλλων (Gasparatos 2013). Επιπλέον, η επικράτηση αναγωγικών συνθηκών εξασθενεί τη δέσμευση των μετάλλων στη στερεά φάση του

εδάφους μειώνοντας τον βαθμό οξείδωσης τους και αυξάνοντας τη διαλυτότητα τους (Kim et al. 2015; Varadachari et al. 2006; Abumaizar and Smith 1999). Η ικανότητα των διθειονικών αλάτων όπως του διθειονώδους νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) να προάγουν τις αναγωγικές συνθήκες στα εδάφη είναι γνωστή (Kim et al. 2015; Mehra and Jackson 1960; Paul et al. 2003). Τα διθειονώδη ανιόντα ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$) αποτελούν ισχυρό αναγωγικό παράγοντα που παρουσιάζει ένα τυπικό δυναμικό αναγωγής (E°) $-1,12\text{V}$ σε αλκαλικές συνθήκες (Kim et al. 2016). Τα διθειονώδη ανιόντα οξειδώνονται σε θειώδη ανιόντα σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Η Ελλάδα είναι από τους μεγαλύτερους παραγωγούς ελαιολάδου παγκοσμίως (FAOSTAT 2013). Ανάλογα με τη μέθοδο εξαγωγής, η επεξεργασία ελαιολάδου μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων υγρών αποβλήτων (Olive Mill Wastewaters, OMW) που αποτελούνται από τον ελαιώδη ιστό και το νερό επεξεργασίας (Azbar et al. 2004). Αυτό το σκουρόχρωμο υποπροϊόν έχει όξινο $\text{pH} \sim 4-6$, υψηλό οργανικό φορτίο (δηλ. πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες) και λόγο C / N , ενώ περιέχει και μεγάλες ποσότητες τοξικών φαινολικών ενώσεων (Morillo et al. 2009). Η χρήση υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (OMW) ως πρόσθετου εδάφους για σκοπούς αποκατάστασης μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις εδαφικές οξειδοαναγωγικές συνθήκες και να δράσει ως ισχυρός χηλικοποιητικός παράγοντας με αποτέλεσμα την αύξηση της διαθεσιμότητας των μετάλλων (Pardo et al. 2017).

1.5 Το αρσενικό (As)

Το αρσενικό είναι ένα εξαιρετικά τοξικό στοιχείο με πολύπλοκη βιογεωχημική συμπεριφορά και το 20^ο πιο άφθονο ιχνοστοιχείο στο φλοιό της γης. Στα εδάφη, η μέση ολική συγκέντρωση του As είναι περίπου 5 mg kg⁻¹. Υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού έχουν καταγραφεί σε εδάφη που έχουν επιβαρυνθεί από εξορυκτικές και βιομηχανικές δραστηριότητες και σε μικρότερο βαθμό σε αστικά και γεωργικά εδάφη (Hooda 2010). Η ρύπανση του εδάφους με αρσενικό (As) ενέχει σοβαρή απειλή για τη ζωή του ανθρώπου, των φυτών και των ζώων και διαταράσσει τις λειτουργίες του οικοσυστήματος. Η προέλευση του αρσενικού στα εδάφη είναι είτε γεωγενής είτε ανθρωπογενής. Το αρσενικό στο έδαφος προέρχεται από την αποσάθρωση ορυκτών που περιέχουν As (όπως π.χ του αρσενοπυρίτη, του εναργίτη, της κίτρινης σανδαράχης κλπ.), από ηφαιστειακές εκρήξεις και από θερμές πηγές (Farooq et al. 2016). Οι ανθρωπογενείς εισροές αρσενικού στα εδάφη συνδέονται με εργασίες εξόρυξης και τήξης, βιομηχανικές διεργασίες, χρήση ορυκτών καυσίμων, καύση άνθρακα, βιομηχανίες ημιαγωγών, εφαρμογές φυτοφαρμάκων, ζιζανιοκτόνα και φωσφορικά λιπάσματα και τη χρήση παραγόντων συντήρησης ξύλου (Bundschuh et al. 2011; Alonso et al. 2014; Singh et al. 2015; Ngo et al. 2016).

Το αρσενικό ανήκει στην ομάδα 15 στον περιοδικό πίνακα και είναι μεταλλοειδές με ατομικό αριθμό 33 και ατομική μάζα 74,9216 g mol⁻¹. Στη φύση εμφανίζεται σε οργανικές και ανόργανες μορφές και σε διάφορους αριθμούς οξείδωσης όπως η As³⁻ (αρσίνη), As⁰ (αρσενικό), As³⁺ (αρσενικόδες) και As⁵⁺ (αρσενικικό) που είναι και η πιο σταθερή μορφή (Gupta et al. 2011). Στο έδαφος το As υφίσταται ως οξυανιόν και οι κυρίαρχες μορφές του είναι τα αρσενικόδη σε περίπτωση επικράτησης αναγωγικών / αναερόβιων εδαφικών συνθηκών εδάφους (π.χ.

πλημμυρικά φαινόμενα) και αρσενικών όταν κυριαρχούν οξειδωτικές / αερόβιες εδαφικές συνθήκες (π.χ. καλά στραγγιζόμενα εδάφη) (Alloway 2013). Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τους Liu και Cai (2007), η πρόβλεψη της κυρίαρχης μορφής του αρσενικού στα εδάφη δεν μπορεί να βασιστεί μόνο στο δυναμικό οξειδοαναγωγής, δεδομένου ότι οι μεταβολικές διεργασίες ορισμένων μικροοργανισμών ενδέχεται να μεταβάλλουν τις σχετικές συγκεντρώσεις As^{3+} και As^{5+} , ανεξαρτήτως αναγωγικών ή οξειδωτικών συνθηκών. Η τοξικότητα του As εξαρτάται από τη χημική του μορφή. Τα αρσενικά εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση για τις φορτισμένες επιφάνειες των κολλοειδών του εδάφους και κατ' επέκταση χαμηλότερη κινητικότητα από ό, τι τα αρσενικόδη. Συνεπώς, τα αρσενικόδη θεωρούνται ότι είναι 10 φορές πιο διαλυτά, κινητικά, τοξικά και ικανά να «κινούνται» σε μεγαλύτερες αποστάσεις τόσο σε οριζόντια όσο και σε κατακόρυφη κατεύθυνση από τα αρσενικά (Van Herreweghe et al. 2003; Oremland et al. 2009). Εκτός από το δυναμικό οξειδοαναγωγής, η διαλυτότητα του As στα εδάφη εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH, την μηχανική σύσταση του εδάφους, τους τύπους των ανόργανων συστατικών, τα ανταγωνιστικά ιόντα, την περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και τα ίδια τα ορυκτά που περιέχουν As (Adriano 2001).

1.6 Ο Ψευδάργυρος (Zn)

Ο ψευδάργυρος (Zn) είναι το 24ο πιο άφθονο στοιχείο στη γη. Οι τυπικές συγκεντρώσεις του ψευδαργύρου στο έδαφος κυμαίνονται από 10 έως 100 mg Zn kg⁻¹ με μέσο όρο τα 55 mg Zn kg⁻¹ ανάλογα με τη χημική σύνθεση του μητρικού πετρώματος. Οι μεγαλύτερες φυσικές πηγές ψευδαργύρου στο έδαφος θεωρούνται τα

θειούχα ορυκτά του Zn όπως ο σφαλερίτης και ο βουρτζίτης και τα λιγότερο διαδεδομένα ορυκτά όπως ο σμιθσονίτης, ο βιλλεμίτης κ.α. (Alloway 2013).

Οι ανθρώπινες δραστηριότητες έχουν εμπλουτίσει τα επιφανειακά εδάφη με Zn μέσω των ατμοσφαιρικών εναποθέσεων, της εξορυκτικής και μεταλλευτικής δραστηριότητας, της λίπανσης, της εφαρμογής ζωικής κοπριάς και ιλύος βιολογικών καθαρισμών. Η καύση του κάρβουνου και του πετρελαίου, σε συνδυασμό με τα χυτήρια των μη μεταλλικών ορυκτών αποτελούν τις μεγαλύτερες πηγές ρύπανσης της ατμόσφαιρας από Zn. Η έντονη τεχνολογική και βιομηχανική ανάπτυξη έχει οδηγήσει σε μια σταθερή παγκόσμια αύξηση των συγκεντρώσεων του στοιχείου στην ατμόσφαιρα των μεγάλων αστικών κέντρων (Kabata-Pendias and Krakowiak 1995).

Τα εδάφη που περιέχουν λιγότερο από $0.5 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ εκχυλίσιμου με DTPA, είναι δυνητικά ανεπαρκή για τη σωστή ανάπτυξη των φυτών σε Zn. Εδάφη με συγκεντρώσεις ψευδαργύρου σε τοξικά επίπεδα είναι λιγότερο διαδεδομένα από τα ανεπαρκή σε Zn εδάφη. Ο κίνδυνος τοξικότητας του Zn εκδηλώνεται από τις αρνητικές επιδράσεις στα φυτά, τα ασπόνδυλα και τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι τοξικές επιδράσεις εντοπίζονται σε ολικές συγκεντρώσεις Zn από 100 έως $> 1.000 \text{ mg kg}^{-1}$, ενώ η τοξικότητα του μειώνεται με την αύξηση της ΙΑΚ του εδάφους (Hooda 2010).

Γενικά, τα εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα σε άργιλο εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις Zn από τα αμμώδη, λόγω της ύπαρξης μεγαλύτερων ποσοτήτων γεωγενούς Zn και της μεγαλύτερης ικανότητάς τους να προσροφούν και να συγκρατούν τον Zn. Ο ψευδάργυρος στο έδαφος εμφανίζεται με βαθμό οξείδωσης +II. Η συγκέντρωση του Zn στο εδαφικό διάλυμα καθορίζεται από αντιδράσεις καθίζησης-διαλυτοποίησης, προσρόφησης και συμπλοκοποίησης (Kabata-Pendias and Pendias 2001).

Ο ψευδάργυρος στο έδαφος απαντά ως απλό ή σύμπλοκο κατιόν (κυρίως με τα οργανικά κολλοειδή) στο εδαφικό διάλυμα, μη ειδικώς προσροφημένο κατιόν στην εξωτερική επιφάνεια των κολλοειδών του εδάφους (σύμπλοκα εξωτερικής στιβάδας), ειδικώς προσροφημένο κατιόν στο εσωτερικό των κολλοειδών του εδάφους (σύμπλοκα εσωτερικής στιβάδας με τα ανθρακικά άλατα, τα ένυδρα οξείδια του Al, Fe και Mn, την οργανική ύλη και τα ορυκτά της αργίλου), έγκλειστο (occluded) κατιόν και τέλος ως κατιόν στο πλέγμα των πρωτογενών και δευτερογενών ορυκτών (Jacquat et al. 2009; Kabata-Pendias and Pendias 2001).

Η ακινητοποίηση του Zn στο έδαφος είναι σημαντική για τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του. Γενικά, η ακινητοποίηση του ψευδαργύρου αυξάνεται με το pH λόγω του αυξανόμενου αριθμού ενεργών θέσεων προσρόφησης στα οξείδια, ενώ οι συγκεντρώσεις του Zn στο εδαφικό διάλυμα αυξάνουν κατά πέντε φορές ανά μονάδα μείωσης του pH (Buekers et al. 2007).

1.7 Ο Μόλυβδος (Pb)

Ο μόλυβδος (Pb) είναι ένα από τα στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν περισσότερο από τον άνθρωπο με την πάροδο του χρόνου. Αυτό έχει οδηγήσει σε εκτεταμένη ρύπανση των επιφανειακών εδαφών σε περιφερειακή και παγκόσμια κλίμακα, που συνδέεται κυρίως με την ατμοσφαιρική εναπόθεση, τις δραστηριότητες εξόρυξης και τήξης του μετάλλου, την προσθήκη οργανικών ενώσεων του Pb στη βενζίνη που χρησιμοποιούν οι μηχανές εσωτερικής καύσης, την εφαρμογή ιλύος βιολογικών καθαρισμών (Hooda 2010).

Στο βαθμό που είναι γνωστό, ο Pb δεν αποτελεί απαραίτητο ούτε ωφέλιμο στοιχείο για οποιονδήποτε ζωντανό οργανισμό. Στο περιβάλλον, ο Pb και οι ενώσεις

του τείνουν να συσσωρεύονται στα εδάφη και σε ιζήματα, και παραμένει βιοδιαθέσιμος για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η μεταφορά του Pb από το έδαφος στο υπέργειο μέρος των φυτών είναι γενικά μικρή, εκτός από περιπτώσεις εκτεταμένης συγκέντρωσης του Pb στο επιφανειακό έδαφος. Η έντονη ανησυχία σχετικά με τις επιπτώσεις στην υγεία λόγω της ρύπανσης με Pb, τόσο στις αστικές όσο και στις γεωργικές περιοχές, οδήγησαν στην ανάπτυξη ποικίλων τεχνικών αποκατάστασης των ρυπασμένων με Pb εδαφών (Alloway 2013).

Η μέση περιεκτικότητα του Pb σε μη ρυπασμένα εδάφη παγκοσμίως εκτιμάται ότι είναι 17 mg kg^{-1} (Nriagu 1978). Το κατιόν του Pb^{2+} αντικαθιστά το K^+ στο πλέγμα των πυριτικών ορυκτών ή το Ca^{2+} στα ανθρακικά άλατα με ισόμορφη αντικατάσταση. Στα πυριτικά πετρώματα ο Pb έχει την τάση να αυξάνεται αυξανόμενης της περιεκτικότητας σε Si. Ο μόλυβδος έχει επίσης ισχυρή συγγένεια με το S και συνεπώς συγκεντρώνεται σε S-φάσεις στα πετρώματα. Ο μόλυβδος υπάρχει στο έδαφος κυρίως με βαθμό οξείδωσης +II. Σε εδάφη που επικρατούν αναγωγικές συνθήκες, ο Pb εμφανίζεται κυρίως ως αδιάλυτος PbS που κατακρημνίζεται. Υπό οξειδωτικές συνθήκες, υπάρχει ως ιόν Pb^{2+} αλλά γίνεται λιγότερο διαλυτός στο εδαφικό διάλυμα αυξανόμενου του pH λόγω της δημιουργίας συμπλόκων με την οργανική ουσία, προσρόφησης στα οξείδια και στα αργιλοπυριτικά ορυκτά ή καθιζάνει ως ανθρακικό, θειικό ή φωσφορικό άλας. Σε αλκαλικά εδάφη, η διαλυτότητα του Pb μπορεί να αυξηθεί λόγω του σχηματισμού διαλυτών Pb-οργανικών και Pb-υδροξυ-συμπλόκων (McBride 1994).

Η χημική συμπεριφορά του Pb στο έδαφος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα σε οργανική ουσία. Ο μόλυβδος προσροφάται έντονα στις χουμικές ενώσεις σε $\text{pH} \geq 4$ και πάνω (Kerndorff and Schnitzer 1980). Απουσία σημαντικών ποσοτήτων χουμικών ενώσεων, ο Pb προσροφάται έντονα στα

αργιλιοπυριτικά ορυκτά και στα οξείδια του Fe σε σχέση με άλλα βαρέα μέταλλα, όπως Cu, Zn, Cd και Ni. Η προσρόφηση του μόλυβδου πραγματοποιείται κυρίως στο κλάσμα της αργίλου του εδάφους (Echeverria et al. 1998). Οι Hooda και Alloway (1998) διαπίστωσαν ότι η δέσμευση του Pb στο έδαφος συσχετίζεται σημαντικά με το pH, την ΙΑΚ, την περιεκτικότητα σε οργανική ουσία, την περιεκτικότητα σε άργιλο και το ανθρακικό ασβέστιο. Ο μόλυβδος παρουσιάζει την τάση να συγκεντρώνεται στον επιφανειακό ορίζοντα του εδάφους σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα με τα οργανικά κολλοειδή και γι' αυτό φαίνεται να μην μετακινείται σημαντικά μέσα στην εδαφική κατατομή.

1.8 Η φτέρη *Pteris vittata* L.

Η Κινέζικη φτέρη *Pteris vittata* L. είναι ένα ανθεκτικό, ευπροσάρμοστο και ταχείας αναπτύξεως φυτό που είναι γνωστό για την αποτελεσματικότητά του στην υπερσυσσώρευση αρσενικού (Zhang et al. 2017). Οι Ma et al. 2001, διεξήγαγαν για πρώτη φορά ένα πείραμα θερμοκηπίου και διαπίστωσαν ότι η *P. vittata* είχε τη δυνατότητα να συσσωρεύει As στα φύλλα της μέχρι 2.3% και 0.7% επί του ξηρού βάρους, μετά από 6 εβδομάδες καλλιέργειας σε τεχνητά και φυσικά ρυπασμένο έδαφος με αρσενικό, αντίστοιχα. Παρ' όλα αυτά, ανάλογα με τις πηγές ρύπανσης, τον τύπο του εδάφους και τις χρήσεις γης, οι χημικές μορφές του As στο έδαφος (άρα και η διαθεσιμότητα του) διαφέρουν, ενώ οι περιοχές που έχουν ρυπανθεί συνέπεια εξορυκτικής και μεταλλευτικής δραστηριότητας συνήθως εμφανίζονται ρυπασμένα και με άλλα βαρέα μέταλλα. Συνεπώς, είναι πολύ σημαντικό να διερευνηθεί η ανθεκτικότητα ή ακόμα και η ικανότητα της *P. vittata* να συσσωρεύει και άλλα μέταλλα ταυτόχρονα με το As.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Οι κύριοι στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της γεωχημικής συμπεριφοράς του As και βαρέων μετάλλων σε επιφανειακά εδάφη του Λαυρίου, η εκτίμηση της επίδρασης χηλικοποιητικών και αναγωγικών παραγόντων στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn σε ρυπασμένο έδαφος από εξορυκτικές / μεταλλευτικές δραστηριότητες και η διερεύνηση της δυνατότητας φυτοαπορρόπανσης των επιφανειακών εδαφών του Λαυρίου με τη μέθοδο της ενισχυμένης φυτοεξαγωγής χρησιμοποιώντας το φυτό *Pteris vittata* L.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων η διατριβή αποτελείται από τέσσερα διακριτά μέρη:

Οι κύριοι στόχοι του 1^{ου} μέρους της παρούσας διατριβής ήταν i) η καταγραφή των ολικών συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd και As σε επιφανειακά εδάφη του Λαυρίου ii) η εκτίμηση της δυνητικής κινητικότητας / διαθεσιμότητας αυτών των μετάλλων και του As με τη χρήση του πρωτόκολλου κλασμάτωσης BCR iii) η διερεύνηση της κατανομής των στοιχείων αυτών στα υπό μελέτη εδάφη και iv) η μελέτη των σχέσεων των στοιχείων με τις βασικές εδαφικές ιδιότητες χρησιμοποιώντας την ανάλυση κατά συστάδες (Cluster analysis) και την ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis). Τα αποτελέσματα του 1^{ου} μέρους περιλαμβάνονται στη 1^η δημοσιευμένη εργασία του παραρτήματος.

Οι κύριοι στόχοι του 2^{ου} μέρους της παρούσας διατριβής ήταν: i) η κλασμάτωση του As σε επιφανειακά εδάφη της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου με τη χρήση των μεθόδων διαδοχικής εκχύλισης Wenzel και BCR ii) η εκτίμηση της δυνητικής κινητικότητας - διαθεσιμότητας του As στα υπό μελέτη εδάφη iii) η συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων και iv) η διερεύνηση

πιθανών σχέσεων μεταξύ των χημικών μορφών του As και των εδαφικών ιδιοτήτων. Τα αποτελέσματα του 2^{ου} μέρους περιλαμβάνονται στη 2^η δημοσιευμένη εργασία του παραρτήματος.

Οι κύριοι στόχοι του 3^{ου} μέρους της παρούσας διατριβής ήταν: i) η μελέτη της επίδρασης του EDTA, του Διθειονώδους νατρίου (Sodium dithionite, SD), των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (Olive Mill Wastewater, OMW) και του χρόνου επώασης, στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn σε επιφανειακό έδαφος από την ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου ii) η διερεύνηση της πιθανής ανακατανομής των As, Pb και Zn στα κλάσματα του εδάφους ως αποτέλεσμα της εφαρμογής χηλικοποιητικών και αναγωγικών μέσων, χρησιμοποιώντας δυο πρωτόκολλα διαδοχικών εκχυλίσεων (BCR και Wenzel) και iii) η μελέτη του ρόλου των οξυ-υδροξειδίων του Fe / Mn στην διαλυτότητα και την κατανομή των As, Pb και Zn στα εδαφικά κλάσματα. Τα αποτελέσματα του 3^{ου} μέρους περιλαμβάνονται στην 3^η εργασία του παραρτήματος.

Οι κύριοι στόχοι του 4^{ου} μέρους της παρούσας διατριβής ήταν: i) να διερευνηθεί η ικανότητα της φτέρης *P. vittata* να προσλαμβάνει τα As, Pb και Zn από ένα ρυπασμένο από εξορυκτικές / μεταλλευτικές δραστηριότητες έδαφος ii) να αξιολογηθεί η επίδραση του EDTA, των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (OMW) και του συνδυασμού τους στη πρόσληψη των As, Pb και Zn από τη φτέρη *P. vittata* iii) να μελετηθεί η επίδραση της επαναλαμβανόμενης εφαρμογής αυτών των μεταχειρίσεων στην πρόσληψη As, Pb και Zn από το φυτό *P. vittata* και iv) να αξιολογηθεί η επίδραση των EDTA και OMW στην ανακατανομή των As, Pb και Zn στα κλάσματα του εδάφους. Τα αποτελέσματα του 4^{ου} μέρους περιλαμβάνονται στη 4^η δημοσιευμένη εργασία του παραρτήματος.

3. ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ

3.1 Ιστορική αναδρομή

Η Λαυρεωτική κατοικείται από τους προϊστορικούς χρόνους, τη νεολιθική και τη μινωική εποχή. Όπως αναφέρει ο Ξενοφών, ο οποίος θεωρείται ως ο ιστορικός του Λαυρίου «...ουδείς έχει το σθένος να πει πότε άρχισε η εκμετάλλευση των μεταλλείων στο Λαύριο» (Chronopoulos 1980). Η γενικά επικρατούσα άποψη κατά Marinou και Petrascheck (1956) είναι ότι πρώτοι οι Φοίνικες διαπίστωσαν τα μεταλλεύματα του Λαυρίου. Το πιθανότερο είναι ότι η εξόρυξη ξεκίνησε στη θέση Θορικό. Ευρήματα λιθαργύρου (PbO), σε χρονολογημένη στρωματογραφία στη Μακρόνησο, τοποθετούν την παραγωγή αργύρου τουλάχιστον στο 3000 π.Χ. Από τον 8^ο έως τον 6^ο π.Χ. αιώνα που δημιουργήθηκε η πόλη κράτος, άρχισε η εκμετάλλευση των μεταλλείων του Λαυρίου, με βάση τους νόμους που θεσμοθετήθηκαν στην αρχή από το Δράκοντα και στη συνέχεια από τον Σόλωνα.

Αργότερα, επί Πεισιστρατιδών, η ανάπτυξη του Λαυρίου υπήρξε πολύ μεγάλη και αυξήθηκε ο αριθμός των δούλων, που εξόρυσσαν το μέταλλευμα. Πιθανά το 546 π.Χ. ο Πεισίστρατος κόβει τα πρώτα αθηναϊκά νομίσματα, δηλαδή τα αργυρά τετράδραχμα με τη γλαύκα και τη θεά Αθηνά.

Ακολουθεί ο 5^{ος} αιώνας π.Χ. με Κλεισθένη, Θεμιστοκλή και Περικλή και με αύξηση της παραγωγής στο μέγιστο βαθμό. Το 483 π.Χ. γίνεται γνωστό στην Αθήνα ότι ένα καινούριο κοίτασμα είναι πολύ πλούσιο (Κονοφάγος 1980). Πρόκειται για την ανακάλυψη της τρίτης, και βαθύτερης, επαφής σχιστόλιθου-μάρμαρου κοντά στην επιφάνεια, στην περιοχή Μαρώνεια (σημερινή Καμάριζα – Άγιος Κωνσταντίνος). Η παραγωγή του αργύρου αυξάνεται στα 20.000 kg το χρόνο. Μέχρι και 20.000 δούλοι

εργάζονταν εκείνη την περίοδο στο Λαύριο. Τα μνημεία της Ακρόπολης πληρώθηκαν από τον άργυρο του Λαυρίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι τις παραμονές του Πελοποννησιακού πολέμου υπήρχαν στο θησαυροφυλάκιο των Αθηναίων 10.000 τάλαντα. Εννιά χρόνια πριν τη λήξη του Πελοποννησιακού πολέμου, 20.000 δούλοι εξηγείρονται και περνάνε στο πλευρό των Σπαρτιατών, αφού έχουν λάβει υπόσχεση πως θα ελευθερωθούν. Πιθανώς, οι μισοί ή και περισσότεροι εξ αυτών να είναι εργάτες στο Λαύριο. Η παραγωγή αργύρου καταρρέει. Μετά τον πόλεμο το Λαύριο αρχίζει να παρακμάζει. Στα τέλη του 2^{ου} π.Χ. αιώνα τα περισσότερα μεταλλεία έκλεισαν και ελάχιστη εκμετάλλευση έγινε κατά τον 1^ο αιώνα π.Χ.

Από τον 1^ο αι. π. Χ. μέχρι και τον 6^ο αι. μ. Χ. οι εργασίες είναι υποτονικές και περιορίζονται με φθίνουσα πορεία στην επεξεργασία των εκβολάδων, των μεταλλευτικών απορριμμάτων, την ανάτηξη των σκωριών και των μεταλλουργικών κατάλοιπων, ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις γίνεται εξόρυξη μεταλλευμάτων.

Τα υπολείμματα της κατεργασίας των μεταλλευμάτων της Λαυρεωτικής από τους αρχαίους είναι τεράστια: 1,5 εκ. τόνοι σκουριάς και 10 εκ. τόνοι εκβολάδες. Από την κατεργασία αυτών των παραπροϊόντων ξεκινάει η νεότερη περίοδος μεταλλευτικών δραστηριοτήτων στη Λαυρεωτική, στη δεκαετία του 1860, και συνεχίζεται με επέκταση και περαιτέρω εκμετάλλευση των μεταλλείων.

Το Λαύριο αναζωογονήθηκε και πάλι τον 19^ο αιώνα. Το 1860, την περίοδο του νεοσύστατου ελληνικού κράτους, ο υπουργός οικονομικών αναθέτει στον Ανδρέα Κορδέλλα τη μελέτη για τον υπόγειο πλούτο της Ελλάδας. Ο Ανδρέας Κορδέλλας, ήταν ο πρώτος που διέβλεψε την προοπτική της αξιοποίησης των αρχαίων σκουριών και εκβολάδων, οι οποίες ανέρχονταν σε πολλά εκατομμύρια τόνους. Μετά από έρευνες παραδίδει μια οικονομικοτεχνική μελέτη στην οποία τεκμηριώνει ότι είναι

βιώσιμη, η επανεκαμίνευση των αποβλήτων για την παραγωγή μολύβδου και αργύρου.

Μέχρι τότε όλη η περιοχή ήταν αδόμητη εκτός από τη συνοικία «Κυπριανός» που ήταν ψαροχώρι. Το 1864, συγκεκριμένα, ο Ι.Β. Σερπιέρι, ένας ιταλός μεταλλευτής, υπέβαλε αίτηση στο ελληνικό κράτος και ζήτησε παραχώρηση έκτασης 17 περίπου τετραγωνικών χιλιομέτρων, κοντά και γύρω από την Καμάριζα για εκμετάλλευση του ορυκτού πλούτου. Η παραχώρηση δόθηκε στην εταιρία Serpieri-Roux de Fraissine, η οποία άρχισε να εκκαμινεύει τις αρχαίες εκβολάδες και σκωρίες που είχαν εναποτεθεί στο έδαφος, αποκομίζοντας τεράστια κέρδη. Επρόκειτο για μια μεταλλούχο «προίκα», που κληροδότησαν οι αρχαίοι μεταλλευτές στους νεότερους για την παραγωγή μεταλλικού αργυρούχου μολύβδου και των υποπροϊόντων του αργότερα, και σιδηρομαγνησιούχων μεταλλευμάτων, πυρωμένης καλαμίνας και σιδήρου.

Στη συνέχεια το ελληνικό κράτος αμφισβήτησε το δικαίωμα της εταιρείας να εκμεταλλεύεται το έτοιμο προϊόν επειδή δεν το εξόρυσσε, επήλθε ρήξη μεταξύ κράτους και ξένης εταιρείας, γεγονός που προκάλεσε την επέμβαση των ξένων δυνάμεων. Έτσι δημιουργήθηκε το Λαυρεωτικό Ζήτημα που συγκλόνησε την πολιτική ζωή της χώρας και το οποίο λύθηκε με την παραχώρηση του δικαιώματος της εκκαμίνευσης των εκβολάδων και σκωριών στην Τράπεζα Κωνσταντινουπόλεως, την οποία εκπροσωπούσε ο Ανδρέας Συγγρός αντί 11.500.000 χρυσών φράγκων.

Στη συνέχεια και μετά από χρηματιστηριακό σκάνδαλο, ιδρύθηκαν δυο εταιρείες. Το 1873 ιδρύεται η Ελληνική Εταιρεία Μεταλλουργιών Λαυρίου και δύο χρόνια αργότερα, το 1875, ιδρύεται η Γαλλική Εταιρεία Μεταλλείων που εγκαταστάθηκε στον Κυπριανό.

Η γαλλική εταιρεία αξιοποίησε δεόντως τις υπόγειες εκβολάδες καλαμίνας (Σμισθονίτης, $ZnCO_3$) και τα άθικτα κοιτάσματα του ίδιου μεταλλεύματος, που είχαν εγκαταλείψει οι αρχαίοι – επειδή αγνοούσαν τη χρήση του ψευδαργύρου – παράγοντας από το 1876 έως το 1917, 1.094.465 τόνους Zn. Πολλές καινοτόμες διαδικασίες εφαρμόζονται εκείνη την περίοδο στα Μεταλλεία του Λαυρίου σε όλο το φάσμα της τεχνικής δραστηριότητας. Το 1905 ξεκινά μια μεγάλη προσπάθεια τεχνολογικού εκσυγχρονισμού της μεταλλουργίας του μολύβδου, με την εγκατάσταση μονάδας εμπλουτισμού με επίπλευση (Flotation). Έτσι εγκαταλείπονται οι παλαιές φλογοβόλοι κάμινοι που χρησιμοποιούνταν κατά την διαδικασία της φρύξης (η θέρμανση ενός μεταλλεύματος σε υψηλή θερμοκρασία αλλά χαμηλότερη του σημείου τήξης του) και εφαρμόζονται δύο διαφορετικοί μέθοδοι αναλόγως τον τύπο του μεταλλεύματος. Τα συμυκνώματα γαληνίτη με μεγάλη περιεκτικότητα σε σιδηροπυρίτη υφίστανται πλήρη φρύξη με τη μέθοδο Kauffmann, ενώ τα υπόλοιπα με τη μικρότερη περιεκτικότητα σε σιδηροπυρίτη φρύττονται με τη μέθοδο Huntigton - Heberlein. Το 1929 με σκοπό την επεξεργασία των μικτών θειούχων και των θειούχων εκβολάδων εφαρμόζεται η τεχνική της επίπλευσης, ενώ το 1933 τέθηκε σε πλήρη λειτουργία η μέθοδος της απαργύρωσης, δηλαδή το τμήμα παραγωγής καθαρού μολύβδου για την εσωτερική αγορά. Μετά το 1936 λειτουργεί ελασματοποιείο για την παραγωγή φύλλων μολύβδου. Η εξάντληση των κοιτασμάτων καλαμίνας στο Λαύριο θα συμβεί το 1930 και θα οδηγήσει σε διακοπή της λειτουργίας των καμίνων πύρωσής της (Δερμάτης 1994).

Η Ελληνική Εταιρεία εκμεταλλεύεται κυρίως σκωρίες και εκβολάδες (αλλά και μικρά μεταλλεία), κι έτσι σταματάει τη λειτουργία της το 1917, όταν τα αποθέματα τελειώνουν.

Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα σημειώνεται η πρώτη κρίση με την πτώση των τιμών του μολύβδου. Η κατάσταση χειροτερεύει μετά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο και ιδιαίτερα κατά τη δεκαετία του 1920, στα τέλη της οποίας ο πληθυσμός του Λαυρίου μειώνεται στο 50%. Η εγκατάσταση προσφύγων το 1922 ξαναζωντανεύει πάλι τον πληθυσμό. Η ανάπτυξη των βιομηχανικών κλάδων τη δεκαετία του '50 γίνεται αισθητή και στο Λαύριο. Οι συνθήκες αλλάζουν ξανά στη δεκαετία του '80, καθώς πολλές μονάδες αναστέλλουν τη λειτουργία τους. Η γαλλική εταιρεία σταματά να λειτουργεί το 1981. Μια ελληνική εταιρεία που νοικιάζει τις εγκαταστάσεις τις χρησιμοποιεί μόνο ως το 1989. Το 1992 το κτηριακό συγκρότημα των βιομηχανιών της γαλλικής εταιρείας αγοράζεται από το Δημόσιο για να παραχωρηθεί στο Πολυτεχνείο με σκοπό τη δημιουργία ενός χώρου αφιερωμένου στην ανάπτυξη υψηλών, και περιβαλλοντικά φιλικών τεχνολογιών, και ενός τεχνολογικού μουσείου.

3.2 *Γεωλογία της Λαυρεωτικής*

Η περιοχή της Λαυρεωτικής έχει μελετηθεί συστηματικά από γεωλογική, στρωματογραφική, πετρογραφική και κοιτασματολογική άποψη (Marinos and Petrascheck 1956; Skarpelis 2007). Αποτελεί μέρος της Αττικο-Κυκλαδικής ζώνης, η οποία είναι ένα μεταμορφωμένο terrain (γεωλογικές οντότητες ευρύτερης έκτασης, οριοθετημένες από ρήγματα, η καθμία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από τη δική της γεωλογική εξέλιξη και η οποία διαφέρει από αυτή των γειτονικών) που ανήκει στην Αλπική Ορογένεση των Ελληνίδων. Η ανάπτυξη της Αττικο-Κυκλαδικής ενότητας ολοκληρώθηκε στο Ολιγόκαινο – Μειόκαινο ενώ ο μαγματισμός στο Ανώτερο Μειόκαινο. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται ένας απλοποιημένος γεωλογικός χάρτης της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου.

Στη Νότιο-Ανατολική Αττική κυριαρχούν τα μεταμορφωμένα πετρώματα τα οποία εντάσσονται σε δύο τεκτονοστρωματογραφικές ενότητες που χωρίζονται από μια ζώνη αποκόλλησης (Skarpelis 2007). Υπάρχει η ενότητα βάσης η οποία περιλαμβάνει το κατώτερο Μάρμαρο, τους σχιστολίθους Καισαριανής και το ανώτερο μάρμαρο (Marinos and Petrascheck 1956), με πάχος που κυμαίνεται έντονα κατά θέσεις. Η σύσταση των μαρμάρων είναι κυρίως ασβεστιτική αλλά εμφανίζονται και φακοί με Mg-ασβεστίτη, σιδηρίτη, ανκερίτη και διάσπαρτο σιδηροπυρίτη που μετατρέπεται υπεργενετικά σε γκαιτίτη και αιματίτη. Τα μάρμαρα αυτά αναφέρονται ως ανκεριτωμένα. Πάνω από την ενότητα των μαρμάρων υπάρχει η Ενότητα των κυανοσχιστολίθων, η οποία αποτελείται από μεταπηλίτες με ενστρώσεις ανθρακικών και μεταβασικών πετρωμάτων. Τέλος παρατηρούνται ασβεστόλιθοι του Ανώτερου κρητιδικού και νεογενή ιζήματα τα οποία υπέρκεινται τεκτονικώς της υποκείμενης ενότητας των κυανοσχιστολίθων.

Η ζώνη αποκόλλησης ήταν ενεργή κατά την διάρκεια του Ανώτερου Μειοκαίνου και έφερε σε επαφή την ενότητα των κυανοσχιστολίθων με τα ανώτερα μάρμαρα, τα κατώτερα μάρμαρα, τους σχιστολίθους Καισαριανής και τα μεταμορφωμένα πετρώματα της Ανώτερης Ενότητας. Τα υπερκείμενα της ζώνης αποκόλλησης πετρώματα είναι κατακλαστικοί μυλονίτες.

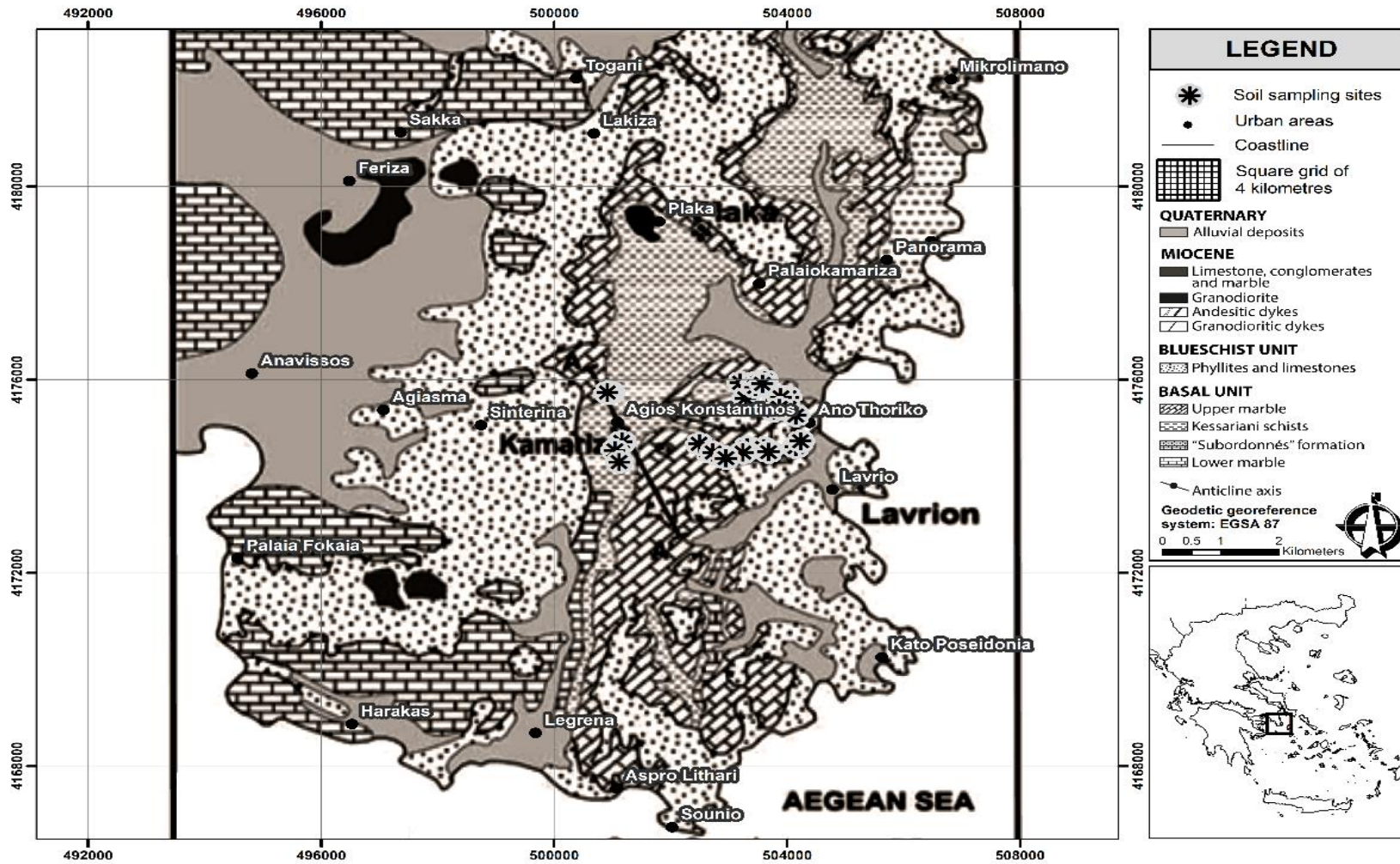
Λόγω του τεκτονισμού, κατά την περίοδο του Μειοκαίνου, εκτός της δημιουργίας ρηγμάτων διευκολύνθηκε η δημιουργία χαλαζιακών-σσηνιτικών και γρανιτικών πορφυρών εμφανιζόμενων υπό μορφή περίπου κατακόρυφων φλεβών, όπως ακριβώς στην Καμάριζα όπου εμφανίζονται τουλάχιστον δέκα φλέβες υποκείμενες σε υπεργενετικές αλλοιώσεις.

Κατά το τέλος της αντίστοιχης περιόδου παρατηρείται διείσδυση μαγματικού σώματος στο υπόβαθρο διαπερνώντας τόσο το κατώτερο μάρμαρο και τους

σχιστολίθους Καισαριανής στους οποίους προκαλεί μεταμόρφωση επαφής όσο και το ανώτερο μάρμαρο χωρίς ωστόσο να φθάσει στην επιφάνεια του ρήγματος αποκόλλησης. Σχηματίζονται έτσι πλουτώνια πετρώματα γρανιτικής κυρίως σύστασης (γρανοδιορίτες) ηλικίας Μειόκαινου όπως προσδιορίστηκε από σειρά ραδιοχρονολογήσεων. Η σημαντικότερη εμφάνιση του πλουτωνίτη αυτού είναι ο γρανοδιορίτης της Πλάκας Λαυρεωτικής με ηλικία 10εκ. έτη γύρω από τον οποίο δημιουργείται μια έντονη μεταμόρφωση επαφής σχηματίζοντας έτσι κερατίτες που περιέχουν πυρόξενο, πλαγιόκλαστα, επίδοτο και γρανάτη. Ο γρανοδιορίτης Πλάκας ανήκει στην κατηγορία των γρανοδιοριτών τύπου διεϊσδυσης (I – type granite). Η παρουσία του συνδέεται με την πλούσια πλουτώνεια και ηφαιστειακή δράση που έλαβε χώρα κατά την περίοδο Ολιγοκαίνου-Μειοκαίνου εντός των εσωτερικών Ελληνίδων και, σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, έχει άμεση σχέση με τη μεταλλογένεση της γνωστής θειούχου μεταλλοφορίας που απαντάται στην ευρύτερη περιοχή της Λαυρεωτικής.

Τέλος σχηματισμοί τύπου Scarn με θειούχα βασικών μετάλλων, Ag και μαγνητίτη, φιλοξενούνται στα ανώτερα μάρμαρα, της Ενότητας Βάσης, στη ζώνη μεταμόρφωσης επαφής.

Εικόνα 1. Απλοποιημένος γεωλογικός χάρτης της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου (Voudouris et al. 2008).



3.3 Μεταλλοφορία – Ορυκτολογία - Χημισμός κοιτάσματος Λαυρίου

Στο υπέδαφος της Λαυρεωτικής εντοπίζονται δύο κυρίως τύποι μεταλλοφορίας: μία μικτών θειούχων μεταλλευμάτων βασικών μετάλλων, όπως μολύβδου (Pb), ψευδαργύρου (Zn), σιδήρου (Fe) και χαλκού (Cu), η οποία έτυχε ιδιαίτερα έντονης εκμετάλλευσης, και μία σιδηρομαγγανιούχων μεταλλευμάτων, η παρουσία της οποίας είναι γενικά περιορισμένη.

Η μεταλλοφορία εντοπίζεται στην ενότητα βάσης (κατώτερο μάρμαρο, σχιστόλιθοι Καισαριανής, ανώτερο μάρμαρο) κάτω από τη ζώνη αποκόλλησης και σε ορισμένες περιπτώσεις κατά μήκος αυτής. Δηλαδή έχουμε εμφάνιση μεταλλοφορίας μέσα στα μάρμαρα ή στις επαφές των μαρμάρων με τους σχιστόλιθους Καισαριανής ή σε ζώνες διάρρηξης μέσα στους σχιστολίθους (Skarpelis 2007).

Η πρωτογενής θειούχος μεταλλοφορία των μικτών θειούχων (PBG), που αποτελεί και τη βασική μεταλλοφορία της περιοχής, χαρακτηρίζεται από την παρουσία γαληνίτη (PbS) πλούσιου σε άργυρο, σφαλερίτη (ZnS) και σιδηροπυρίτη (FeS₂). Πλήθος άλλων θειούχων ορυκτών (π.χ. Cu, As) και θειοαλάτων μετέχουν ως επουσιώδη συστατικά της μεταλλοφορίας. Από τα σύνδρομα ορυκτά επικρατούν ο φθορίτης, ο ασβεστίτης, ο βαρίτης, ο χαλαζίας και ο δολομίτης. Η μεταλλογένεση της θειούχου μεταλλοφορίας, σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, είναι επιγενετική υδροθερμικής προέλευσης, με θερμοκρασία σχηματισμού τους 280°C και ανήκει στην κατηγορία των συμπαγών θειούχων μεταλλευμάτων βασικών μετάλλων (Pb-Zn-Ag) τύπου αντικατάστασης, εντός ανθρακικών σχηματισμών.

Επίσης, σαν αποτέλεσμα έντονων φαινομένων οξείδωσης και στη συνέχεια μετακίνησης των συστατικών της πρωτογενούς μεταλλοφορίας, είχαμε τη δημιουργία, στον ευρύτερο χώρο της Λαυρεωτικής, δευτερογενών ορυκτών σε

μεγάλες συγκεντρώσεις, για παράδειγμα ανθρακικό ψευδάργυρο ή σμισθονίτη ή καλαμίνα ($ZnCO_3$), αργυρούχο ανθρακικό μόλυβδο ή κερουσίτη ($PbCO_3$), που υπέστησαν έντονη εκμετάλλευση. Τέλος, στην περιοχή Πλάκα Κερατέας εντοπίστηκε σημαντικό κοίτασμα σιδηρούχου μεταλλεύματος (μαγνητίτης, μαγνητοπυρίτης) μετασωματικού τύπου (skarn).

Συνολικά έχουν περιγραφεί πάνω από 400 διαφορετικά ορυκτά από τα μεταλλεία Λαυρίου (Κατερινόπουλος και Ζησιμοπούλου 1994).

3.4 Κλιματικά στοιχεία - Γεωμορφολογία

Η πόλη του Λαυρίου βρίσκεται περίπου 60 km από την Αθήνα, Αττική και καλύπτει έκταση περίπου 150 km² (Εικόνα 2). Η ετήσια μέση θερμοκρασία είναι 17.3°C με ελάχιστο τον Ιανουάριο (4.2°C) και μέγιστο τον Ιούλιο (26.6°C). Η μέση ετήσια βροχόπτωση είναι περίπου 360 mm, η υψηλότερη βροχόπτωση σημειώνεται το Δεκέμβριο (85.2 mm) και η χαμηλότερη τον Ιούνιο (4.4 mm). Ενδέχεται να συμβούν έντονες βροχοπτώσεις, ειδικά τον Νοέμβριο και τον Δεκέμβριο. Το κλίμα είναι τυπικά μεσογειακό με ξηρές και ζεστές καλοκαιρινές περιόδους. Η περιοχή είναι λοφώδης έως ημιορεινή και διασχίζεται από μικρά ρέματα. Το υψόμετρο στη περιοχή κυμαίνεται μεταξύ της στάθμης της θάλασσας και των 372 m.

Τρεις βασικοί τύποι αποβλήτων που περιέχουν μέταλλα και μεταλλοειδή (Pb, Zn, As, Cd, Cu, Hg κλπ.) σε υψηλές συγκεντρώσεις εντοπίζονται στο Λαύριο ως αποτέλεσμα της εντατικής εκμετάλλευσης των ορυχείων και των μεταλλουργικών δραστηριοτήτων για πάνω από 3000 χρόνια: α. Στείρα υλικά από τον υδρομηχανικό εμπλουτισμό του μεταλλεύματος (mineral waste - hydromechanical separation) β. Θειούχα υπολείμματα επίπλευσης (pyritic flotation tailings) γ. Σκωρίες από την

εκκαμίνευση του μεταλλεύματος (slags). Η πόλη του Λαυρίου, με σημερινό πληθυσμό άνω των 10500 κατοίκων, αναπτύχθηκε ουσιαστικά πάνω η σε πολύ κοντινή απόσταση από σωρούς παραπροϊόντων της εξορυκτικής και μεταλλουργικής δραστηριότητας. Με την πάροδο του χρόνου, οι χρήσεις γης στην περιοχή έχουν αλλάξει από μεταλλευτική / βιομηχανική σε κατοικημένη, γεωργική ή και για ψυχαγωγία (Kontopoulos et al. 1995).

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

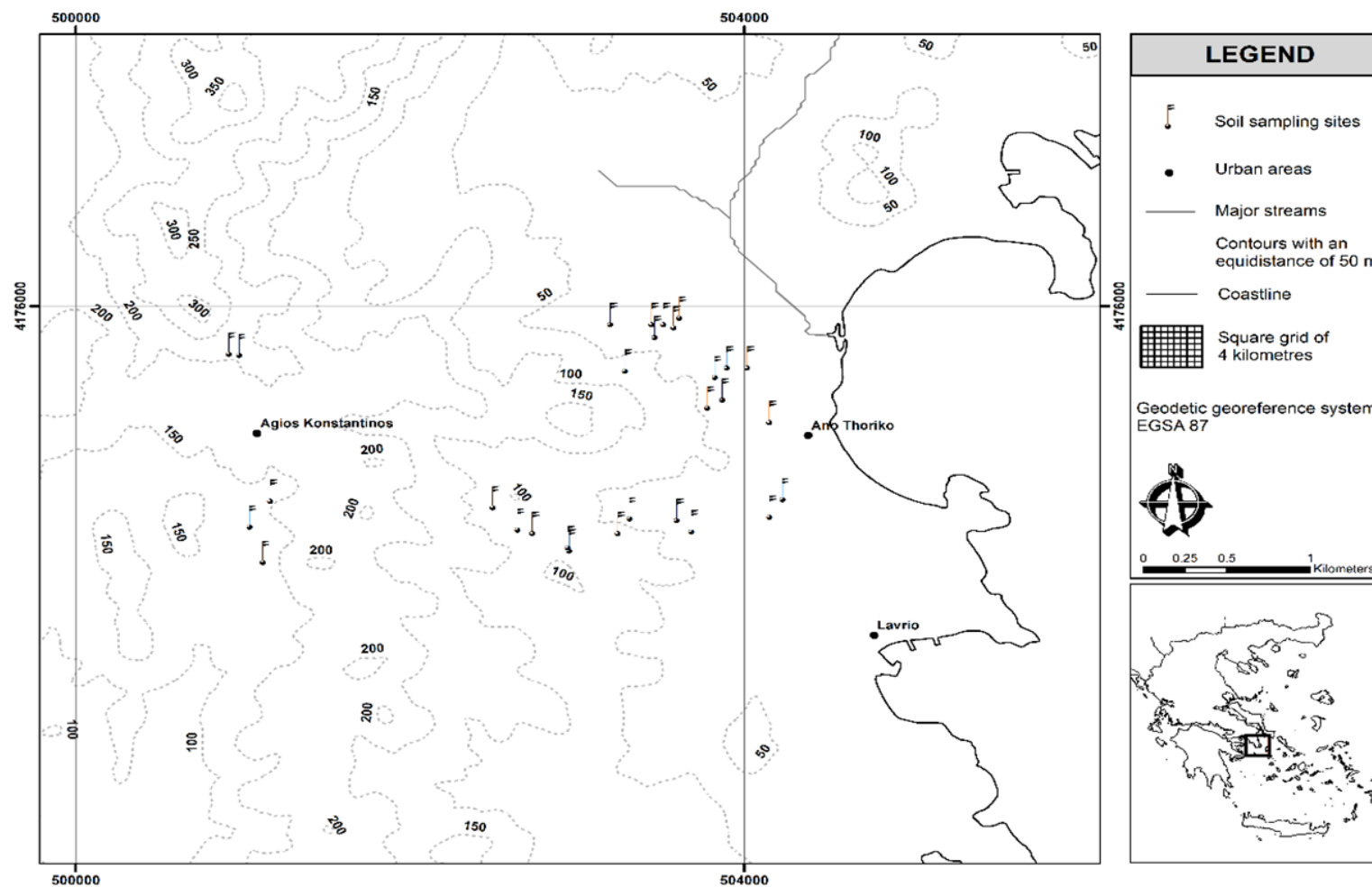
4.1 Δειγματοληψία εδάφους

Λόγω των εξορυκτικών και μεταλλουργικών δραστηριοτήτων, τα εδάφη της περιοχής έχουν εκτεταμένα διαταραχθεί και διαβρωθεί ιδιαίτερα σε περιοχές με μεσαίες και μεγάλες κλίσεις. Ως εκ τούτου, τα υπό μελέτη εδάφη είναι ένα μίγμα υπολειμματικών εδαφών, αλλόχθονων εδαφικών υλικών και λεπτόκοκκων μεταλλουργικών και μεταλλευτικών αποβλήτων (Demetriades et al. 2010).

Για την επιλογή των σημείων δειγματοληψίας, χρησιμοποιήθηκαν χάρτες ρύπανσης των εδαφών της περιοχής του Λαυρίου που δημιουργήθηκαν από τους Demetriades et al. 1996.

Για το 1^ο και 2^ο μέρος της διατριβής, η δειγματοληψία εδάφους πραγματοποιήθηκε σε δύο κύριες περιοχές (Εικόνα 2). Η πρώτη περιοχή είναι γύρω από τις βιομηχανικές εγκαταστάσεις της παλιάς Γαλλικής Μεταλλευτικής Εταιρείας (σήμερα Τεχνολογικό - Πολιτιστικό Πάρκο Λαυρίου). Η μεταλλουργική επεξεργασία των μεταλλευτικών αποθέσεων μολύβδου - αργύρου στις εγκαταστάσεις αυτές είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων τοξικών και επικίνδυνων μεταλλουργικών αποβλήτων. Τα απόβλητα αυτά εναποτέθηκαν χωρίς ιδιαίτερες προφυλάξεις εντός και γύρω από την πόλη του Λαυρίου, σχηματίζοντας τεράστιους σωρούς (Kontopoulos et al. 1995; Xenidis et al. 2003). Η δεύτερη περιοχή δειγματοληψίας είναι η ευρύτερη περιοχή του Αγίου Κωνσταντίνου, όπου εκτελούνταν οι κύριες εξορυκτικές / μεταλλευτικές δραστηριότητες. Η περιοχή χαρακτηρίζεται από τον μεγάλο αριθμό φρεατίων, θέσεων σύνθλιψης και πλυντηρίων των εξορυχθέντων μεταλλευμάτων.

Εικόνα 2. Περιοχή μελέτης, σημεία δειγματοληψίας και βασικά γεωμορφολογικά χαρακτηριστικά.



Για τη λήψη εδαφικών δειγμάτων με μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων και αρσενικού, επηλέγησαν είκοσι εννέα θέσεις δειγματοληψίας και σύνθετα επιφανειακά δείγματα (0-15 cm) συλλέχθηκαν από ανοικτά χέρσα τμήματα, δασικές εκτάσεις και γεωργική γη. Οι θέσεις δειγματοληψίας βρίσκονται σχετικά κοντά σε κατοικημένες περιοχές και σε περιοχές με αυξημένο ρυπαντικό φορτίο (hot spots). Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας, συλλέχθηκαν τρία υπο-δείγματα από μια επιφάνεια 100 x 100 cm τα οποία εν συνεχεία αναμίχθηκαν επιμελώς για να παραχθεί ένα σύνθετο δείγμα.

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε για τη πραγματοποίηση του πειράματος επώασεων στο 3^ο μέρος της διατριβής συλλέχθηκε από την περιοχή Θορικός στα προάστια της πόλης του Λαυρίου με γεωγραφικές συντεταγμένες X: 503825.35, Y: 4175571.92 / EGSA87. Συγκεκριμένα, τρία (3) επιφανειακά εδαφικά δείγματα (0-15 cm) ανακτήθηκαν από μια επιφάνεια 2 m² τα οποία εν συνεχεία αναμίχθηκαν επιμελώς για να παραχθεί ένα σύνθετο δείγμα.

Για τη συλλογή της ποσότητας του επιφανειακού εδάφους που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα θερμοκηπίου στο 4^ο μέρος της διατριβής, ανασκάφηκε περιοχή 10 x 10 m και σε βάθος 15 cm από την περιοχή Θορικός στα προάστια της πόλης του Λαυρίου, και με γεωγραφικές συντεταγμένες X: 503825.35, Y: 4175571.92 / EGSA87.

4.2 *Μέθοδοι προσδιορισμού των εδαφικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών*

Τα δείγματα εδάφους αεροξηράνθηκαν και πέρασαν από κόσκινο των 2 mm για περαιτέρω ανάλυση. Τα δείγματα εδάφους που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαδοχικές εκχυλίσεις πέρασαν από κόσκινο 0.5 mm. Το pH του εδάφους μετρήθηκε

σε εναιώρημα 1: 1 (w / v) έδαφος / νερό. Το ισοδύναμο ανθρακικό ασβέστιο προσδιορίστηκε με ογκομέτρηση του παραγόμενου CO₂ μετά την προσθήκη HCl (NF ISO 10693, 1995), ενώ το ενεργό ανθρακικό ασβέστιο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του οξαλικού αμμωνίου (Loeppert and Suarez 1996). Η κοκκομετρική σύσταση του εδάφους προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Βουγιούκου (Bouyoucos 1951), η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Walkley-Black (Nelson and Sommers 1982) και η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (CEC) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του οξικού αμμωνίου (Rhoades 1982). Ο διαθέσιμος φώσφορος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Olsen (Olsen et al. 1954). Η ολική περιεκτικότητα σε ελεύθερα οξείδια Fe προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου του κιτρικού νατρίου - διττανθρακικού - διθειονώδους (CBD) (Mehra & Jackson, 1960). Για τον προσδιορισμό των άμορφων οξειδίων του σιδήρου χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξαλικού αμμωνίου (Schwertmann and Taylor 1989). Ο προσδιορισμός των ολικών συγκεντρώσεων των υπό εξέταση στοιχείων πραγματοποιήθηκε με πέψη με βασιλικό νερό (Aqua regia). Η πέψη με Aqua regia παρείχε τις «ψευδο-ολικές» συγκεντρώσεις των στοιχείων (δεν διαλυτοποιεί πλήρως το κρυσταλλικό πλέγμα των ορυκτών) (Gasparatos and Haidouti 2001) που για λόγους απλούστευσης θα αναφέρονται στο εξής ως ολικές.

4.3 *Ανάλυση φυτικών ιστών*

Οι συγκεντρώσεις των στοιχείων στους φυτικούς ιστούς (φύλλα, βλαστοί και ρίζες) προσδιορίστηκαν με υγρή καύση χρησιμοποιώντας νιτρικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι φυτικοί ιστοί ξεπλύθηκαν επισταμένως με απιονισμένο νερό ώστε να απορριφθούν τυχόν ακαθαρσίες και τοποθετήθηκαν για δύο ημέρες σε φούρνο

στους 60°C για ξήρανση. Σε 0.5 g κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού (<0.02 mm), προστέθηκαν 5 ml 65% HNO₃ σε κωνικές φιάλες καλυμμένες με υάλους ωρολογίου και αφέθηκαν για 12 h. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε θέρμανση των φυτικών δειγμάτων σε θερμαντική πλάκα για 1 ώρα στους 125 °C. Τα δείγματα εν συνεχεία αφέθηκαν να ψυχθούν και προστέθηκαν 2 ml 30% H₂O₂ και επανατοποθετήσαν στη θερμαντική πλάκα στους 80 °C έως ότου το παραχθέν δ/μα να μειωθεί στα 2-3 ml. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου το τελικό προϊόν της καύσης γίνει άχρωμο ή λευκό. Τα προϊόντα της καύσης διηθήθηκαν και αραιώθηκαν σε όγκο των 25 mL για ανάλυση (Jones and Case 1990).

Ο συντελεστής ανακατανομής (Translocation Factor, TF) των υπό μελέτη στοιχείων υπολογίστηκε ως ο λόγος της συγκέντρωσης των στοιχείων στο υπέργειο μέρος των φυτών φτέρης προς συγκέντρωση των στοιχείων στις ρίζες (Ma et al. 2018).

$$TF = \frac{\text{Συγκέντρωση στοιχείου στα φύλλα (mg kg}^{-1}\text{)}}{\text{Συγκέντρωση στοιχείου στις ρίζες (mg kg}^{-1}\text{)}}$$

4.4 Πρωτόκολλα διαδοχικών εκχυλίσεων

Για τον προσδιορισμό των γεωχημικών μορφών των υπό μελέτη στοιχείων χρησιμοποιήθηκαν δυο μέθοδοι διαδοχικών εκχυλίσεων: α. Η μέθοδος Wenzel (Wenzel et al. 2001) και β. η βελτιωμένη έκδοση της μεθόδου BCR (Community Bureau of Reference, Rauret et al. 1999). Τα στάδια και τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνουν οι δυο μέθοδοι περιγράφονται στον Πίνακα 1.

Για να ελεγχθεί το ποσοστό ανάκτησης (Recovery %) των υπό μελέτη στοιχείων στις δύο μεθόδους, το άθροισμα των συγκεντρώσεων των στοιχείων σε

κάθε κλάσμα εκφράστηκε ως ποσοστό επί της ολικής συγκέντρωσης (Total) του κάθε στοιχείου που λαμβάνεται σε ένα στάδιο με υγρή καύση (Aqua regia), και υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Recovery \%} = [(W1+W2+W3+W4+WRF) / \text{Total}] \times 100 \quad \text{Μέθοδος Wenzel}$$

$$\text{Recovery \%} = [(B1+B2+B3+BRF) / \text{Total}] \times 100 \quad \text{Μέθοδος BCR}$$

Πίνακας 1. Μέθοδοι διαδοχικών εκχυλίσεων BCR και Wenzel.

| Στάδιο | Κλάσμα | Εκχυλιστικό μέσο | Συνθήκες εκχύλισης | Όγκος εκχυλιστικού για 1g εδάφους |
|---------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| BCR^a | | | | |
| B1 | Ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ | Acetic acid 0.11 mol l ⁻¹ | 16h ανάδευση στους 22±5°C | 40ml |
| B2 | Αναγώγιμο (οξειδία Fe/Mn) | Hydroxylammonium chloride 0.5 mol l ⁻¹ | 16h ανάδευση στους 22±5°C | 40ml |
| B3 | Οξειδώσιμο (οργανική ουσία) | Hydrogen peroxide 8.8 mol l ⁻¹ Ammonium acetate 1.0 mol l ⁻¹ , pH=2±0.1 | 1h ανάδευση στους 85±2°C 16h ανάδευση στους 22±5°C | 10+10ml 50ml |
| BRF ^b | Υπολειμματικό | Aqua regia (HCl/HNO ₃) | 16h πέψη | 25ml |
| WENZEL^c | | | | |
| W1 | Μη ειδικώς προσροφημένα (σύμπλοκα εξωτερικής στιβάδας) | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 mol L ⁻¹ | 4h ανάδευση στους 20°C | 25ml |
| W2 | Ειδικώς προσροφημένα (σύμπλοκα εσωτερικής στιβάδας) | NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.05 mol L ⁻¹ | 16h ανάδευση στους 20°C | 25ml |
| W3 | Άμορφα οξείδια Fe / Mn/ Al | NH ₄ ⁺ - oxalate buffer 0.2 mol L ⁻¹ , pH=3.25 | 4h ανάδευση σε σκοτάδι στους 20°C | 25ml |
| W4 | Κρυσταλλικά οξείδια Fe / Mn /Al | NH ₄ ⁺ -oxalate buffer 0.2 mol L ⁻¹ + ascorbic acid 0.1 mol L ⁻¹ , pH=3.25 | 30min ανάδευση στους 96°C | 25ml |
| WRF | Υπολειμματικό | Aqua regia (HCl/HNO ₃) ^d | 16h πέψη ^d | 25ml |

^a Rauret et al. (1999)

^b δεν περιλαμβάνεται στις προδιαγραφές της BCR

^c Wenzel et al. (2001)

^d τροποποίηση της μεθόδου Wenzel

4.5 Συντελεστής Κινητικότητας (*Mobility Factor, MF*)

Η εν δυνάμη κινητικότητα των στοιχείων δύναται να εκτιμηθεί με τον υπολογισμό ενός δείκτη που ονομάζεται συντελεστής κινητικότητας (MF %), ο υπολογισμός του οποίου βασίζεται στο σχετικό ποσοστό εκείνων των εδαφικών κλασμάτων στα οποία θεωρείται ότι τα στοιχεία είναι χαλαρά συνδεδεμένα με τα συστατικά του εδάφους (Kabala and Singh 2001). Τα κλάσματα στα οποία τα στοιχεία θεωρούνται περισσότερο ευκίνητα είναι τα στάδια B1 και W1 των μεθόδων BCR και Wenzel, αντίστοιχα. Ο συντελεστής κινητικότητας και για τα δύο πρωτόκολλα υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{MF Wenzel \%} = \frac{\text{W1}}{(\text{W1}+\text{W2}+\text{W3}+\text{W4}+\text{WRF})} \times 100$$

$$\text{MF BCR \%} = \frac{\text{B1}}{(\text{B1}+\text{B2}+\text{B3}+\text{BRF})} \times 100$$

4.6 Αναλυτικές μέθοδοι

Οι συγκεντρώσεις των στοιχείων προσδιορίστηκαν με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS), χρησιμοποιώντας όργανο ατομικής απορρόφησης Varian - spectra A300. Για τον προσδιορισμό του As σε χαμηλές συγκεντρώσεις, χρησιμοποιήθηκε γεννήτρια υδριδίων (HGAAS) Varian, VGA 77.

Οι μετρήσεις των στοιχείων στο πειραματικό του πρώτου μέρους πραγματοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας επαγωγικώς συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) χρησιμοποιώντας φασματόμετρο Thermo X σειρά II. Οι ολικές συγκεντρώσεις των στοιχείων προσδιορίστηκαν σε φασματόμετρο ατομικής απορρόφησης Perkin Elmer 2100.

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της διαδικασίας υγρής καύσης των δειγμάτων με Aqua regia, χρησιμοποιήθηκε το υλικό αναφοράς ERM-CC141 (πηλώδες έδαφος, οι μέσοι όροι των ποσοστών ανάκτησης για τα Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd και As ήταν 104, 95, 95, 106, 104, 97 και 94%, αντίστοιχα).

4.7 Πειραματικός σχεδιασμός 1^{ου} Μέρους

Εφαρμογή του πρωτόκολλου κλασμάτωσης BCR σε 29 επιφανειακά εδαφικά δείγματα (0-15 cm) από την ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου. Στα εκχυλίσματα κάθε σταδίου της μεθόδου BCR μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As. Στα εδαφικά δείγματα μετρήθηκαν επιπρόσθετα οι ολικές συγκεντρώσεις των στοιχείων (υγρή καύση με Aqua regia) καθώς επίσης διεξήχθησαν και βασικές εδαφολογικές αναλύσεις για τον χαρακτηρισμό των εδαφών και για την συσχέτιση των βασικών εδαφικών παραμέτρων με τις παρατηρηθείσες συγκεντρώσεις των στοιχείων στα αντίστοιχα εδαφικά κλάσματα.

4.8 Πειραματικός σχεδιασμός 2^{ου} Μέρους

Εφαρμογή των πρωτοκόλλων κλασμάτωσης BCR και Wenzel σε 29 επιφανειακά εδαφικά δείγματα (0-15 cm) από την ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου.

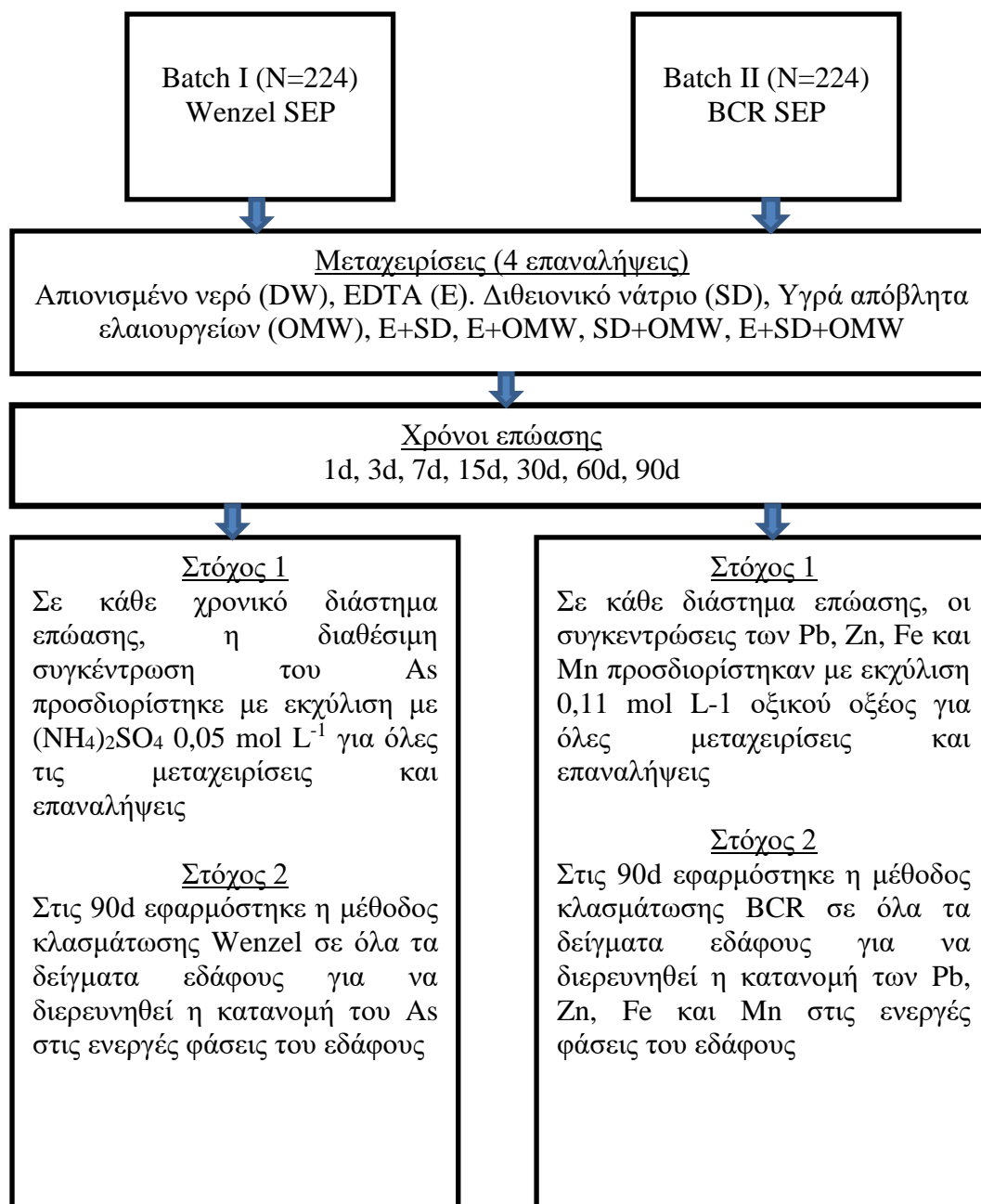
Στα εκχυλίσματα κάθε σταδίου των δυο μεθόδων μετρήθηκε η συγκέντρωση του As. Στα εδαφικά δείγματα μετρήθηκε επιπρόσθετα η ολική συγκέντρωση του As (υγρή καύση με Aqua regia) για να εκτιμηθεί το ποσοστό ανάκτησης (Recovery) του As με τις δυο μεθόδους. Επιπλέον, διεξήχθησαν βασικές εδαφολογικές αναλύσεις για τον χαρακτηρισμό των εδαφών και για την συσχέτιση των βασικών εδαφικών παραμέτρων με τις παρατηρηθείσες συγκεντρώσεις του As στα αντίστοιχα εδαφικά κλάσματα.

4.9 Πειραματικός σχεδιασμός 3^{ου} Μέρους

Για να ελεγχθεί η επίδραση των Na₂-EDTA, Διθειονώδους νατρίου (Sodium dithionite), των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (Olive Mill Wastes, OMW), καθώς και του παράγοντα χρόνου στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn, διεξήχθη πείραμα δύο παραγόντων (μεταχείριση x χρόνος επώασης) με τέσσερις επαναλήψεις σε ρυπασμένο με τα ως άνω στοιχεία έδαφος. Το επιφανειακό έδαφος (0-15cm) που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ανακτήθηκε από την τοποθεσία Θορικό, στη ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου. Οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν στο πείραμα ήταν: i) απιονισμένο νερό (DW) ii) EDTA (E) iii) Διθειονώδες νάτριο (SD) iv) Υγρά απόβλητα ελαιουργείων (OMW) v) E + SD vi) E + OMW vii) SD + OMW viii) E + SD + OMW. Όλες οι μεταχειρίσεις εφαρμόστηκαν σε 1 g εδάφους το οποίο τοποθετήθηκε σε φιάλες falcon των 50 ml, και σε όγκο ίσο με το 80% της υδατοϊκανότητας του εδάφους. Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν στους 20°C σε σκοτεινό θάλαμο για 1 ημέρα (1d), 3 ημέρες (3d), 7 ημέρες (7d), 15 ημέρες (15d), 30 ημέρες (30d), 60 ημέρες (60d) , και 90 ημέρες (90d), διατηρώντας την αρχική τους υγρασία σταθερή. Το πείραμα εξ αρχής διεξήχθη εις διπλούν και διαχωρίστηκε σε 2

σειρές: Σειρά I (Batch I) για το As και Σειρά II (Batch II) για τα Pb και Zn. Στο τέλος κάθε περιόδου επώασης τα εδαφικά δείγματα του Batch I εκχυλίστηκαν με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05 mol L^{-1} και του Batch II με Οξικό οξύ $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ για το As και τον Pb / Zn, αντίστοιχα. Αυτά τα δύο αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται στο πρώτο στάδιο των μεθόδων Wenzel και BCR αντίστοιχα, και θεωρείται ότι εκχυλίζουν τις περισσότερες διαθέσιμες μορφές των στοιχείων που μελετήθηκαν. Με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης της κάθε μεταχείρισης στην κατανομή των As, Pb και Zn στα εδαφικά κλάσματα στο υπό μελέτη έδαφος, στο τέλος της περιόδου επώασης των 90 ημερών, εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι κλασμάτωσης (Sequential Extraction Procedures, SEP) Wenzel (Wenzel et al. 2001) και BCR (Rauret et al. 1999) στο Batch I για το As και στο Batch II για τα Pb και Zn. Επισημαίνεται ότι, τα δυο πρωτόκολλα κλασμάτωσης εφαρμόστηκαν ταυτόχρονα και σε εδαφικό δείγμα που δεν είχε υποστεί καμία μεταχείριση (Untreated). Τέλος, για να διερευνηθεί ο ρόλος των οξυ-υδροξειδίων του Fe / Mn στην κινητικότητα των As, Pb και Zn, προσδιορίστηκαν επιπρόσθετα οι συγκεντρώσεις των Fe και Mn στα εκχυλίσματα οξικού οξέος στο τέλος κάθε περιόδου επώασης και σε όλες τις εκχυλίσεις σε κάθε στάδιο της BCR. Ο πειραματικός σχεδιασμός του 3^{ου} μέρους παρουσιάζεται σε διάγραμμα ροής στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Πειραματικός σχεδιασμός 3^{ου} μέρους

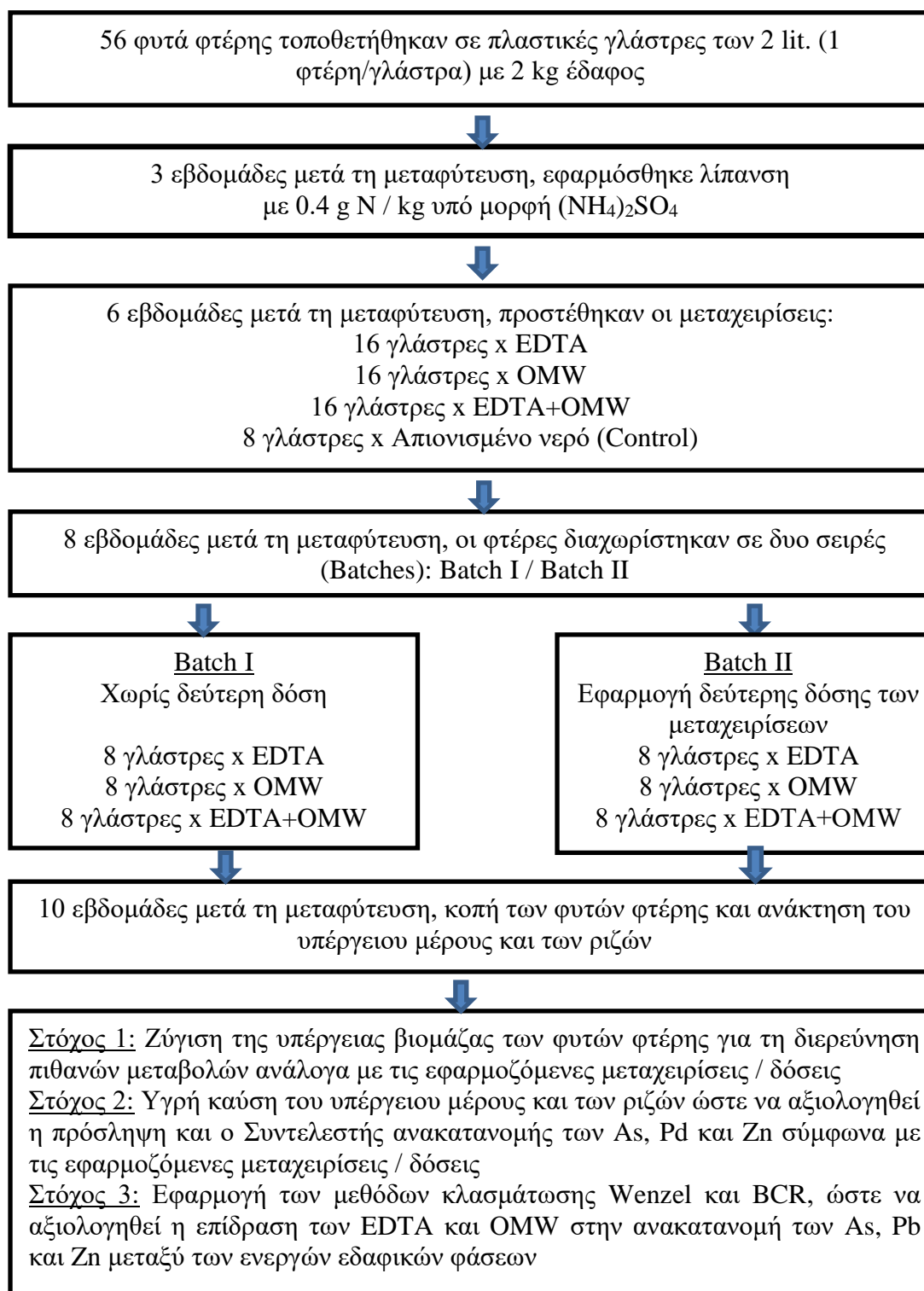


4.10 Πειραματικός σχεδιασμός 4^{ου} Μέρους

Φυτά φτέρης (*Pteris vittata* L.) ηλικίας δέκα μηνών που εισήχθησαν από την Ολλανδία και με φύλλα μήκους περίπου 20-30 cm, μεταφυτεύθηκαν σε πλαστικές γλάστρες των 2 λίτρων (1 φτέρη ανά γλάστρα) που περιείχαν 2 kg επιφανειακού εδάφους. Το έδαφος προήλθε από εκσκαφή σε βάθος 15 cm στη θέση Θορικό, της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου. Συνολικά 56 γλάστρες τοποθετήθηκαν με τυχαία σειρά σε θερμοκήπιο, και τα φυτά αρδευόντουσαν μία ή δύο φορές την εβδομάδα προκειμένου να διατηρηθεί η υγρασία του εδάφους στο ~ 60% της υδατοϊκανότητας (Margesin and Schinner 2005) του εδάφους. Τρεις (3) εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση, εφαρμόστηκε λίπανση με 0,4 g N / kg ως (NH₄)₂SO₄ για την ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών. Έξι (6) εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των μεταχειρίσεων. Κάθε μεταχείριση επαναλήφθηκε 8 φορές, συμπεριλαμβανομένων των φυτών στα οποία προστέθηκε απιονισμένο νερό (DW) (μάρτυρας). Οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν ήταν: i) Na₂-EDTA 0,01 M (στο εξής θα αναφέρεται ως EDTA) ii) Υγρά απόβλητα ελαιουργείων (OMW) 15% v/v σε απιονισμένο νερό και iii) συνδυασμός EDTA 0,01 M και OMW 15%. Επισημαίνεται ότι, στο πειραματικό του 4^{ου} μέρους δεν χρησιμοποιήθηκε το διθειονώδες νάτριο ως μεταχείριση λόγω των φτωχών αποτελεσμάτων που επέδειξε στο πειραματικό του 3^{ου} μέρους όσον αφορά την επίδραση του στη διαθεσιμότητα των υπό μελέτη στοιχείων. Τα OMW που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα προήλθαν από ελαιουργείο που χρησιμοποιεί τριφασικό σύστημα διαχωρισμού. Όλες οι μεταχειρίσεις προστέθηκαν σε όγκο ίσο με το ~ 60% (500 mL) της υδατοϊκανότητας του εδάφους. Οκτώ (8) εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση οι φτέρες διαχωρίστηκαν σε δύο Σειρές (Batches). Η πρώτη Σειρά (Batch I) αποτελούταν από φτέρες που δεν

πραγματοποιήθηκαν άλλες μεταχειρίσεις μέχρι τη κοπή και η δεύτερη Σειρά (Batch II) που περιείχε φτέρες στις οποίες εφαρμόστηκε μια δεύτερη δόση των ίδιων ακριβώς μεταχειρίσεων. Δέκα (10) εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση όλες οι φτέρες συλλέχθηκαν, διαχωρίστηκε το υπέργειο μέρος από το ριζικό σύστημα, και τα φυτικά δείγματα αποθηκεύτηκαν σε ειδικές συσκευασίες και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για περαιτέρω επεξεργασία. Ταυτόχρονα, ανακτήθηκαν τα εδάφη από κάθε γλάστρα, τα οποία εν συνεχεία ομογενοποιήθηκαν ως προς κάθε μεταχείριση και δόση, για να υποβληθούν σε διαδικασία διαδοχικών εκχυλίσεων (Wenzel για το As και BCR για τα Pb / Zn). Τα εδαφικά δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για περαιτέρω επεξεργασία. Ο πειραματικός σχεδιασμός του 4^{ου} μέρους παρουσιάζεται σε διάγραμμα ροής στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Πειραματικός σχεδιασμός 4^{ου} μέρους.



4.11 Στατιστική Επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Excel (MS Office, 2016), STATISTICA (StatSoft, Inc., USA, 1984-2011, Version 10) και IBM SPSS Statistics 20. Πιο συγκεκριμένα η στατιστική επεξεργασία περιελάμβανε: α. Περιγραφικά στατιστικά, σε όλα τα μέρη της διατριβής β. Ανάλυση κατά συστάδες - Cluster analysis, στο 1^ο και 2^ο μέρος γ. Ανάλυση κύριων συνιστωσών - Principal Component Analysis, στο 1^ο και 3^ο μέρος δ. Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και συγκρίσεις μέσων (Tukey's HSD και T-test), στο 3^ο και 4^ο μέρος.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Μέρος 1^ο – Ρύπανση των επιφανειακών εδαφών της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου ως αποτέλεσμα των εξορυκτικών / μεταλλουργικών δραστηριοτήτων

Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων και η συζήτηση που ακολουθεί, αναφέρεται στο πειραματικό μέρος που περιγράφεται στη Σελ. 55 και αποτελεί το 1^ο δημοσιευμένο άρθρο του Παραρτήματος.

5.1.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών

Σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης των εδαφών FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) τα εδάφη που κυριαρχούν στην ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου χαρακτηρίζονται κυρίως ως Cambisols και δευτερευόντως ως Fluvisols. Τα περιγραφικά στατιστικά των κύριων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των υπό μελέτη επιφανειακών εδαφών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Τα εδάφη ήταν αλκαλικά με μέση τιμή pH=7,8, αντανακλώντας την παρουσία ανθρακικού ασβεστίου (μέσος όρος 89 g kg⁻¹), ενώ η περιεκτικότητα σε ενεργό ανθρακικό ασβέστιο ήταν κατά μέσο όρο 13 g kg⁻¹. Τα περισσότερα εδάφη χαρακτηρίζονται ως αμμοαργιλοπηλώδη με μέση περιεκτικότητα σε άργιλο, άμμο και ιλύ 260, 558 και 181 g kg⁻¹, αντίστοιχα. Η μέση περιεκτικότητα σε οργανική ουσία ήταν 26 g kg⁻¹ και οι τιμές της ικανότητας ανταλλαγής κατιόντων (CEC) ήταν μέσες έως υψηλές με μέσο όρο 23.8 cmol_c / kg. Γενικά, σε εδάφη που αναπτύσσονται υπό μεσογειακό κλίμα ευνοούνται οι οξειδωτικές συνθήκες. Στα εδάφη της περιοχής μελέτης επικρατεί καλός αερισμός στο μεγαλύτερο μέρος του έτους, αν και αναγωγικές

συνθήκες μπορεί να εμφανιστούν περιοδικά ύστερα από ισχυρές βροχοπτώσεις (πιθανότατα κατά τη διάρκεια του χειμώνα).

Οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των ελεύθερων (Fed) και άμορφων (Feo) οξειδίων του σιδήρου ήταν 43.0 g kg^{-1} και 6.1 g kg^{-1} , αντίστοιχα. Ο λόγος Feo / Fed καταδεικνύει τον βαθμό κρυσταλλοποίησης των ελεύθερων οξειδίων του σιδήρου και χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης εξέλιξης των εδαφών. Οι τιμές του λόγου Feo / Fed στα εδάφη κυμάνθηκε μεταξύ 0.04 και 0.67, υποδεικνύοντας μεγάλο εύρος τιμών των κρυσταλλικών οξειδίων του Fe, πιθανότατα ως αποτέλεσμα της παραλλακτικότητας των μεταλλευτικών και μεταλλουργικών αποβλήτων που ενσωματώθηκαν στα εδάφη της περιοχής και λιγότερο πιθανό ως ενδεικτικό εδαφών ευρισκόμενων σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης.

5.1.2 Ολικές συγκεντρώσεις των στοιχείων

Η μεγάλη επιβάρυνση των εδαφών του Λαυρίου με βαρέα μέταλλα και μεταλλοειδή, περιπλέκει τον προσδιορισμό του γεωχημικού υπόβαθρου στη περιοχή. Σύμφωνα με τον Δημητριάδη (2010), οι συγκεντρώσεις των στοιχείων σε δείγματα μητρικών πετρωμάτων που βρίσκονται στη επιφάνεια μπορούν να θεωρηθούν ως το μοναδικό φυσικό γεωλογικό υπόβαθρο της ευρύτερης περιοχής (Πίνακας 5). Για να αξιολογηθεί ο οικοτοξικολογικός και ο τοξικολογικός κίνδυνος για τον άνθρωπο από τα εξεταζόμενα μέταλλα και το As, χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά τα ολλανδικά όρια παρέμβασης (Ολλανδία MHPPE 2000, Massas et al. 2013).

Πίνακας 4. Κύριες εδαφικές φυσικοχημικές ιδιότητες (n=29).

| | Clay g kg ⁻¹ | Silt g kg ⁻¹ | Sand g kg ⁻¹ | pH (1:1) | CaCO ₃ g kg ⁻¹ | Act. CaCO ₃ g kg ⁻¹ | OM g kg ⁻¹ | CEC cmol _c kg ⁻¹ | P Olsen mg kg ⁻¹ | Fed g kg ⁻¹ | Feo g kg ⁻¹ | Fed-Feo g kg ⁻¹ | Feo/Fed |
|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------|
| Mean | 260 | 181 | 558 | 7.8 | 89 | 13 | 26 | 24 | 9.2 | 43.0 | 6.1 | 36.9 | 0.14 |
| Median | 250 | 180 | 568 | 7.9 | 68 | 11 | 23 | 22 | 8.2 | 39.3 | 4.0 | 35 | 0.11 |
| Min. | 150 | 80 | 410 | 7.3 | 12 | 0 | 13 | 9 | 1.8 | 26.4 | 2.0 | 14 | 0.04 |
| Max. | 430 | 320 | 766 | 8.3 | 236 | 30 | 64 | 37 | 27.6 | 78.3 | 29.8 | 75 | 0.67 |
| SD | 73 | 53 | 90 | 0.2 | 66 | 9 | 12 | 6 | 4.9 | 12.1 | 6.0 | 12 | 0.14 |
| CV % | 28 | 29 | 16 | 3 | 74 | 68 | 46 | 27 | 53 | 28 | 98 | 33 | 95 |

Clay=Άργιλος, Silt=Ίλύς, Sand=Άμμος, pH=Ενεργός οξύτητα, CaCO₃=Ισοδύναμο Ανθρακικό Ασβέστιο, Act.CaCO₃=Ενεργό Ανθρακικό Ασβέστιο, OM=Οργανική Ουσία, CEC=Ίκανότητα Ανταλλαγής Κατιόντων, P Olsen=Αφομοιώσιμος Φώσφορος, Fed=Ελεύθερα οξείδια του σιδήρου, Feo=Άμορφα οξείδια του σιδήρου, Mean=Μέσος, Median=Διάμεσος Min.=Ελάχιστο, Max.=Μέγιστο SD=Τυπική απόκλιση CV%=Συντελεστής μεταβλητότητας.

Οι ολικές συγκεντρώσεις των στοιχείων έδειξαν μεγάλη διακύμανση, αντανακλώντας την άνιση κατανομή των μεταλλευτικών και μεταλλουργικών αποβλήτων διαφορετικής σύστασης στην περιοχή (Πίνακας 5). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή (η κανονική κατανομή των δεδομένων εξετάστηκε εφαρμόζοντας το Shapiro-Wilk test), για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η διάμεση τιμή των συγκεντρώσεων. Οι διάμεσες ολικές συγκεντρώσεις όλων των στοιχείων που μελετήθηκαν ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με το γεωχημικό υπόβαθρο, υποδεικνύοντας τον εμπλουτισμό με βαρέα μέταλλα και As των εδαφών του Λαυρίου από ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Οι διάμεσες τιμές των ολικών συγκεντρώσεων των Zn, Pd, Cd και As ήταν 4, 9, 1.4 και 17 φορές υψηλότερες από τα αντίστοιχα Ολλανδικά όρια παρέμβασης, υποδεικνύοντας σοβαρή ρύπανση με έντονα αρνητικές συνέπειες στις φυσιολογικές λειτουργίες των εδαφών της περιοχής (Netherlands MHPPE 2000) . Οι διάμεσες τιμές των ολικών συγκεντρώσεων των Cu, Ni και Cr ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές παρέμβασης, γεγονός που υποδηλώνει χαμηλό ή αμελητέο κίνδυνο για το οικοσύστημα των εδαφών και το περιβάλλον.

5.1.3 Κλασμάτωση και κινητικότητα των στοιχείων

Η κλασμάτωση των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd και As παρουσιάζεται στον Πίνακα 6. Η επί της εκατό αναλογία των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων των στοιχείων στα διάφορα κλάσματα του εδάφους (B1, B2, B3, BRF) απεικονίζονται στο Σχήμα 1.

Πίνακας 5. Ολικές συγκεντρώσεις (Total concentrations) των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As σε επιφανειακά εδάφη του Λαυρίου, γεωχημικό υπόβαθρο (Geochemical background levels) της περιοχής και Ολλανδικά όρια παρέμβασης (Dutch Intervention Values) (mg kg^{-1}).

| Elements | Geochemical background levels ^a | | | Total concentrations | | | | Dutch Intervention Values ^b |
|-----------|--------------------------------------------|--------|-----------|----------------------|--------|------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| | Mean | Median | Range | Mean | Median | Range | Shapiro-Wilk test p values ^c | |
| Zn | 210.60 | 57.00 | <6.0-5200 | 6500 | 3188 | 969-30000 | 0.00 | 720 |
| Cu | 32.80 | 25.00 | 3.00-225 | 149 | 96 | 54-522 | 0.00 | 190 |
| Pb | 76.85 | 22.00 | <1.0-1850 | 8668 | 4625 | 1219-40313 | 0.00 | 530 |
| Ni | 168.30 | 54.50 | <1.0-1600 | 229 | 152 | 43-1066 | 0.00 | 210 |
| Cr | 100.40 | 20.00 | <1.0-610 | 210 | 144 | 63-1353 | 0.00 | 380 |
| Cd | 1.89 | 0.50 | <1.0-41 | 28 | 17 | 4.2-110 | 0.00 | 12 |
| As | 62.80 | 15.60 | <0.5-1032 | 1415 | 921 | 204-5001 | 0.00 | 55 |

^a Demetriades, 2010; ^b Netherlands MHPPE, 2000; ^c $p > 0.05$ υποδεικνύει κανονική κατανομή

Ο ψευδάργυρος βρέθηκε να σχετίζεται κυρίως με το αναγώγιμο (37.1%) και το υπολειμματικό κλάσμα (27.1%), αν και οι μέσες σχετικές συγκεντρώσεις του Zn στο οξειδώσιμο κλάσμα (19.6%) και στο ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ (16.2%) ήταν επίσης υψηλές. Συνεπώς, τα οξείδια / υδροξείδια Fe - Mn φαίνεται να είναι ο κύριος μηχανισμός ακινητοποίησης του Zn στα υπό μελέτη εδάφη, ενώ η οργανική ουσία και τα ανθρακικά μπορούν επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο. Οι υψηλές τιμές του Zn στο υπολειμματικό κλάσμα μπορούν να εξηγηθούν λαμβάνοντας υπόψη την τάση των ορυκτών αργίλου να δεσμεύουν τον Zn στο κρυσταλλικό πλέγμα (Gasparatos et al. 2015).

Η μεγαλύτερη ποσότητα Cu (48.5%) βρέθηκε στο υπολειμματικό κλάσμα και ακολούθως στο οξειδώσιμο (29.5%) και στο αναγώγιμο (21.1%) κλάσμα. Στα περισσότερα δείγματα, η συγκέντρωση του Cu που εκχυλίστηκε στο πρώτο βήμα (B1) της BCR ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης με αποτέλεσμα το ανταλλάξιμο κλάσμα να αντιπροσωπεύει μόνο το 0.9% της συνολικής συγκέντρωσης του Cu.

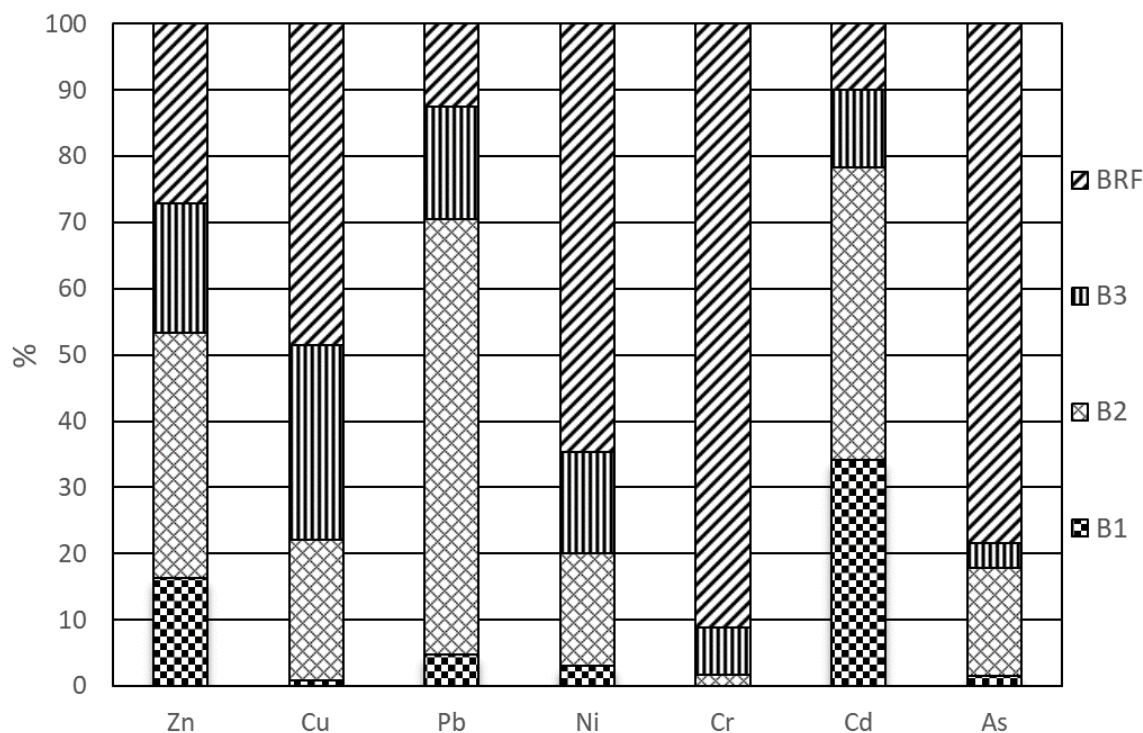
Πίνακας 6. Περιγραφικά στατιστικά των συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As στις τέσσερις εδαφικές χημικές φάσεις σύμφωνα με τη μέθοδο BCR (B1, B2, B3 και BRF) (mg kg⁻¹) και % Recovery (Recovery % = [(B1+B2+B3+BRF) /Total] x 100).

| | | B1 | B2 | B3 | BRF | Sum (B1+B2+B3+BRF) | Total | Recovery% |
|-----------|--------|------|-------|-------|-------|-----------------------|-------|-----------|
| Zn | Mean | 1255 | 2532 | 906 | 1203 | 5896 | 6500 | 95.4 |
| | Median | 585 | 1220 | 725 | 872 | 3323 | 3188 | 96.1 |
| | Min. | 61 | 245 | 185 | 453 | 1036 | 969 | 73.0 |
| | Max. | 7300 | 11980 | 4025 | 4516 | 27821 | 30000 | 113.5 |
| | SD | 1880 | 2925 | 799 | 896 | 5954 | 6755 | 10.0 |
| | CV % | 150 | 116 | 88 | 75 | 101 | 104 | 10.5 |
| Cu | Mean | 3.3 | 40 | 45 | 69 | 158 | 149 | 104.3 |
| | Median | 0.0 | 24 | 32 | 57 | 104 | 96 | 105.7 |
| | Min. | 0.0 | 1.3 | 8.7 | 30 | 46 | 54 | 83.8 |
| | Max. | 26 | 174 | 128 | 261 | 559 | 522 | 119.2 |
| | SD | 6.9 | 44 | 34 | 50 | 123 | 113 | 8.4 |
| | CV % | 210 | 110 | 75 | 72 | 78 | 76 | 8.0 |
| Pb | Mean | 638 | 4847 | 1381 | 1462 | 8328 | 8668 | 95.2 |
| | Median | 178 | 3052 | 703 | 281 | 4412 | 4625 | 97.6 |
| | Min. | 20 | 512 | 165 | 69 | 1188 | 1219 | 76.6 |
| | Max. | 5480 | 19020 | 11225 | 12969 | 40614 | 40313 | 109.5 |
| | SD | 1242 | 4757 | 2253 | 3015 | 10345 | 10420 | 8.8 |
| | CV % | 195 | 98 | 163 | 206 | 124 | 120 | 9.3 |
| Ni | Mean | 6.3 | 49 | 33 | 144 | 232 | 229 | 101.4 |
| | Median | 3.7 | 25 | 20 | 93 | 150 | 152 | 104.2 |
| | Min. | 0.0 | 2.9 | 5.7 | 35 | 44 | 43 | 78.3 |
| | Max. | 21 | 277 | 141 | 748 | 1157 | 1066 | 109.8 |
| | SD | 5.1 | 68 | 31 | 145 | 241 | 235 | 7.4 |
| | CV % | 82 | 138 | 95 | 101 | 104 | 103 | 7.3 |
| Cr | Mean | * | 3.1 | 14 | 206 | 223 | 210 | 107.9 |
| | Median | | 2.4 | 11 | 142 | 156 | 144 | 109.0 |
| | Min. | | 0.4 | 5.2 | 61 | 67 | 63 | 87.2 |
| | Max. | | 12 | 49 | 1408 | 1464 | 1353 | 151.6 |
| | SD | | 2.5 | 9.5 | 244 | 252 | 236 | 12.9 |
| | CV % | | 81 | 69 | 118 | 113 | 113 | 11.9 |
| Cd | Mean | 13 | 14 | 3.5 | 2.8 | 33 | 28 | 118.7 |
| | Median | 7.0 | 9.7 | 2.4 | 1.9 | 21 | 17 | 121.0 |
| | Min. | 1.1 | 1.8 | 1.0 | 0.3 | 4.6 | 4.2 | 94.1 |
| | Max. | 63 | 36 | 21 | 12 | 132 | 110 | 132.3 |
| | SD | 14 | 10 | 3.7 | 2.4 | 29 | 24 | 9.2 |
| | CV % | 109 | 73 | 107 | 84 | 87 | 85 | 7.7 |
| As | Mean | 14 | 229 | 46 | 944 | 1231 | 1415 | 90.2 |
| | Median | 8.2 | 111 | 33 | 650 | 826 | 921 | 88.9 |
| | Min. | 1.4 | 8.3 | 3.1 | 136 | 163 | 204 | 73.0 |
| | Max. | 68 | 1209 | 186 | 3207 | 4195 | 5001 | 111.9 |
| | SD | 14 | 259 | 45 | 834 | 1087 | 1305 | 10.2 |
| | CV % | 106 | 114 | 98 | 88 | 88 | 92 | 11.3 |

* δεν ανιχνεύτηκε Cr στο B1

Ο χαλκός είναι από τα μέταλλα με τη μικρότερη κινητικότητα στο έδαφος και συνδέεται ισχυρά με τα ορυκτά της αργίλου, την οργανική ουσία και τα οξείδια του Fe - Mn (Hooda 2010). Ως εκ τούτου, η παρατηρούμενη κατανομή του Cu μεταξύ των διαφορετικών κλασμάτων στα υπό μελέτη εδάφη αντιστοιχεί στη χημική του συμπεριφορά.

Σχήμα 1. Επί της εκατό ποσοστά των μέσων όρων των συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As στα εδαφικά κλάσματα σύμφωνα με τη μέθοδο BCR. B1 Ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ, B2 Αναγωγίμο, B3 Οξειδώσιμο, BRF Υπολειμματικό.



Η κλασμάτωση του Pb έδειξε ότι περισσότερο από το 65% του ολικού Pb συνδέεται με το αναγωγίμο κλάσμα. Οι σχετικές συγκεντρώσεις του Pb στο οξειδώσιμο και υπολειμματικό κλάσμα ήταν 17% και 12.6% αντίστοιχα, ενώ μόνο το 4.7% του ολικού Pb εκχυλίστηκε στο ανταλλάξιμο κλάσμα. Λαμβάνοντας υπόψη τις πολύ υψηλές συνολικές συγκεντρώσεις του Pb στα περισσότερα από τα εδάφη του

Λαυρίου, το 4.7% του ολικού Pb στο B1 υποδηλώνει ότι μια σημαντική ποσότητα Pb είναι άμεσα ή δυνητικά διαθέσιμη, γεγονός που πιθανόν να οδηγήσει σε τοξικότητες στα φυτά αλλά και στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Επιπλέον, η μεγάλη διακύμανση της συγκέντρωσης του CaCO₃ στα υπό μελέτη εδάφη, η τάση του Pb να δεσμεύεται στα ανθρακικά άλατα και η ατελής διάλυση των Pb-ανθρακικών από το οξικό οξύ (εκχυλιστικό μέσο στο B1) (Gleyzes et al. 2002), μπορεί να έχουν οδηγήσει σε υποεκτίμηση του 1^{ου} σταδίου (B1) της BCR και συνεπώς στην υποεκτίμηση της διαθεσιμότητας του Pb στα υπό μελέτη εδάφη.

Το νικέλιο βρέθηκε να συνδέεται κυρίως με το υπολειμματικό κλάσμα (64.7% της ολικής συγκέντρωσης), ακολουθούμενο από το αναγωγίμο και οξειδώσιμο κλάσμα τα οποία επέδειξαν παρόμοιες μέσες σχετικές συγκεντρώσεις (17.1% και 15.2% αντίστοιχα). Η χαμηλότερη ποσότητα Ni (3.1%) βρέθηκε στο ανταλλάξιμο κλάσμα. Σύμφωνα με τους Brümmer et al. (1988), η υψηλότερη ενέργεια σταθεροποίησης του Ni⁺² μεταξύ των κοινών δισθενών μετάλλων μπορεί να εξηγήσει την τάση του Ni να προσροφάται στο πλέγμα των αργιλοπυριτικών ορυκτών. Επιπλέον, η παρουσία Ni στη πυριτική δομή του σμεκτίτη και του ιλίτη, και η ισόμορφη αντικατάσταση των Fe και Al στα ορυκτά της ομάδας του σπινελίου, περιγράφει περαιτέρω τη τάση του Ni για το υπολειμματικό κλάσμα (Favas et al. 2011).

Η κυρίαρχη χημική μορφή του Cr ήταν η υπολειμματική, η οποία ήταν περίπου το 91.1% της ολικής περιεκτικότητας, ενώ δεν ανιχνεύθηκε Cr στο στάδιο B1 υποδηλώνοντας τη χαμηλή διαθεσιμότητα του Cr στα υπό μελέτη εδάφη. Το Cr βρέθηκε συνδεδεμένο με την οργανική ουσία και με τα οξείδια Fe / Mn σε ποσοστό 7.2 και 1.7% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεγαλύτερο μέρος του

γεωγενούς Cr υπάρχει γενικά ως έγκλειστο στο πλέγμα των ορυκτών του εδάφους και συνεπώς το Cr είναι γενικά ελάχιστα διαλυτό και ακινητοποιημένο.

Το μεγαλύτερο μέρος του Cd βρέθηκε στο αναγώγιμο κλάσμα (44.1%). Το ποσοστό του Cd στο ανταλλάξιμο κλάσμα ήταν επίσης υψηλό (34.1%), υποδηλώνοντας μεγάλη διαθεσιμότητα του Cd στα εδάφη του Λαυρίου. Το οξειδώσιμο και το υπολειμματικό κλάσμα αντιπροσώπευαν περίπου το 11.9 και το 9.9 % της ολικής περιεκτικότητας σε Cd, αντίστοιχα. Δύο βασικοί μηχανισμοί φαίνεται να ελέγχουν τη συμπεριφορά του Cd στα εδάφη που μελετήθηκαν. Η πρώτη είναι η προσρόφηση του Cd στα οξείδια του Fe / Mn, και ο δεύτερος είναι ο σχηματισμός Cd - ανθρακικών αλάτων ή / και η ενσωμάτωση του Cd στα ανθρακικά άλατα (Alloway 2013).

Τα ποσοστά των μέσων τιμών της συγκέντρωσης του As στα διάφορα κλάσματα ήταν σε φθίνουσα σειρά BRF> B2> B3> B1. Στα εδάφη που μελετήθηκαν, το σημαντικότερο κλάσμα για το As ήταν το υπολειμματικό (78.4%) ακολουθούμενο από το αναγώγιμο κλάσμα (16.2%). Πολύ μικρές ποσότητες As εκχυλίστηκαν στο οξειδώσιμο και στο ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ κλάσμα (3.8 και 1.6% αντιστοίχως). Φαίνεται ότι το As συγκρατείται ισχυρά στο πλέγμα των πρωτογενών ορυκτών (όπως του αρσеноπυρίτη) και των δευτερογενών ορυκτών (κυρίως σχηματισμοί με τα οξείδια του Fe). Η σχετικά υψηλή ποσότητα του As στο στάδιο B2 της μεθόδου BCR υποδηλώνει ότι υπό αναγωγικές συνθήκες η κινητικότητα / διαθεσιμότητα του As μπορεί να αυξηθεί λόγω της διαλυτοποίησης των οξειδίων Fe / Mn.

Οι μορφές των μετάλλων που διαλυτοποιούνται στα τρία πρώτα στάδια (B1, B2, B3) της μεθόδου BCR θεωρούνται ως τα ενεργά κλάσματα, καθώς σε περίπτωση μεταβολής των εδαφικών συνθηκών μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένες

συγκεντρώσεις των μετάλλων στο εδαφικό διάλυμα. Ωστόσο, τα κλάσματα B1 και B2 μπορούν να θεωρηθούν ως τα σημαντικότερα για το εδαφικό οικοσύστημα. Πράγματι, οι μορφές των μετάλλων που εκχυλίζονται στο πρώτο στάδιο B1 θεωρούνται ως άμεσα διαθέσιμες ή δυνητικά διαθέσιμες σε περιπτώσεις μείωσης του εδαφικού pH. Οι συνθήκες εκχύλισης στο δεύτερο στάδιο B2 της BCR αντιστοιχούν σε κάποιο βαθμό στις εδαφικές συνθήκες που μπορεί να προκύψουν κάτω από υπερβολική εισροή νερού είτε από έντονες βροχοπτώσεις είτε ως αποτέλεσμα υπερβολικής άρδευσης. Σε εδάφη με μέτρια έως υψηλή περιεκτικότητα σε άργιλο, όπως τα εδάφη αυτής της μελέτης, αναγωγικές συνθήκες μπορούν συχνά να εμφανιστούν ειδικά στο μικροπορώδες. Συνεπώς, ο Zn και ο Pb που συνδέονται με το αναγωγίμο κλάσμα και το Cd που συνδέεται κυρίως με το διαθέσιμο και το αναγωγίμο κλάσμα, και λαμβάνοντας υπόψη τις υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των μετάλλων στα αντίστοιχα κλάσματα, μπορούν να θεωρηθούν ως δυνητική απειλή για τα οικοσυστήματα στην περιοχή. Το αρσενικό βρέθηκε να συνδέεται κυρίως με το υπολειμματικό κλάσμα. Ταυτόχρονα όμως, το σημαντικό ποσοστό του As που παρατηρήθηκε στο αναγωγίμο κλάσμα υποδηλώνει αυξημένη κινητικότητα κάτω από αναγωγικές συνθήκες και γι' αυτό δύναται να ομαδοποιηθεί μαζί με τα Pb, Zn και Cd. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι σημαντικές ποσότητες των Cd, Zn, Pb και As παραμένουν σε σχετικά ασθενώς δεσμευμένες ή δυνητικά διαθέσιμες μορφές στους επιφανειακούς ορίζοντες των εδαφών της περιοχής, αποτελώντας κατ' αυτόν το τρόπο φυτοτοξικό κίνδυνο καθώς και απειλή για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων.

5.1.4 Προέλευση των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd και As στα εδάφη του Λαυρίου

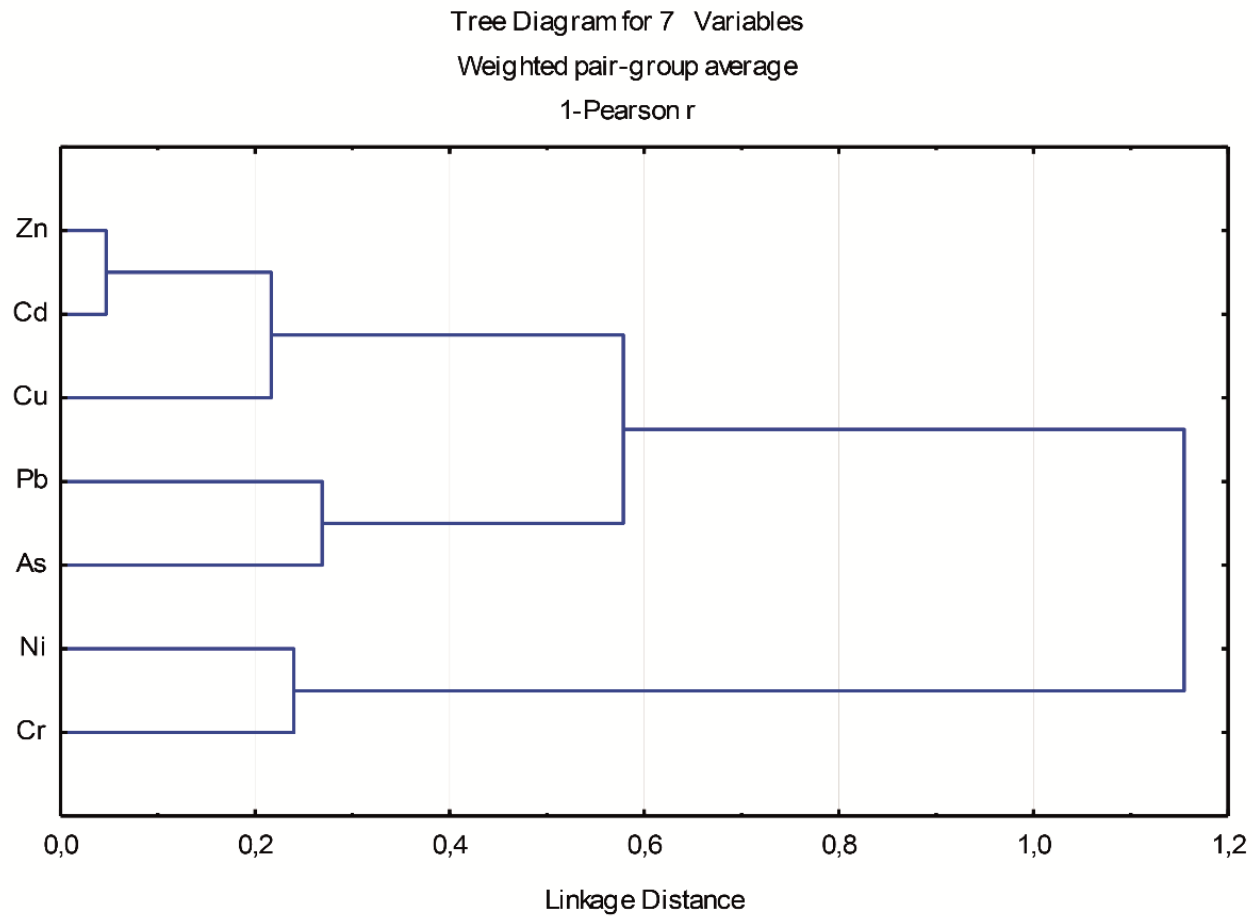
Σύμφωνα με τους συντελεστές συσχέτισης (Πίνακας 7) και τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά συστάδες (Cluster analysis, Σχήμα 2) που εφαρμόστηκαν για τις ολικές συγκεντρώσεις των στοιχείων, διακρίνονται τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τα Zn, Cu και Cd με τιμές r που κυμαίνονται μεταξύ 0.76 και 0.95 ($p < 0.001$). Η ισχυρότερη συσχέτιση για τα μέταλλα αυτής της ομάδας παρατηρήθηκε μεταξύ του Zn και του Cd ($r = 0.95$, $p < 0.001$). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα Pb και As με $r = 0.73$ ($p < 0.001$) ενώ τα Ni και Cr συνθέτουν την τρίτη ομάδα με $r = 0.76$ ($p < 0.001$). Τα μέταλλα της πρώτης ομάδας συσχετίστηκαν αρνητικά με την άργιλο είτε σημαντικά ($r = -0.41$, $p < 0.05$ για Zn και $r = -0.39$, $p < 0.05$ για Cd) ή μη σημαντικά ($r = -0.35$, $p > 0.05$ για Cu). Οι ολικές συγκεντρώσεις των As και Pb συσχετίστηκαν αρνητικά με το ανθρακικό ασβέστιο υποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο των ανθρακικού ασβεστίου στη γεωχημική συμπεριφορά τόσο του As όσο και του Pb στα εδάφη της περιοχής του Λαυρίου. Η πρώτη και η δεύτερη ομάδα των μετάλλων σχηματίζει ένα κοινό σύμπλεγμα που υποδηλώνει κοινή προέλευση, ενώ η τρίτη ομάδα φαίνεται ότι δεν συσχετίζεται με τις άλλες δυο (Σχήμα 2). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ρύπανση του εδάφους στην περιοχή του Λαυρίου είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιων δραστηριοτήτων εξόρυξης και μεταλλουργίας, αυτές οι σχέσεις μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ενδεικτικές της χημικής και ορυκτολογικής σύνθεσης των παραχθέντων μεταλλευτικών / μεταλλουργικών αποβλήτων. Η παρουσία των Ni και Cr στην ίδια ομάδα και οι συγκριτικά χαμηλές ολικές συγκεντρώσεις τους στα εδάφη, υποδηλώνουν ότι η παρουσία αυτών των δύο μετάλλων στα μεταλλευτικά και μεταλλουργικά απόβλητα είναι σχετικά χαμηλή.

Πίνακας 7. Πίνακας συντελεστών συσχέτισης (Correlation coefficient matrix) μεταξύ των εδαφικών ιδιοτήτων και των ολικών συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As (n=29).

| | Clay | pH | Total CaCO ₃ | Active CaCO ₃ | OM | Zn | Cu | Pb | Ni | Cr | Cd | As |
|--------------------------|---------------|---------------|-------------------------|--------------------------|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|------|------|
| Clay | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| pH | 0.41* | 1.00 | | | | | | | | | | |
| Total CaCO ₃ | -0.24 | 0.16 | 1.00 | | | | | | | | | |
| Active CaCO ₃ | 0.15 | 0.51** | 0.74* | 1.00 | | | | | | | | |
| OM | -0.16 | -0.34 | 0.05 | -0.22 | 1.00 | | | | | | | |
| Zn | -0.41* | -0.08 | 0.03 | -0.24 | 0.04 | 1.00 | | | | | | |
| Cu | -0.35 | -0.16 | -0.20 | -0.36 | -0.03 | 0.81*** | 1.000 | | | | | |
| Pb | -0.34 | -0.32 | -0.24 | -0.51** | -0.08 | 0.50** | 0.51** | 1.00 | | | | |
| Ni | 0.47** | 0.37* | -0.07 | 0.11 | -0.25 | -0.01 | -0.07 | -0.19 | 1.00 | | | |
| Cr | 0.28 | 0.12 | -0.11 | -0.05 | -0.19 | -0.12 | -0.17 | -0.19 | 0.76*** | 1.00 | | |
| Cd | -0.39* | -0.10 | 0.04 | -0.26 | 0.17 | 0.95*** | 0.76*** | 0.47** | -0.04 | -0.15 | 1.00 | |
| As | -0.21 | -0.38* | -0.47* | -0.48** | -0.16 | 0.18 | 0.51** | 0.73*** | -0.22 | -0.25 | 0.18 | 1.00 |

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001, Clay=Άργιλος, pH=Ενεργός οξύτητα, CaCO₃=Ισοδύναμο Ανθρακικό Ασβέστιο, Act.CaCO₃=Ενεργό Ανθρακικό Ασβέστιο, OM=Οργανική Ουσία

Σχήμα 2. Ιεραρχικό δενδρόγραμμα των ολικών συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As στα επιφανειακά εδάφη του Λαυρίου (n=29).



5.1.5 Σχέσεις μεταξύ των γεωχημικών μορφών των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, As στα εδάφη και των εδαφικών ιδιοτήτων

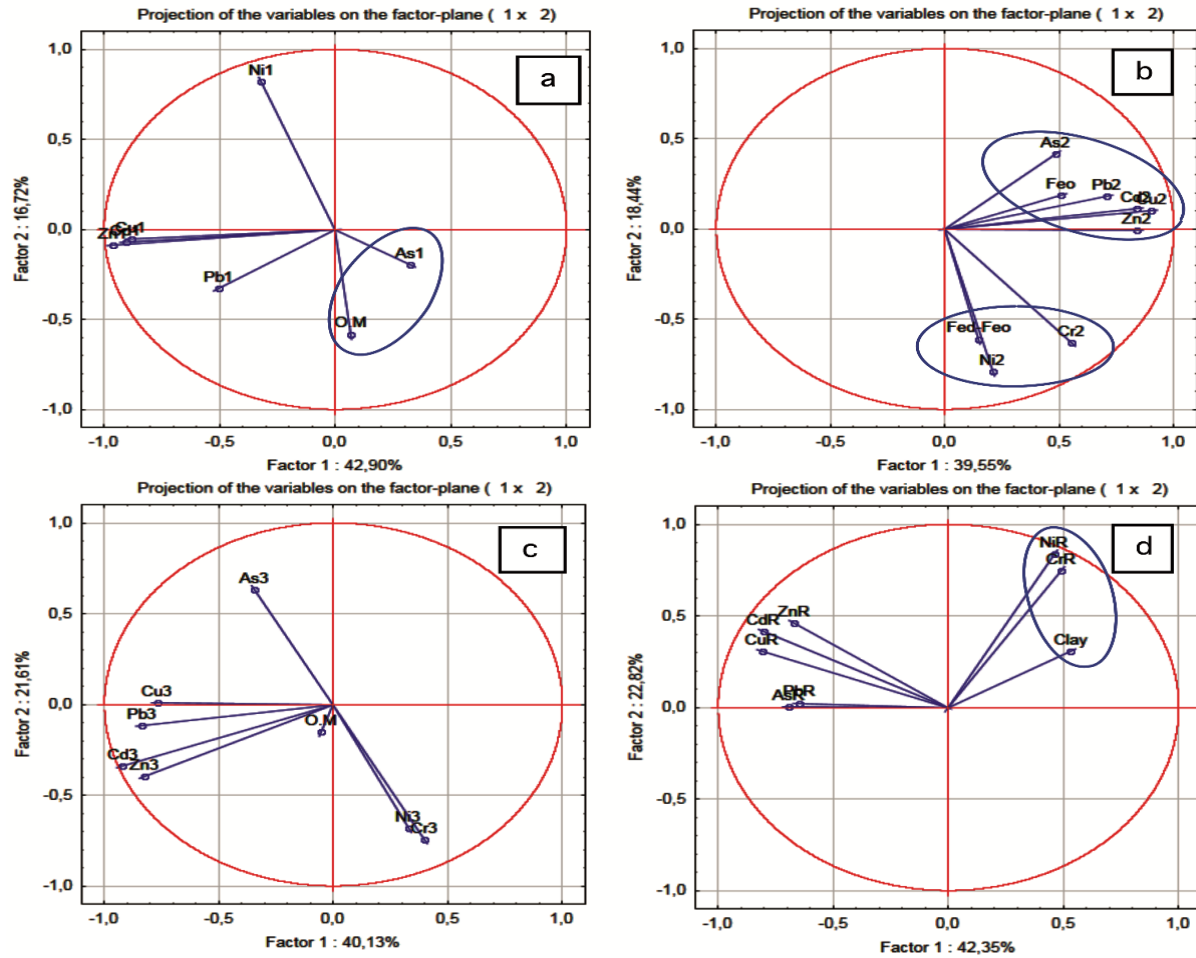
Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) εφαρμόστηκε για να διερευνηθούν οι σχέσεις μεταξύ των γεωχημικών μορφών των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, As και της αργίλου, του ανθρακικού ασβεστίου (ολικό και ενεργό CaCO_3), της οργανικής ουσίας, των κρυσταλλικών και άμορφων οξειδίων του Fe στα υπό μελέτη εδάφη. Για κάθε κλάσμα του εδάφους, ο αριθμός των μεταβλητών μειώθηκε σε δύο βασικούς παράγοντες (παράγοντας 1 και 2) που εξηγούν περίπου το 60% της ολικής διακύμανσης για τα στάδια B1 και B2, 62% για το B3 και 65% για το στάδιο BRF (Σχήμα 3).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCA ανάλυσης δεν παρατηρήθηκε σημαντική σχέση μεταξύ του σταδίου B1 της μεθόδου BCR και των εδαφικών ιδιοτήτων, εκτός από μια ασθενή σχέση του As με την οργανική ουσία που δείχνει την δημιουργία συμπλόκων εξωτερικής / εσωτερικής στιβάδας του As με χουμικά και φλουβικά οξέα (Williams et al. 2011). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της PCA ανάλυσης έδειξαν σημαντική συσχέτιση του αναγωγίμου κλάσματος B2 των As, Pb, Zn, Cu, Cd, Cr και Ni με τα οξείδια του σιδήρου, επιβεβαιώνοντας τη μεγάλη σημασία των οξειδίων του Fe στη συγκράτηση τοξικών στοιχείων σε βαριά μολυσμένα εδάφη. Πράγματι, το κλάσμα B2 των As, Pb, Zn, Cu και Cd συσχετίστηκε ισχυρά με τα άμορφα οξείδια του σιδήρου (Feo), ενώ το κλάσμα B2 των Cr και Ni βρέθηκε να συσχετίζεται με τα κρυσταλλικά οξείδια του σιδήρου (Fed-Feo).

Το οξειδώσιμο κλάσμα B3 δεν συσχετίστηκε με την οργανική ουσία, υποδεικνύοντας τη μικρή συμβολή της στη συγκράτηση των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As στα υπό μελέτη εδάφη. Σύμφωνα με τον Quevauviller (2002), τα

αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στο στάδιο B3 της μεθόδου BCR μπορούν να απελευθερώσουν μέταλλα που βρίσκονται δεσμευμένα και σε θειούχα ορυκτά (σουλφίδια). Συνεπώς, είναι πιθανό ότι οι σχετικές συγκεντρώσεις των μετάλλων και του As που εκχλίζονται σε αυτό το κλάσμα να προέρχονται κυρίως από τη διαλυτοποίηση των θειικών αλάτων που περιείχαν τα υπό μελέτη στοιχεία, και λιγότερο από ασταθή οργανομεταλλικά σύμπλοκα. Τέλος, η ανάλυση PCA κατέδειξε μια σημαντική συσχέτιση του υπολειμματικού κλάσματος των Ni και Cr με την άργιλο, επιβεβαιώνοντας τη τάση των Ni και Cr να συγκρατούνται ισχυρά στο πλέγμα των αργιλοπυριτικών ορυκτών, αλλά και την κοινή τους ορυκτολογική προέλευση.

Σχήμα 3. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA analysis) μεταξύ των συγκεντρώσεων των Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, και As στα εδαφικά κλάσματα και βασικών εδαφικών ιδιοτήτων α. B1 – οργανική ουσία β. B2 – άμορφα οξείδια του Fe (Feo) / κρυσταλλικά οξείδια του Fe (Fed-Feo) γ. B3 – οργανική ουσία δ. BRF - άργιλος (n=29).



5.2 Μέρος 2^ο – Κλασμάτωση του As σε ρυπασμένα επιφανειακά εδάφη της ευρύτερης περιοχής του Λαυρίου χρησιμοποιώντας δυο μεθόδους διαδοχικής εκχύλισης Wenzel και BCR

Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων και η συζήτηση που ακολουθεί, αναφέρεται στο πειραματικό μέρος που περιγράφεται στη Σελίδα 55 και αποτελεί το 2^ο δημοσιευμένο άρθρο του Παραρτήματος.

5.2.1 Μέθοδοι διαδοχικής εκχύλισης Wenzel και BCR

Οι μέθοδοι κλασμάτωσης BCR και Wenzel που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή περιγράφονται στον Πίνακα 1 (σελ. 53). Η μέθοδος Wenzel έχει εφαρμοσθεί σε πολλές μελέτες (Gault et al. 2003; Caille et al. 2004) διότι στοχεύει στα πλέον περιβαλλοντικώς σημαντικά κλάσματα του αρσενικού, παρέχοντας αρκετά αξιόπιστα αποτελέσματα για τις μορφές του As σε ρυπασμένα εδάφη και ιζήματα. Σύμφωνα με τη μέθοδο Wenzel, ορίζονται τα ακόλουθα λειτουργικά κλάσματα του As: W1, μη ειδικώς προσροφημένα (σύμπλοκα εξωτερικής στιβάδας); W2, ειδικώς προσροφημένα (σύμπλοκα εσωτερικής στιβάδας); W3, συνδεδεμένο με άμορφα και ασθενώς κρυσταλλικά οξείδια των Fe, Mn, Al; W4, συνδεδεμένο με κρυσταλλικά οξείδια των Fe, Mn, Al; WRF, υπολειμματικό. Στη μελέτη αυτή, για την εκχύλιση της υπολειμματικής φάσης χρησιμοποιήθηκε Βασιλικό νερό (Aqua regia) αντικαθιστώντας ένα μείγμα $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$ που προτείνεται στην αρχική μέθοδο ώστε να υπάρχει η δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων με εκείνα της BCR. Στη μέθοδο Wenzel, δεν περιλαμβάνεται ξεχωριστό οξειδώσιμο κλάσμα και δεν λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για το As που είναι δεσμευμένο στα ανθρακικά άλατα.

Σε δείγματα αλκαλικών εδαφών και πριν από την αναγωγή φάση, οι Wenzel et al. (2001) εφάρμοσαν ρυθμιστικό διάλυμα NaOAc / HOAc και παρατήρησαν ότι οι ποσότητες As που εκχυλίστηκαν ήταν αμελητέες, δείχνοντας ότι ελάχιστη ποσότητα του As συνδέεται με τα ανθρακικά άλατα. Επιπλέον, προκαταρκτικές δοκιμές που διεξήχθησαν από τους Wenzel et al. (2001) έδειξαν ότι οι ποσότητες του As που εκχυλίστηκαν από εδαφικά δείγματα χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια που περιείχαν EDTA, δεν συσχετίζονταν σημαντικά με την περιεκτικότητα των εδαφών σε οργανική ουσία. Πρόσφατα, οι Larios et al. (2012) ανέπτυξαν μια μέθοδο διαδοχικής εκχύλισης που σχεδιάστηκε ειδικά για τη κλασμάτωση του As σε ρυπασμένα εδάφη και ιζήματα που δεν περιλαμβάνει ξεχωριστό βήμα για την σύνδεση του As με τα ανθρακικά άλατα, αλλά περιλαμβάνει οξειδώσιμο στάδιο. Για να διαλυτοποιηθούν τα χουμικά οξέα που θεωρούνται ως η κύρια οργανική δεξαμενή του As στα εδάφη, οι Larios et al. (2012) χρησιμοποίησαν $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ πυροφωσφορικού διαλύματος. Ωστόσο, οι ίδιοι συγγραφείς (Larios et al. 2013) πρότειναν ως εξαιρετικά πιθανό ότι το As που εκχυλίστηκε στο οξειδώσιμο κλάσμα της μεθόδου τους δεν συνδεόταν απ' ευθείας με την οργανική ουσία αλλά έμμεσα, αφού το As φαίνεται να σχηματίζει σύμπλοκα με κατιόντα του Fe και Ca που με τη σειρά τους είναι συνδεδεμένα με χουμικές ενώσεις.

Η δεύτερη μέθοδος κλασμάτωσης που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε για μέταλλα (κατιόντα) και είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος BCR (Rauret et al. 1999). Το πρωτόκολλο BCR περιλαμβάνει τρία χημικά κλάσματα του As στα εδάφη: (B1) ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ, (B2) αναγωγή και (B3) οξειδώσιμο. Αν και δεν περιγράφεται στις προδιαγραφές της BCR, προστέθηκε το υπολειμματικό στάδιο (BRF) (εκχύλιση με Aqua regia) για τον υπολογισμό της επί της εκατό ανάκτησης της μεθόδου (Recovery %) καθώς και για να διερευνηθεί η

σχέση του As που εκχυλίζεται στο υπολειμματικό στάδιο με τις ιδιότητες του εδάφους.

5.2.2 Κλασμάτωση του As με τη μέθοδο Wenzel

Σύμφωνα με τον Πίνακα 8, η μέση τιμή της ανάκτησης (Recovery %) της μεθόδου Wenzel ήταν 96.7%. Τα ποσοστά της συγκέντρωσης του As (μέσες τιμές) στα διάφορα κλάσματα ήταν κατά φθίνουσα σειρά W4> W3> WRF> W2> W1. Μόνο το 0.3% του As απελευθερώθηκε στο πρώτο κλάσμα W1 (μη ειδικώς προσροφημένο), υποδηλώνοντας ότι η διαθεσιμότητα του As στα υπό μελέτη εδάφη είναι πολύ χαμηλή. Εντούτοις, η μέση συγκέντρωση του As που εκχυλίστηκε στο W1 ήταν 1.73 mg kg⁻¹, σημαντικά μεγαλύτερη από την τιμή των 0.62 mg kg⁻¹ για την προστασία του γλυκού νερού, που προτάθηκε από τους Wenzel et al. (2002) ως ανώτατο όριο της συγκέντρωσης του As στο κλάσμα W1. Το αρσενικό που εκχυλίστηκε στο κλάσμα W1 συσχετίστηκε σε μεγάλο βαθμό με τον διαθέσιμο φώσφορο (Πίνακας 9), υποδεικνύοντας παρόμοια γεωχημική συμπεριφορά των As και P όσον αφορά τη διαθεσιμότητα τους στα υπό μελέτη εδάφη.

Το ποσοστό του ειδικώς προσροφημένου As (σύμπλοκα εσωτερικής στιβάδας, κλάσμα W2) ήταν χαμηλό (7.1%) αλλά όχι αμελητέο. Το αρσενικό που εκχυλίστηκε στο κλάσμα W2 συσχετίστηκε σημαντικά τόσο με την περιεκτικότητα σε άργιλο όσο και με τον διαθέσιμο P (Πίνακας 9), υποδηλώνοντας ότι τα οξυ-ανιόντα του As σχηματίζουν σύμπλοκα εσωτερικής στιβάδας με τα ανόργανα κolloειδή του εδάφους και ότι το As που εκχυλίζεται σε αυτό το στάδιο και ο P προέρχονται από τις ίδιες «δεξαμενές» στα υπό μελέτη εδάφη. Θεωρώντας ότι η βάση του δεύτερου σταδίου της μεθόδου Wenzel είναι η αντικατάσταση μεταξύ των φωσφορικών (PO₄³⁻) και των

αρσενικικών (AsO_4^{3-}) στις επιφάνειες των κολλοειδών, η ποσότητα και ο τύπος των ανόργανων κολλοειδών στα εδάφη παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοδιαθεσιμότητα του αρσενικού, δεδομένου ότι οποιαδήποτε προσθήκη PO_4^{3-} (π.χ. μέσω της φωσφορικής λίπανσης) μπορεί να αυξήσει την κινητικότητα του As στο εδαφικό σύστημα.

Πίνακας 8. Περιγραφικά στατιστικά των συγκεντρώσεων του As στα εδαφικά κλάσματα σύμφωνα με τη μέθοδο Wenzel (n = 29, mg kg⁻¹).

| | W1 | W2 | W3 | W4 | WRF | Sum* | Total ** | Recovery % | W1% | W2% | W3% | W4% | WRF% |
|--------|-------|------|-------|-------|-------|--------|-------------|---------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Mean | 2.8 | 64 | 364 | 419 | 428 | 1277 | 1415 | 96.7 | 0.3 | 7.1 | 30.1 | 33.3 | 29.1 |
| ± Sd | ± 3.1 | ± 49 | ± 288 | ± 406 | ± 525 | ± 1115 | ± 1305 | ± 13.1 | ± 0.3 | ± 4.7 | ± 9.8 | ± 7.4 | ± 12.6 |
| CV % | 111 | 76 | 79 | 97 | 123 | 87 | 92 | 13.5 | 93.9 | 66.2 | 32.5 | 22.3 | 43.3 |
| Median | 1.7 | 47 | 247 | 278 | 170 | 802 | 921 | 92.5 | 0.2 | 6.9 | 31.2 | 31.3 | 27.3 |
| Min. | 0.2 | 10 | 68 | 75 | 51 | 221 | 204 | 73.7 | 0.0 | 0.5 | 10.6 | 18.1 | 11.2 |
| Max. | 15 | 223 | 1050 | 1791 | 2185 | 4735 | 5001 | 124.0 | 1.3 | 19.3 | 48.3 | 48.6 | 63.3 |

W1, W2, W3, W4, WRF: μη ειδικώς προσροφημένο, ειδικώς προσροφημένο, συνδεδεμένο με άμορφα και ασθενώς κρυσταλλικά οξείδια του Fe, Mn, Al, συνδεδεμένο με κρυσταλλικά οξείδια του Fe, Mn, Al, υπολειμματικό

Mean=Μέσος, Median=Διάμεσος Min.=Ελάχιστο, Max.=Μέγιστο Sd=Τυπική απόκλιση CV%=Συντελεστής μεταβλητότητας.

* W1 + W2 + W3 + W4 + WRF

** υγρή καύση με Aqua regia

Το αρσενικό συνδέθηκε κυρίως με τις αναγωγικές φάσεις, αφού το 30.1% και το 33.3% του ολικού As εκχυλίστηκαν στα κλάσματα W3 και W4, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ισχυρή σχέση του As με τα οξείδια του Fe κυρίως, αλλά και με τα οξείδια των Mn και Al στα εδάφη που μελετήθηκαν. Όπως έχει αναφερθεί σε διάφορες μελέτες (Dybowska et al. 2005; Müller et al. 2007), το ρυθμιστικό διάλυμα οξαλικού αμμωνίου που χρησιμοποιείται στη μέθοδο Wenzel, εκχυλίζει επαρκώς το As που σχετίζεται με τα άμορφα οξείδια. Η προσθήκη ασκορβικού οξέος στο ρυθμιστικό διάλυμα αυξάνει το δυναμικό αναγωγής του εκχυλιστικού μέσου που οδηγεί στην αποτελεσματική διαλυτοποίηση των κρυσταλλικών οξειδίων (Shuman 1982). Πράγματι, το As που εκχυλίστηκε στα κλάσματα W3 και W4 συσχετίστηκε σημαντικά με τα άμορφα (Fed) και ελεύθερα (Fed) οξείδια του Fe (Πίνακας 9). Εντούτοις, το As που εκχυλίστηκε στο κλάσμα W4, συσχετίστηκε θετικά αλλά όχι στατιστικώς σημαντικά με τα κρυσταλλικά οξείδια του Fe (Fed-Feo), υποδεικνύοντας ότι το ρυθμιστικό διάλυμα οξαλικού αμμωνίου που χρησιμοποιήθηκε στο τρίτο στάδιο κινητοποίησε επαρκώς το As από τα άμορφα οξείδια του Fe αλλά η προσθήκη ασκορβικού οξέος στο τέταρτο βήμα, αν και αύξησε σημαντικά το αναγωγικό δυναμικό του οξαλικού αμμωνίου, πέτυχε μερικώς να εκχυλίσει το As από τα κρυσταλλικά οξείδια του Fe.

Το ποσοστό του αρσενικού που εκχυλίστηκε στην υπολειμματική φάση ήταν 29.1% της ολικής συγκέντρωσης. Το υπολειμματικό As συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά και θετικά με εκείνο που εκχυλίστηκε στα κλάσματα W3 και W4 (Πίνακας 9), υποδεικνύοντας κοινή προέλευση του As που εκχυλίζεται στα κλάσματα W3, W4 και WRF. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τους Alvarez et al. (2006), οι οποίοι αναφέρουν ότι η αποσάθρωση των θειούχων ορυκτών μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό σύνθετων συμπλόκων φάσεων που περιέχουν As, όπως τα οξείδια του

σιδήρου, και ο αρσενικός σίδηρος. Επιπλέον, η πολύ χαμηλή συσχέτιση του As με το ανθρακικά άλατα στα υπό εξέταση εδάφη, καταδεικνύεται σαφώς από την ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ του υπολειμματικού σταδίου WRF και του ολικού και ενεργού ανθρακικού ασβεστίου (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Πίνακας συντελεστών συσχέτισης μεταξύ των μορφών του As σύμφωνα με τις μεθόδους Wenzel και BCR και των εδαφικών ιδιοτήτων (n = 29).

| | Clay | pH | TCaCO ₃ | ACaCO ₃ | OM | CEC | P | Fed | Feo | Fed-Feo | W1 | W2 | W3 | W4 | WRF | B1 | B2 | B3 | BRF | Total As | |
|--------------------|----------------|---------------|--------------------|--------------------|-------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------|--|
| Clay | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH | 0.41* | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TCaCO ₃ | -0.24 | 0.15 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ACaCO ₃ | 0.15 | 0.51** | 0.74*** | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| OM | -0.16 | -0.34 | 0.05 | -0.23 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CEC | 0.77*** | 0.22 | -0.22 | -0.01 | 0.36 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| P | 0.22 | -0.02 | -0.31 | -0.07 | -0.10 | 0.29 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Fed | 0.45* | -0.10 | -0.61*** | -0.47* | -0.13 | 0.32 | 0.18 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | |
| Feo | -0.02 | 0.11 | -0.08 | 0.10 | -0.02 | -0.02 | 0.10 | 0.21 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| Fed-Feo | 0.45* | -0.16 | -0.56** | -0.51** | -0.12 | 0.33 | 0.13 | 0.88*** | -0.28 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| W1 | 0.35 | 0.12 | -0.18 | 0.14 | -0.04 | 0.32 | 0.70*** | 0.09 | 0.18 | 0.01 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| W2 | 0.43* | 0.15 | -0.23 | 0.12 | -0.08 | 0.44* | 0.55** | 0.36 | 0.48** | 0.12 | 0.76*** | 1.00 | | | | | | | | | |
| W3 | -0.25 | -0.36 | -0.34 | -0.29 | -0.02 | -0.22 | 0.35 | 0.26 | 0.56** | -0.02 | 0.19 | 0.39* | 1.00 | | | | | | | | |
| W4 | -0.12 | -0.36 | -0.48** | -0.49** | -0.14 | -0.22 | 0.30 | 0.45* | 0.22 | 0.34 | -0.06 | 0.07 | 0.65*** | 1.00 | | | | | | | |
| WRF | -0.30 | -0.46* | -0.39* | -0.48** | -0.23 | -0.40* | 0.31 | 0.22 | 0.03 | 0.20 | -0.10 | -0.16 | 0.64*** | 0.86*** | 1.00 | | | | | | |
| B1 | 0.08 | -0.07 | -0.21 | 0.03 | -0.06 | 0.13 | 0.85*** | -0.04 | 0.06 | -0.07 | 0.76*** | 0.56** | 0.34 | 0.12 | 0.17 | 1.00 | | | | | |
| B2 | -0.12 | -0.16 | -0.46* | -0.41* | -0.02 | -0.13 | 0.50** | 0.34 | 0.32 | 0.18 | 0.20 | 0.29 | 0.63*** | 0.84*** | 0.65*** | 0.35 | 1.00 | | | | |
| B3 | -0.28 | -0.30 | -0.13 | -0.17 | -0.04 | -0.31 | 0.43* | 0.10 | 0.33 | -0.07 | 0.17 | 0.22 | 0.77*** | 0.71*** | 0.69*** | 0.43* | 0.73*** | 1.00 | | | |
| BRF | -0.24 | -0.43* | -0.46* | -0.49** | -0.21 | -0.32 | 0.39* | 0.36 | 0.20 | 0.26 | -0.01 | 0.03 | 0.73*** | 0.93*** | 0.96*** | 0.24 | 0.77*** | 0.77*** | 1.00 | | |
| Total As | -0.21 | -0.38* | -0.47* | -0.48** | -0.16 | -0.28 | 0.41* | 0.35 | 0.26 | 0.22 | 0.04 | 0.11 | 0.77*** | 0.96*** | 0.92*** | 0.27 | 0.87*** | 0.80*** | 0.98*** | 1.00 | |

* p<0.05 ** p< 0.01 *** p< 0.001, Clay=Άργιλος, Silt=ΐλς, Sand=Άμμος, pH=Ενεργός οξύτητα, CaCO₃=Ισοδύναμο Ανθρακικό Ασβέστιο, Act.CaCO₃=Ενεργό Ανθρακικό Ασβέστιο, OM=Οργανική Ουσία, CEC=Ικανότητα Ανταλλαγής Κατιόντων, P Olsen=Αφομοιώσιμος Φόσφορος, Fed=Ελεύθερα οξείδια του σιδήρου, Feo=Άμορφα οξείδια του σιδήρου

5.2.3 Κλασμάτωση του As με τη μέθοδο BCR

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της BCR, ο μέσος όρος του ποσοστού ανάκτησης (Recovery %) ήταν 90.2% (Πίνακας 10). Το αρσενικό βρέθηκε να σχετίζεται κυρίως με το υπολειμματικό κλάσμα (78.4%) και ακολούθως από το αναγώγιμο κλάσμα (16.2%). Μόνο ένα μικρό μέρος της ολικής συγκέντρωσης του As εκχυλίστηκε στο οξειδώσιμο B3 (3.8%) και ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ B1 κλάσμα (1.6%).

Το αρσενικό που εκχυλίζεται στο στάδιο B1 θεωρείται ως ανταλλάξιμο / ασθενώς δεσμευμένο στα ανθρακικά άλατα. Σύμφωνα με τους Larios et al. (2012), το ανθρακικό ασβέστιο μπορεί να παράσχει θέσεις προσρόφησης για το As καθώς επίσης ότι το As μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα κατιόντα του Ca^{2+} σχηματίζοντας σύμπλοκα εξωτερικής στιβάδας. Σε ορισμένες μεθόδους κλασμάτωσης ειδικά αναπτυγμένες για το As, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα οξικού οξέος για την εκχύλιση του As από τα ανθρακικά άλατα αλλά απέτυχαν να αποσπάσουν αξιόλογες ποσότητες (Kim et al. 2003; Matera et al. 2003). Στη παρούσα μελέτη, δεν βρέθηκε σημαντική σχέση μεταξύ του As που εκχυλίστηκε στο στάδιο B1 και της περιεκτικότητας του εδάφους σε ανθρακικά (Πίνακας 9). Αποτελέσματα μελετών που αφορούν τη σχέση του αρσενικού με τα ανθρακικά άλατα είναι αντιφατικά (Yolcubal and Akyol 2008). Αν και το αρσενικό μπορεί να συν-καθιζήσει με τα ανθρακικά άλατα ή να ενσωματωθεί στο πλέγμα του ανθρακικού ασβεστίου σε αλκαλικό pH (Alexandratos et al. 2007), φαίνεται ότι ο ασβεστίτης έχει αμελητέο ρόλο στην ακινητοποίηση του As υπό την παρουσία οξυ - υδροξειδίων του Fe ακόμη και σε πολύ ρυπασμένα εδάφη (Wenzel et al. 1998; Lombi et al. 2000; Wenzel et al. 2001).

Το αρσενικό που εκχυλίστηκε στο στάδιο B1 της μεθόδου BCR συσχετίστηκε ισχυρά με τα επίπεδα του διαθέσιμου φωσφόρου στο έδαφος (Πίνακας 9), υποδεικνύοντας έως ένα βαθμό ότι μπορεί να προέρχονται από την ίδια «δεξαμενή» στα υπό μελέτη εδάφη.

Σημαντικοί περιορισμοί της μεθόδου BCR είναι κατά πρώτον ότι υποεκτιμά τη σύνδεση του As με τα οξείδια και κατά δεύτερον ότι δεν κάνει διάκριση μεταξύ των άμορφων και κρυσταλλικών οξειδίων. Είναι γνωστό ότι η υδροχλωρική υδροξυλαμίνη έχει χαμηλή αποτελεσματικότητα διάλυσης των καλώς κρυσταλλωμένων οξειδίων και ως εκ τούτου διαλύει μόνο τα άμορφα οξείδια του Fe και Mn (Rodriguez et al. 2003; Larios et al. 2013). Εντούτοις, λαμβάνοντας υπόψη ότι το As που εκχυλίστηκε στο στάδιο B2 (16.2%) αντιπροσωπεύει σχεδόν το ήμισυ του αρσενικού που εκχυλίστηκε από τα άμορφα οξείδια στο κλάσμα W3 (30.1%) της μεθόδου Wenzel, η υδροχλωρική υδροξυλαμίνη όχι μόνο αποτυγχάνει να εκχυλίσει το As από τα κρυσταλλικά οξείδια αλλά απέτυχε επίσης να απελευθερώσει επαρκώς το As και από τα άμορφα οξείδια στα υπό μελέτη εδάφη. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από τις θετικές αλλά μη σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των Feo και Fed με το As που εκχυλίζεται στο αναγωγίμο στάδιο της μεθόδου BCR (Πίνακας 9). Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του κλάσματος B2 και του ολικού και ενεργού ανθρακικού ασβεστίου υποδηλώνει έναν πιθανό ανταγωνισμό μεταξύ όξινων ανθρακικών ιόντων και οξυανιόντων του As για τις θέσεις προσρόφησης στα οξείδια του Fe.

Πίνακας 10. Περιγραφικά στατιστικά των συγκεντρώσεων του As στα εδαφικά κλάσματα σύμφωνα με τη μέθοδο BCR (n = 29, mg kg⁻¹).

| | B1 | B2 | B3 | BRF | Sum* | Total ** | Recovery % | B1% | B2% | B3% | BRF% |
|-----------|------------|--------------|------------|--------------|----------------|----------------|----------------|--------------|---------------|--------------|----------------|
| Mean ± Sd | 14 ± 14 | 228 ± 259 | 46 ± 45 | 943 ± 834 | 1231 ± 1087 | 1415 ± 1305 | 90.2 ± 10.2 | 1.6 ± 1.2 | 16.2 ± 9.6 | 3.8 ± 1.8 | 78.4 ± 10.5 |
| CV % | 106 | 114 | 98 | 88 | 88 | 92 | 11.3 | 77.3 | 59.0 | 46.9 | 13.4 |
| Median | 8.2 | 111 | 33 | 650 | 826 | 921 | 88.9 | 1.3 | 13.0 | 4.0 | 80.2 |
| Min. | 1.4 | 8.3 | 3.1 | 136 | 163 | 204 | 73.0 | 0.1 | 1.2 | 0.5 | 55.6 |
| Max. | 68 | 1209 | 186 | 3206 | 4195 | 5001 | 111.9 | 4.1 | 36.1 | 8.8 | 98.1 |

Mean=Μέσος, Median=Διάμεσος Min.=Ελάχιστο, Max.=Μέγιστο SD=Τυπική απόκλιση CV%=Συντελεστής μεταβλητότητας.

B1, B2, B3, BRF: ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ, αναγωγίμο, οξειδώσιμο και υπολειμματικό στάδιο

* B1 + B2 + B3 + BRF

** υγρή καύση με Aqua regia

Με την οξειδωση της οργανικής ουσίας από το υπεροξείδιο του υδρογόνου στο τρίτο στάδιο B3 της BCR, απελευθερώνεται το As που συνδέεται με την οργανική ουσία αλλά και με θειούχα ορυκτά (σουλφίδια) (Quevauviller 2002; Dybowska et al. 2005; Larios et al. 2012). Το χαμηλό ποσοστό του As που βρέθηκε στο στάδιο B3 δείχνει την ασθενή τάση του As να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με τα οργανικά συστατικά του εδάφους (Πίνακας 10). Πράγματι, η συγκέντρωση του As στο οξειδώσιμο κλάσμα (B3) της μεθόδου BCR δεν συσχετίστηκε με την περιεκτικότητα σε οργανική ουσία των υπό μελέτη εδαφών (Πίνακας 9), υποδηλώνοντας ότι το As που εκχυλίστηκε σε αυτό το στάδιο ήταν συνδεδεμένο κυρίως με τα σουλφίδια. Οι Dybowska et al. (2005) συμπεριέλαβαν ένα οξειδώσιμο στάδιο στη μέθοδο Wenzel και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ποσότητα του As που εκχυλίζεται σε αυτό το στάδιο πιθανότατα προερχόταν από τη διάλυση των σουλφιδίων. Παρόλα αυτά, μερικές μελέτες αναφέρουν ισχυρούς θετικούς συσχετισμούς μεταξύ των διαλυμένων οργανικών ενώσεων (DOC) και της συγκέντρωσης του As σε εδαφικά διαλύματα, υποδεικνύοντας ότι η οργανική ουσία μπορεί να παράσχει θέσεις προσρόφησης για το As (Thanabalasingam and Pickering 1986; Buschmann et al. 2006). Αντιθέτως, άλλοι συγγραφείς αναφέρουν ότι λόγω της ανιονικής φύσης των οργανικών ενώσεων που ανταγωνίζονται με τα οξυ-ανιόντα του As για τις θέσεις προσρόφησης στα οξείδια / υδροξείδια του Fe, οι αυξημένες συγκεντρώσεις σε οργανική ουσία (SOM, Soil Organic Matter) και διαλυμένο οργανικό άνθρακα (DOC, Dissolved Organic Carbon) οδήγησαν στην αύξηση της διαθεσιμότητας του As στο έδαφος (Redman et al. 2002; Wenzel et al. 2002).

Στα υπό μελέτη εδάφη και στην ίδια γραμμή με τους Müller et al. (2007), Larios et al. (2012) και Abad-Valle et al. (2018), το μεγαλύτερο μέρος του As (78%) βρέθηκε στο υπολειμματικό κλάσμα (BRF) υποδηλώνοντας ότι η ποσότητα του As

που δεν εκχυλίστηκε από την υδροχλωρική υδροξυλαμίνη στην αναγώγιμη φάση, ενσωματώθηκε στο οξειδώσιμο (B3) και στο υπολειμματικό (BRF) κλάσμα της μεθόδου BCR. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο Wenzel, η συγκέντρωση του As που εκχυλίστηκε στο στάδιο BRF συσχετίστηκε έντονα με εκείνη που εκχυλίστηκε στα στάδια B2 και B3 (Πίνακας 9), γεγονός που δείχνει την κοινή προέλευση του As που είναι προσδεμένο σε αυτά τα κλάσματα.

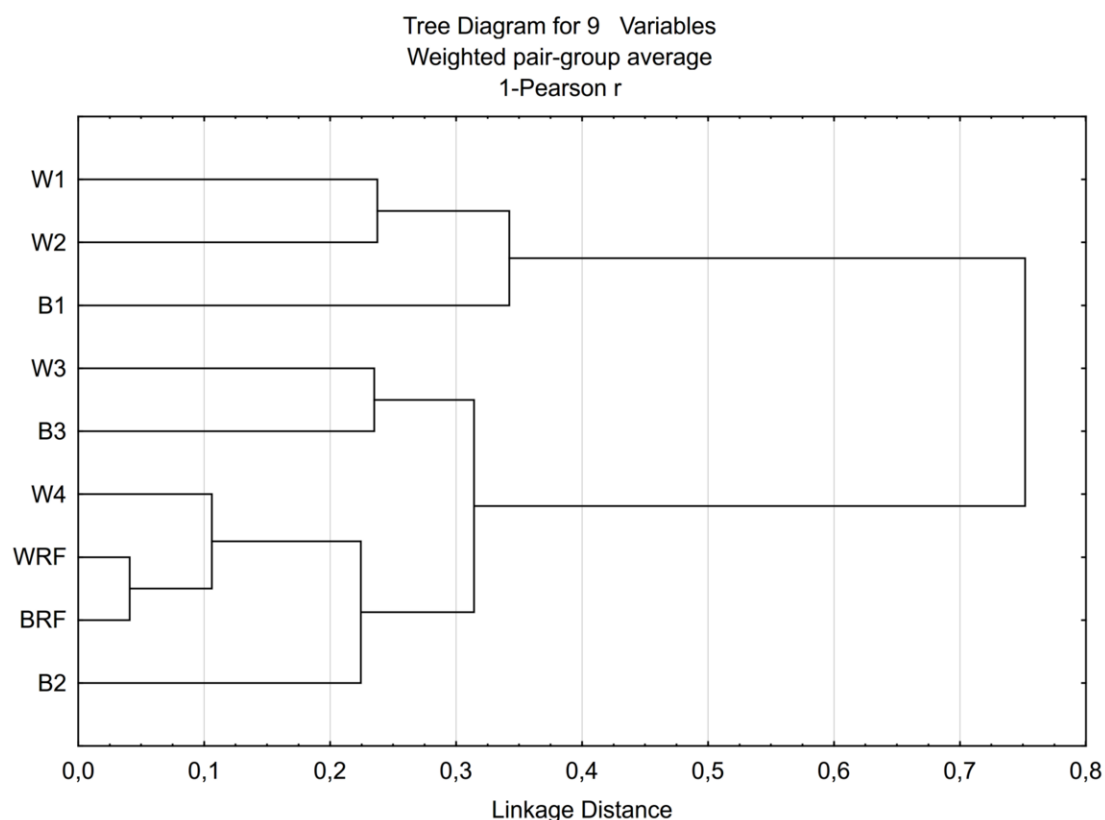
Για τα έντονα ρυπασμένα εδάφη της μελέτης αυτής, τα αποτελέσματα της μεθόδου BCR δεν έδειξαν σχέσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων του As που εκχυλίστηκαν στα διάφορα στάδια της μεθόδου και των συστατικών του εδάφους που θεωρούνται ως τα πιο σημαντικά για την συγκράτηση του As σε ρυπασμένα εδάφη.

5.2.4 Ανάλυση κατά συστάδες (*Cluster analysis*)

Για να διευκρινιστούν καλύτερα οι πιθανές σχέσεις μεταξύ των σταδίων κλασμάτωσης του As με τις μεθόδους Wenzel και BCR, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά συστάδες (*Cluster analysis*) σε κανονικοποιημένες (*Normalized*) τιμές. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4, παρατηρήθηκαν δύο κύριες ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τα στάδια W1, W2 και B1 ενώ η δεύτερη από όλα τα υπόλοιπα στάδια και των δυο μεθόδων. Οι συσχετίσεις μεταξύ των σταδίων των δύο πρωτοκόλλων δείχνουν ότι τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο BCR κατάφεραν εν μέρει να εκχυλίσουν το As από τις στοχευμένες φάσεις του εδάφους. Η σημαντική σχέση μεταξύ των σταδίων B3 και W3 στη δεύτερη ομάδα συνεπάγεται ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) που χρησιμοποιείται στη μέθοδο BCR για την εκχύλιση του As που είναι δεσμευμένο στην οργανική ουσία και στα σουλφίδια, μπορεί επίσης να έχει εκχυλίσει As από τα οξείδια του Fe που

συνδέονται με φάσεις του Mn (Larios et al. 2012). Επιπλέον, αν και τα υπολειμματικά κλάσματα BRF και WRF βρέθηκαν να συσχετίζονται ισχυρά, η συγκέντρωση του As στο στάδιο BRF της μεθόδου BCR ήταν 2.5 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση As στο στάδιο WRF της μεθόδου Wenzel (BRF: 78.4%, WRF: 29.1%), υπογραμμίζοντας την ατελή διαλυτοποίηση των οξειδίων του Fe από την υδροχλωρική υδροξυλαμίνη.

Σχήμα 4. Ιεραρχικό δενδρόγραμμα των σταδίων κλασμάτωσης του As σύμφωνα με τη μέθοδο Wenzel (W1, W2, W3, W4, WRF: μη ειδικώς προσροφημένο, ειδικώς προσροφημένο, συνδεδεμένο με άμορφα και ασθενώς κρυσταλλικά οξείδια του Fe, Mn, Al, συνδεδεμένο με κρυσταλλικά οξείδια του Fe, Mn, Al, υπολειμματικό) και BCR (B1, B2, B3, BRF: ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ, αναγωγή, οξειδώσιμο, υπολειμματικό στάδιο).



5.3 Μέρος 3^ο – Επίδραση αναγωγικών και χηλικοποιητικών μέσων στην κινητικότητα / διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn σε ρυπασμένο επιφανειακό έδαφος από την ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου

Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων και η συζήτηση που ακολουθεί, αναφέρεται στο πειραματικό μέρος που περιγράφεται στη Σελίδα 56 και αποτελεί το 3^ο υπό κρίση άρθρο του Παραρτήματος.

5.3.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα των επωάσεων

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που συλλέχθηκε από την περιοχή Θορικός, στην ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου, για την διενέργεια του πειράματος των επωάσεων, εμφανίζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα των επωάσεων.

| Clay g kg ⁻¹ | Silt g kg ⁻¹ | Sand g kg ⁻¹ | pH (1:1) | eq. CaCO ₃ g kg ⁻¹ | OM g kg ⁻¹ | CEC cmol _c kg ⁻¹ | Total* As mg kg ⁻¹ | Total* Pb mg kg ⁻¹ | Total* Zn mg kg ⁻¹ |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 219 | 274 | 507 | 7,64 | 74 | 47 | 19 | 727 | 5925 | 5575 |

*υγρή καύση με Aqua regia, Clay=Άργιλος, Silt=Ίλύς, Sand=Άμμος, pH=Ενεργός οξύτητα, eq.CaCO₃=Ισοδύναμο Ανθρακικό Ασβέστιο, OM=Οργανική Ουσία, CEC=Ικανότητα Ανταλλαγής Κατιόντων

5.3.2 Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) των αποτελεσμάτων της επίδρασης του χρόνου επώασης και των μεταχειρίσεων στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn.

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 12, ο χρόνος επώασης και οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν επηρέασαν σημαντικά τις διαθέσιμες συγκεντρώσεις των As, Pb και Zn. Επιπλέον, μεταξύ των δύο παραγόντων (χρόνος / μεταχείριση) παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση για όλα τα στοιχεία που μελετήθηκαν και συνεπώς οι κύριες επιδράσεις του χρόνου και των μεταχειρίσεων στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn συζητήθηκαν ξεχωριστά.

Πίνακας 12. Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA). Επίδραση του χρόνου επώασης και των μεταχειρίσεων στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn.

| | SS | DF | MS | F | p |
|--------------------|-------|----|-------|--------|-------|
| As | | | | | |
| Χρόνος | 203E2 | 6 | 3376. | 109.7 | 0.000 |
| Μεταχείριση | 306E2 | 7 | 4374. | 142.2 | 0.000 |
| Χρόνος*Μεταχείριση | 228E2 | 42 | 542. | 17.6 | 0.000 |
| Pb | | | | | |
| Χρόνος | 961E3 | 6 | 160E3 | 42.0 | 0.000 |
| Μεταχείριση | 251E6 | 7 | 358E5 | 9314.0 | 0.000 |
| Χρόνος*Μεταχείριση | 811E3 | 42 | 193E2 | 5.0 | 0.000 |
| Zn | | | | | |
| Χρόνος | 618E3 | 6 | 103E3 | 16.6 | 0.000 |
| Μεταχείριση | 750E4 | 7 | 107E4 | 172.9 | 0.000 |
| Χρόνος*Μεταχείριση | 491E3 | 42 | 117E2 | 1.9 | 0.003 |

SS = sum of squares

DF = degrees of freedom

MS = mean square

F = F-statistic

p = p-value

5.3.3 Επίδραση του χρόνου επώασης και των μεταχειρίσεων στην διαθεσιμότητα των As, Pb, και Zn.

Ανεξάρτητα από το χρόνο επώασης, η επίδραση των μεταχειρίσεων στη διαθεσιμότητα των υπό μελέτη στοιχείων ήταν σχεδόν ίδια για τα Pb και Zn, ενώ παρατηρήθηκε ένα ελαφρώς διαφορετικό μοτίβο για το As (Σχήμα 5 a, c, e). Η μέγιστη διαθεσιμότητα του As, κατά μέσο όρο έως 41 mg kg^{-1} , παρατηρήθηκε με την εφαρμογή του EDTA, ακολουθούμενη από την εφαρμογή E + OMW (μέση τιμή 32 mg kg^{-1}) και E + SD + OMW (μέση τιμή 27 mg kg^{-1}). Η εφαρμογή των OMW, E + SD και SD + OMW οδήγησε στην απελευθέρωση παρόμοιων ποσοτήτων As μέχρι $14\text{-}16 \text{ mg kg}^{-1}$, ενώ οι μεταχειρίσεις SD και DW εμφάνισαν τη χαμηλότερη διαθεσιμότητα του As (μέση τιμή 6 και 8 mg kg^{-1} , αντίστοιχα). Οι σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις των Pb και Zn παρατηρήθηκαν με τις μεταχειρίσεις EDTA και E + OMW (μέσες τιμές μέχρι 2532 mg kg^{-1} και 1427 mg kg^{-1} για τον Pb και Zn αντίστοιχα) ακολουθούμενες από τις μεταχειρίσεις E + SD (μέση τιμή 2259 και 1333 mg kg^{-1} για Pb και Zn αντίστοιχα) και E + SD + OMW (μέση τιμή 2388 και 1340 mg kg^{-1} για Pb και Zn, αντίστοιχα) που επέδειξαν παρόμοια επίδραση στη διαθεσιμότητα και των δυο μετάλλων. Οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις είχαν ως αποτέλεσμα πολύ μικρότερη διαθεσιμότητα των Pb και Zn και εμφάνισαν παρόμοια ισχύ στην απελευθέρωση των Pb και Zn από το υπό μελέτη έδαφος.

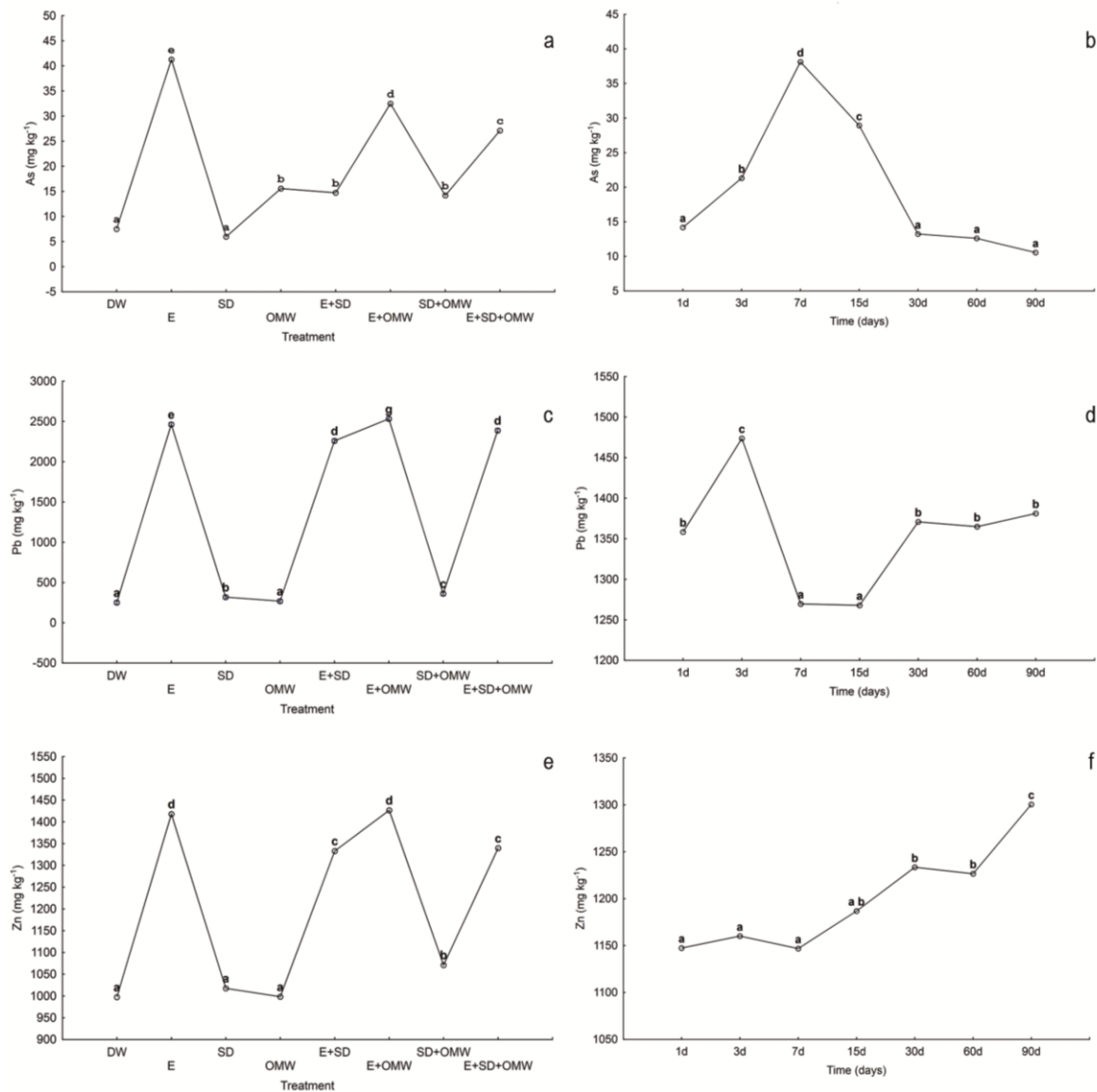
Ο χρόνος επώασης είχε την μεγαλύτερη επίδραση στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn στις 7, 3 και 90 μέρες, αντίστοιχα (Σχήμα 5 b, d, f). Τρία διαφορετικά μοτίβα μπορούν να παρατηρηθούν για τα υπό μελέτη στοιχεία. Η διαθέσιμη συγκέντρωση του αρσενικού αυξήθηκε από την 1 μέρα στις 7 ημέρες και στη συνέχεια μειώθηκε στα αρχικά επίπεδα στις 30 ημέρες, παραμένοντας στη συνέχεια

σχετικά σταθερή. Φαίνεται ότι μετά από 7 ημέρες επώασης, το As άρχισε να επαναπροσροφάται σταδιακά στις στερεές φάσεις του εδάφους, υποδεικνύοντας ότι το As που απελευθερώνεται από τις εφαρμοζόμενες μεταχειρίσεις μεταβαίνει σε πιο σταθερές μορφές σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Η επίδραση του χρόνου επώασης στη διαθεσιμότητα του Pb ακολούθησε διαφορετικό μοτίβο. Η παρατηρούμενη υψηλότερη διαθεσιμότητα του Pb στις 3 ημέρες συνοδεύτηκε από απότομη πτώση στις 7 ημέρες, σε επίπεδα σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα της 1 ημέρας. Η παρατηρούμενη χαμηλότερη διαθεσιμότητα του Pb παρέμεινε μέχρι τις 15 ημέρες, αυξήθηκε και πάλι στις 30 ημέρες φθάνοντας στα επίπεδα των αρχικών συγκεντρώσεων της 1 ημέρας και στη συνέχεια παρέμεινε σχεδόν σταθερή μέχρι τις 90 ημέρες χωρίς καμία σημαντική διακύμανση. Όσον αφορά τον Zn, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στην κινητικότητα του έως τις 7 ημέρες. Στη συνέχεια, αυτή η υστέρηση μειώθηκε σταδιακά και η συγκέντρωση του διαθέσιμου Zn αυξήθηκε μέχρι τις 90 ημέρες.

Για την καλύτερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων της επίδρασης των μεταχειρίσεων και του χρόνου στη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn, παράχθηκαν τρία διαγράμματα που δείχνουν τη μεταβολή των κλασμάτων W1 / B1 (τα πιο διαθέσιμα κλάσματα σύμφωνα με τις μεθόδους κλασμάτωσης Wenzel και BCR) των υπό μελέτη στοιχείων για κάθε μεταχείριση και χρονικό διάστημα επώασης (Σχήμα 6). Είναι προφανές ότι για όλους τους χρόνους επώασης, οι μεταχειρίσεις E, E + OMW, E + SD + OMW και E + SD οδήγησαν σε σαφώς αυξημένη διαλυτότητα των Pb και Zn σε σχέση με τις μεταχειρίσεις που δεν περιελάμβαναν EDTA (δηλ. DW, SD, OMW και SD + OMW) (Σχήμα 6 b, c). Ειδικά για τον Pb, οι μεταχειρίσεις που περιελάμβαναν EDTA οδήγησαν σε συγκεντρώσεις διαθέσιμου Pb στο έδαφος που κυμαίνονταν μεταξύ 2100 και 2772 mg kg⁻¹, σημαντικά υψηλότερες από εκείνες που

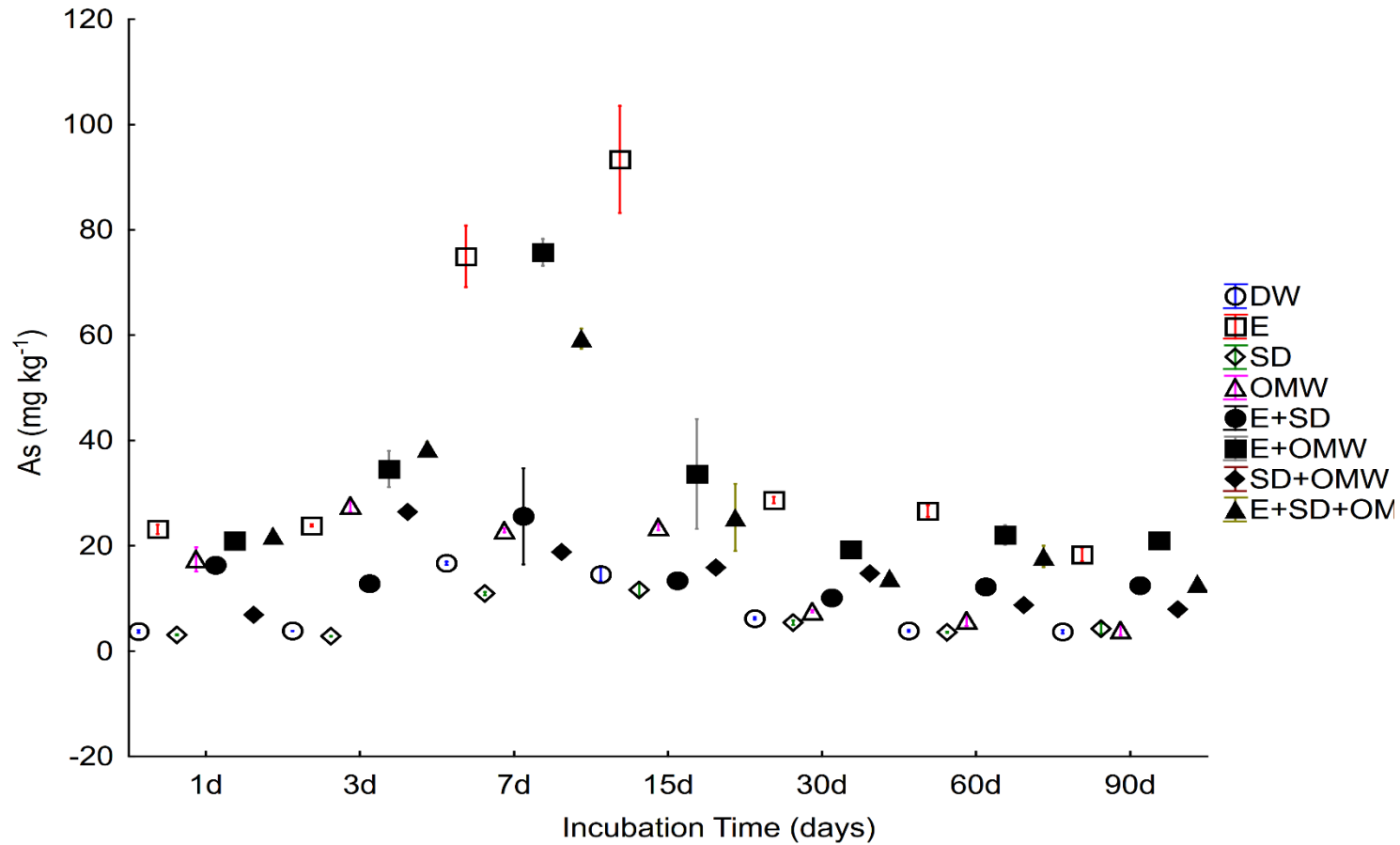
επέδειξαν οι μεταχειρίσεις χωρίς EDTA που κυμαίνονταν μεταξύ 207 και 419 mg kg⁻¹. Για το As, οι μεταχειρίσεις με EDTA επέδειξαν γενικά υψηλότερη ικανότητα εκχύλισης, στατιστικώς σημαντική μόνο για τις μεταχειρίσεις E, E + OMW και E + SD + OMW μετά από 7 και 15 ημέρες επώασης (Σχήμα 6 α).

Σχήμα. 5. Επίδραση του χρόνου (time) και των μεταχειρίσεων (treatment) στις διαθέσιμες συγκεντρώσεις των As (a, b), Pb (c, d), και Zn (e, f). Η ύπαρξη σημαντικών ή μη διαφορών μεταξύ των μέσων ελέγχτηκε με το Tukey HSD test ($\alpha \leq 0.05$). Η παρουσία κοινών γραμμάτων υποδηλώνει μη σημαντική διαφορά.



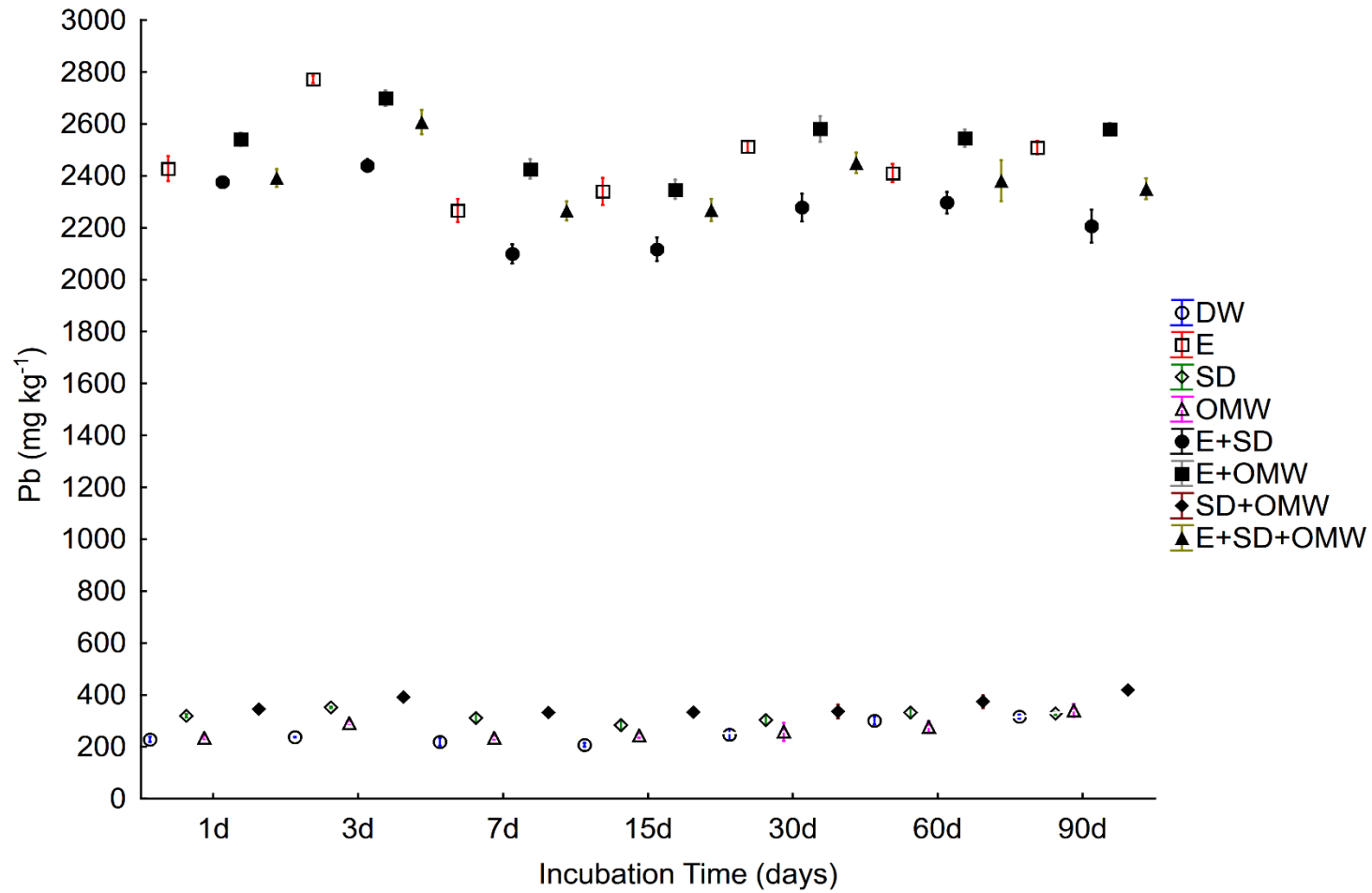
DW=Απιονισμένο νερό, E=EDTA, SD=Διθειονώδες νάτριο, OMW=Υγρά απόβλητα ελαιουργείων

Σχήμα 6. Επίδραση των μεταχειρίσεων επί των διαθέσιμων συγκεντρώσεων (W1 / B1) των As (a), Pb (b) και Zn (c) για όλα τα χρονικά διαστήματα επώασης (incubation time) (παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και το τυπικό σφάλμα με διάστημα εμπιστοσύνης 95%).



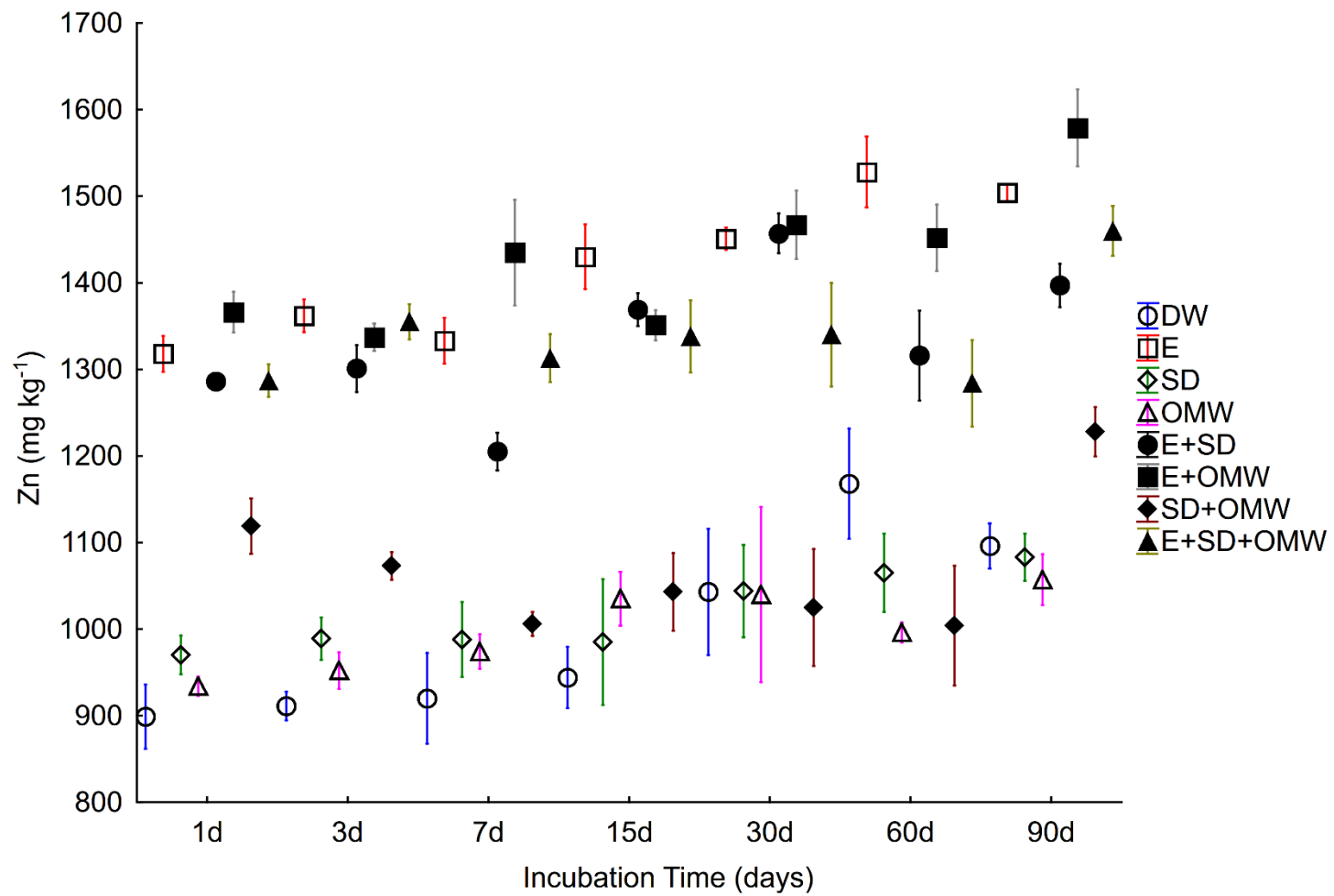
DW=Απιονισμένο νερό, E=EDTA, SD=Διθειονώδες νάτριο, OMW=Υγρά απόβλητα ελαιουργείων

6.b



DW=Απιονισμένο νερό, E=EDTA, SD=Διθειονώδες νάτριο, OMW=Υγρά απόβλητα ελαιουργείων

6.c



DW=Απιονισμένο νερό, E=EDTA, SD=Διθειονώδες νάτριο, OMW=Υγρά απόβλητα ελαιουργείων

Οι μεταχειρίσεις που περιελάμβαναν EDTA οδήγησαν σε υψηλότερες διαθέσιμες συγκεντρώσεις όλων των στοιχείων που μελετήθηκαν (Σχήμα 5 a, c, e). Εξαιτίας της μεγάλης ικανότητας του EDTA να δημιουργεί σύμπλοκα, δρα ως ισχυρός ανταγωνιστής των ενεργών επιφανειών του εδάφους και ως εκ τούτου είναι ικανό να εκχυλίζει βαρέα μέταλλα και μεταλλοειδή από τα διάφορα χημικά κλάσματα του εδάφους, όπως το ανταλλάξιμο, τα ανθρακικά, τα άμορφα οξείδια Fe - Mn και την οργανική ουσία (Manouchehri and Bermond 2009). Πολλοί συγγραφείς επεσήμαναν την αποτελεσματικότητα του EDTA για την κινητοποίηση των As, Pb και Zn σε εδάφη ρυπασμένα με μέταλλα. Οι Meers et al. (2005), μελέτησαν την κινητοποίηση του Zn σε ρυπασμένα με βαρέα μέταλλα ιζήματα που μεταχειρίστηκαν με EDTA και διαπίστωσαν ότι η κινητικότητα του Zn αυξήθηκε σημαντικά. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από τους Abbas και Abdelhafez (2013), οι οποίοι πρόσθεσαν διαφορετικές συγκεντρώσεις EDTA σε ένα ρυπασμένο έδαφος από βιομηχανική περιοχή. Η Mühlbachová (2011), διαπίστωσε ότι η προσθήκη EDTA σε μακροχρόνια ρυπασμένα εδάφη αροτραίων εκτάσεων και λειμώνων, οδήγησε σε αυξημένες ποσότητες εκχυλίσιμου Pb με NH_4NO_3 έως 600 και 122 φορές, αντίστοιχα.

Το διθειονώδες νάτριο χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία ισχυρών αναγωγικών συνθηκών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη διάλυση των οξειδίων του Fe και στην επακόλουθη απελευθέρωση των προσροφημένων σε αυτά As, Pb και Zn. Ωστόσο, σε σύγκριση με το απιονισμένο νερό (DW), το διθειονώδες νάτριο δεν είχε σημαντική επίδραση στη διαθεσιμότητα των υπό μελέτη στοιχείων (Σχήμα 5 a, c, e). Τα φτωχά αποτελέσματα στη διαλυτότητα των As, Pb και Zn από την επίδραση του Διθειονώδους νατρίου κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου, μπορεί να οφείλονται στη μερική διάλυση των οξειδίων του Fe και στην επανα-δημιουργία νέων

ενεργών φάσεων που δέσμευσαν τα αρχικώς απελευθερωθέντα στοιχεία. Όπως υποστηρίζουν οι Kim et al. (2015), η αναγωγική διάλυση των Fe^{3+} - οξειδίων από την επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων Διθειονώδους, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή νέων μορφών Fe^{2+} - οξειδίων δημιουργώντας κατ' αυτόν τον τρόπο νέες επιφάνειες συγκράτησης των μετάλλων. Οι ίδιοι συγγραφείς πρότειναν τη συνδυαστική χρήση του διθειονώδους νατρίου ($Na_2S_2O_4$) με οξαλικό νάτριο ($Na_2C_2O_4$) το οποίο συμπλοκοποιείται ισχυρά με τον Fe με αποτέλεσμα την αναστολή του σχηματισμού νέων οξειδίων του Fe. Η συγκέντρωση των 0.1 M διθειονώδους που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, πιθανώς ήταν αρκετά υψηλή για να προκαλέσει τη διάλυση των οξειδίων του Fe, αλλά η απουσία οποιασδήποτε ουσίας που αναστέλλει το σχηματισμό νέων οξειδίων οδήγησε στην εκ νέου ακινητοποίηση των As, Pb και Zn. Επιπρόσθετα, η παρατηρούμενη χαμηλότερη διαθεσιμότητα του Pb στις 7 και 15 ημέρες από ό, τι στη 1 ημέρα μπορεί να οφείλεται στην επαναπροσρόφηση του Pb σε νέο-σχηματισθείσες ενεργές φάσεις του εδάφους.

Σε σχέση με το απιονισμένο νερό (DW) και το διθειονώδες νάτριο (SD), η μεταχείριση του εδάφους με υγρά απόβλητα ελαιουργείων (OMW) οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερες διαθέσιμες συγκεντρώσεις μόνο για το As (Σχήμα 6 α). Η προσθήκη φρέσκων OMW σε εδάφη μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα των μετάλλων μέσω δύο κύριων μηχανισμών: i) την αναγωγική διάλυση των οξειδίων μετάλλων ως αποτέλεσμα της ανοργανοποίησης της οργανικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς που καταναλώνουν ελεύθερο οξυγόνο και την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων και ii) τον σχηματισμό οργανομεταλλικών συμπλόκων των διαλυτών οργανικών ενώσεων και φαινολών που αναστέλλουν την προσρόφηση των μετάλλων στις στερεές φάσεις του εδάφους (Madrid and Díaz-Barrientos 1998; de la Fuente et al. 2011). Θα ήταν αναμενόμενο λοιπόν να παρατηρείται αυξημένη

διαθεσιμότητα και για τα τρία στοιχεία που μελετήθηκαν και όχι μόνο για το As. Φαίνεται ότι τα OMW δεν διαλυτοποίησαν αποτελεσματικά τα οξείδια μετάλλων στο υπό μελέτη έδαφος και δεν προήγαγαν επαρκώς τον σχηματισμό οργανομεταλλικών συμπλόκων. Παρ' όλα αυτά, αυτό μπορεί να ισχύει για τον Pb και Zn αλλά δεν μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη διαλυτότητα του As με την μεταχείριση OMW. Σε αντίθεση με τον Pb και Zn, το αρσενικό υπάρχει στα εδάφη ως οξυανιόν και επομένως ανταγωνίζεται με τα φωσφορικά ανιόντα για θέσεις προσρόφησης στα εδαφικά κolloειδή (Violante και Pigna 2002). Δεδομένου ότι τα OMW περιέχουν σημαντικές ποσότητες φωσφόρου ($160-310 \text{ mg kg}^{-1}$ κατά μέσο όρο, Pardo et al. 2017), είναι πολύ πιθανό τα φωσφορικά (PO_4^{3-}) που προστέθηκαν στο έδαφος μέσω των OMW να αντικατέστησαν τα αρσενικά ανιόντα (AsO_4^{3-}) στις θέσεις προσρόφησης των κolloειδών του εδάφους και ως εκ τούτου να αυξήθηκε η συγκέντρωση του As στο εδαφικό διάλυμα. Όσον αφορά την επίδραση των OMW στην κινητικότητα των μετάλλων, τα ευρήματα των ερευνών είναι αντιφατικά. Οι de la Fuente et al. (2011) διεξήγαγαν ένα πείραμα με γλάστρες χρησιμοποιώντας ένα αλκαλικό γεωργικό έδαφος με αυξημένες συγκεντρώσεις σε Pb και Zn, και διαπίστωσαν ότι η προσθήκη του υδατοδιαλυτού κλάσματος νωπής ελαιολάσπης δεν είχε σημαντικό αποτέλεσμα στην διαλυτότητα των Pb / Zn. Αντίθετα, οι Romero et al. (2005), αναφέρουν ότι η προσθήκη OMW σε έδαφος επιβαρυνόμενο από εξορυκτικές / μεταλλουργικές δραστηριότητες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυτών μορφών των Pb / Zn μετά από 18 εβδομάδες.

Όπως περιγράφεται στην Σχήμα 5 (a, c, e), η μεταχείριση E + SD οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερες διαθέσιμες συγκεντρώσεις των As, Pb και Zn από το EDTA, υποδεικνύοντας ότι το διθειονώδες νάτριο (SD) περιόρισε την χηλικοποιητική δράση του EDTA. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι Kim et al. (2016) που

παρατήρησαν χαμηλότερη εκχυλιστική ικανότητα του EDTA για το As παρουσία διθειονόδους νατρίου σε συγκεντρώσεις > 0.05 M και σε αλκαλικό pH. Κάτω από ισχυρές αναγωγικές εδαφικές συνθήκες, όπως αυτές της παρούσας μελέτης, μπορεί να προκύψει παραγωγή στοιχειακού και άλλων ανηγμένων χημικών μορφών του θείου λόγω της αυτοδιάλυσης του διθειονόδους που εν συνεχεία μπορεί να ευνοήσει την εκ νέου καθίζηση του As με σουλφιδικές φάσεις (Varadachari et al. 2006). Σε αντίθεση με τη μεταχείριση E + SD, ο συνδυασμός SD + OMW οδήγησε σε ελαφρώς υψηλότερες διαθέσιμες συγκεντρώσεις των Pb και Zn από τα SD και OMW, και του As από το SD, υποδηλώνοντας συνεργιστική δράση μεταξύ του διθειονόδους και των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων. Σε αυτήν την περίπτωση, τα OMW συνεισφέρουν θετικά στην αναγωγική δράση του διθειονόδους, «προσφέροντας» διαλυτές φαινόλες και χαμηλού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις με υψηλή χηλικοποιητική ικανότητα, οι οποίες δημιούργησαν σύμπλοκα με τον Fe που απελευθερώθηκε από τη διάλυση των οξειδίων του Fe, εμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό νέων ενεργών φάσεων και την εκ νέου ακινητοποίηση των As, Pb και Zn. Τέλος, ο συνδυασμός του EDTA και των OMW (E + OMW) μείωσε σημαντικά τη διαθέσιμη συγκέντρωση του As σε σύγκριση με το EDTA μόνο του. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα OMW περιέχουν σημαντικές ποσότητες διαλυτού Ca^{+2} (200 έως 640 mg L^{-1} κατά μέσο όρο, Pardo et al. 2017) και ότι το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο στάδιο (W1) της μεθόδου Wenzel προς εκχύλιση του εύκολα κινητοποιήσιμου As ήταν το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, είναι πολύ πιθανό ένα μέρος των SO_4^{2-} να δημιούργησε αδιάλυτο γύψο με τα ιόντα Ca^{+2} και κατά συνέπεια να μειώθηκε ο αριθμός των θειικών ανιόντων που θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τα αρσενικά στα εδαφικά κolloειδή.

5.3.4 Επίδραση των μεταχειρίσεων στην κλασμάτωση των As, Pb, και Zn.

Για να διερευνηθεί η επίδραση των μεταχειρίσεων στην κατανομή των As, Pb και Zn στις διαφορετικές εδαφικές φάσεις, εφαρμόστηκαν δύο διαδικασίες διαδοχικών εκχυλίσεων (SEPs) στα δείγματα εδάφους μετά από περίοδο επώασης 90 ημερών. Η μέθοδος Wenzel η οποία είναι ειδικά σχεδιασμένη για το As (Wenzel et al. 2001) και η ευρέως αποδεκτή μέθοδος για τα μεταλλικά κατιόντα BCR (Rauret et al. 1999). Για κάθε μεταχείριση, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό του κάθε κλάσματος ως προς το άθροισμα όλων των κλασμάτων (Σχήμα 7).

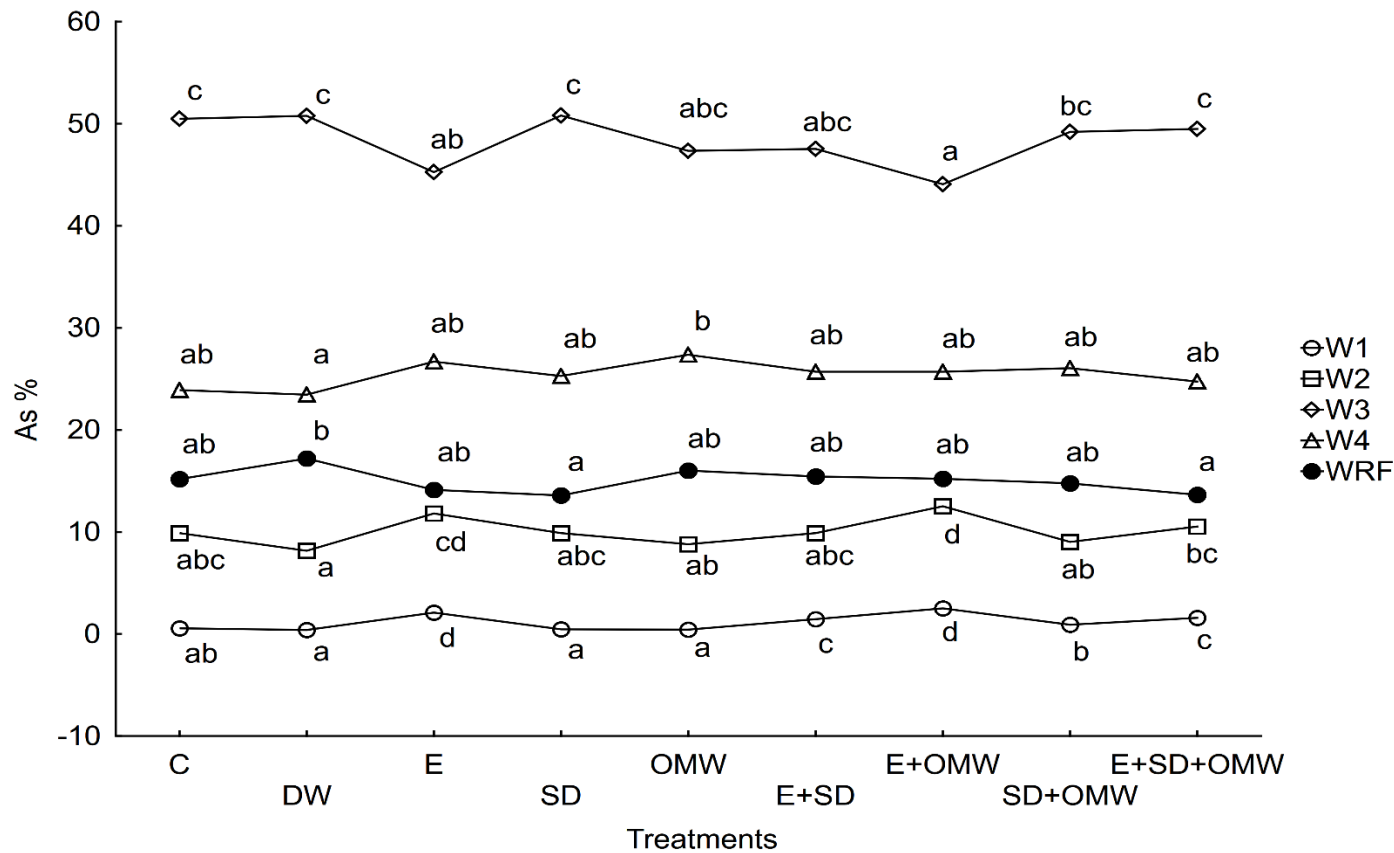
Τόσο στον μάρτυρα όσο και στα εδαφικά δείγματα που επιδέχθηκαν μεταχειρίσεων, και τα οποία επώαστηκαν για 90 ημέρες, το μέσο ποσοστό του As στα διάφορα κλάσματα του εδάφους ήταν σε φθίνουσα σειρά $W3 > W4 > WRF > W2 > W1$ (Σχήμα 7 α). Σε σύγκριση με τον μάρτυρα, το κλάσμα W1 του As αυξήθηκε σημαντικά μετά από 90 ημέρες επώασης σε όλες τις μεταχειρίσεις που περιείχαν EDTA, από 0,6% στον μάρτυρα έως 2.1, 2.5, 1.5 και 1.6% για τις μεταχειρίσεις E, E + OMW, E + SD και E + SD + OMW, αντίστοιχα. Το EDTA μεμονωμένα και το EDTA σε συνδυασμό με τα OMW (E και E+OMW) έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση του κλάσματος W1 του As ενώ αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση των μεταχειρίσεων DW, SD και OMW.

Εκτός από το οξειδώσιμο κλάσμα B3, η επίδραση των μεταχειρίσεων στην κατανομή των Pb και Zn στα διάφορα κλάσματα εδάφους ήταν παρόμοια (Σχήμα 7 b, c). Οι μεταχειρίσεις που περιείχαν EDTA αύξησαν σημαντικά τα ποσοστά των Pb και Zn στο ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ κλάσμα (B1) και αυτό συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση των ποσοστών των δυο μετάλλων στο αναγώγιμο κλάσμα (B2). Ένα διαφορετικό μοτίβο παρατηρήθηκε για το οξειδώσιμο κλάσμα (B3) των

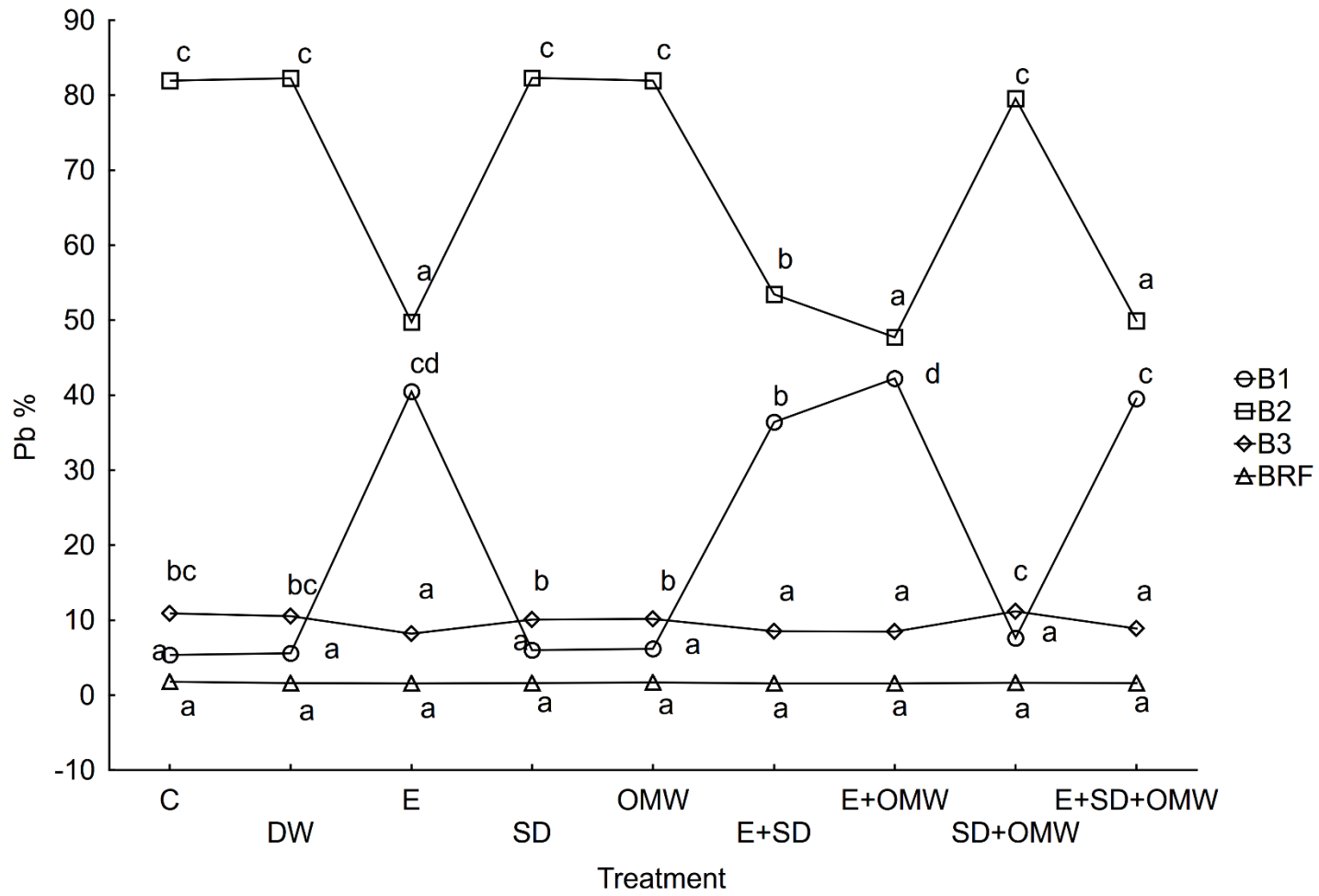
δύο μετάλλων. Για τον Pb, όλες οι μεταχειρίσεις που περιείχαν EDTA είχαν ως αποτέλεσμα μια μικρή αλλά σημαντική μείωση των ποσοστών του μετάλλου που σχετίζονται με το οξειδώσιμο κλάσμα. Συνεπώς, ο Pb που απελευθερώνεται από το κλάσμα B3 μπορεί να συνέβαλε στις αυξημένες συγκεντρώσεις αυτού του μετάλλου στο κλάσμα B1. Σε αντίθεση με τον Pb, οι μεταχειρίσεις E και OMW οδήγησαν σε σημαντική αύξηση του οξειδώσιμου κλάσματος του Zn, ήτοι από 19.8% στον μάρτυρα σε 21.8 και 22.9% αντίστοιχα.

Σε σύγκριση με τον μάρτυρα, το μέσο ποσοστό του As στο κλάσμα W2 (ειδικώς προσροφημένο, σύμπλοκα εσωτερικής στιβάδας) αυξήθηκε σημαντικά μόνο με την μεταχείριση E + OMW (από 9.9% στον μάρτυρα έως 12.5%), γεγονός που δείχνει ότι τα OMW ενίσχυσαν την ικανότητα του EDTA να εκχυλίζει το As από το κλάσμα W2. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μεταχείριση E + OMW αύξησε επίσης σημαντικά το ποσοστό του As στο κλάσμα W1 (Σχήμα 7 α). Η παρατηρούμενη υψηλότερη παρουσία του As στα κλάσματα W1 και W2 μετά από επώαση 90 ημερών συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του As στο κλάσμα W3. Πράγματι, για το κλάσμα W3 που αντιστοιχεί στην εκχύλιση των χημικών μορφών του As από τα άμορφα οξείδια των Fe, Mn και Al, τα ποσοστά του As μειώθηκαν σημαντικά από 50.5% στον μάρτυρα σε 44.1%. Το μεγαλύτερο μέρος του As που απελευθερώθηκε σε αυτό το κλάσμα υπό την επίδραση του EDTA και των OMW βρέθηκε στα κλάσματα W1 και W2, δείχνοντας μια ανακατανομή του As σε κλάσματα του εδάφους που σχετίζονται με πιο κινητικές μορφές του As. Ένα σχεδόν ταυτόσημο μοτίβο κατανομής του As μεταξύ W1, W2 και W3 παρατηρήθηκε και με τη μεταχείριση με EDTA. Η κατανομή του As στα κλάσματα W4 και WRF έδειξε μικρές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων, υποδεικνύοντας ότι όλες οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν δεν κατάφεραν να διαλυτοποιήσουν

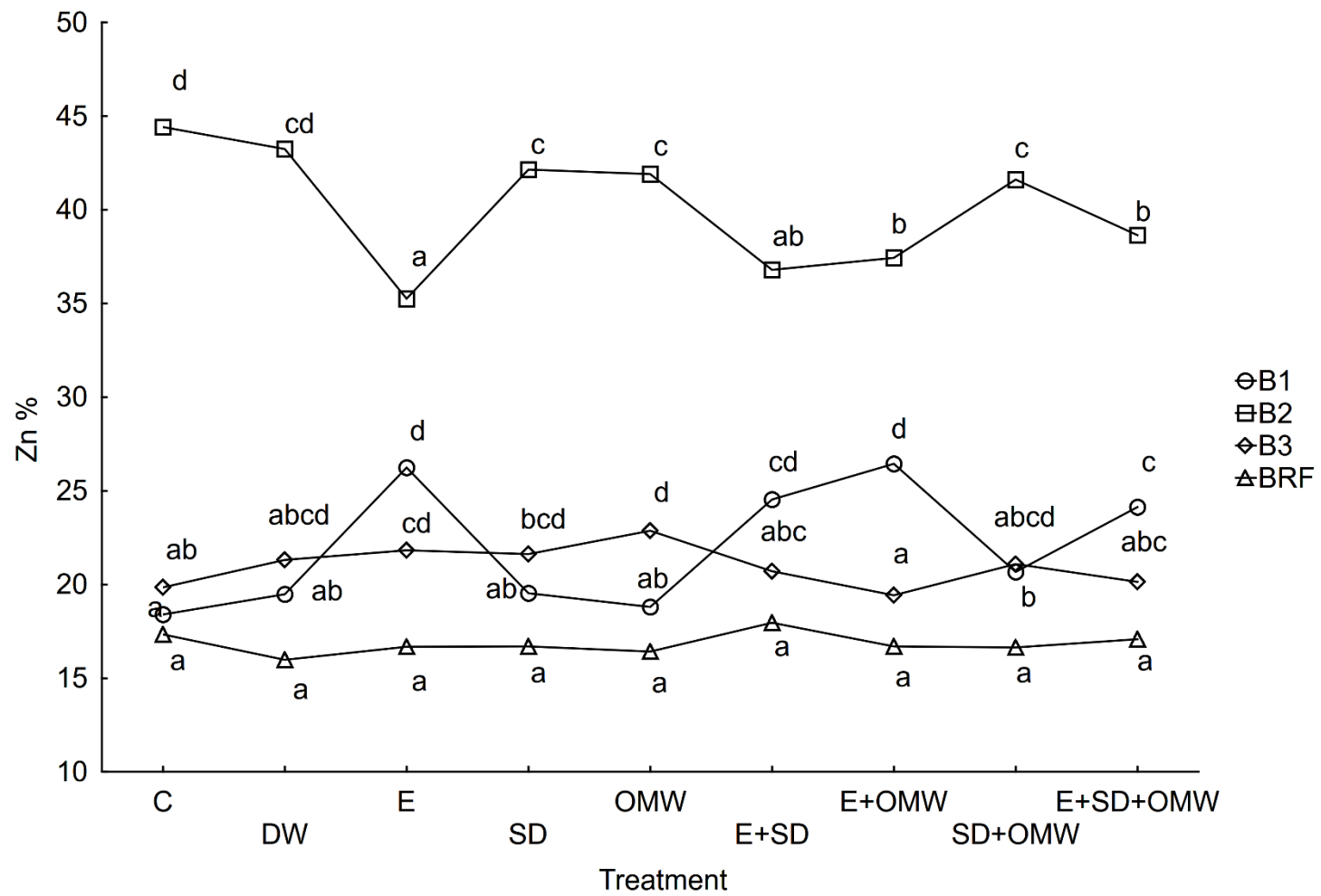
Σχήμα 7. Επίδραση των μεταχειρίσεων (Treatments) επί του ποσοστού του As (a) στα κλάσματα (W1) μη ειδικώς προσροφημένο, (W2) ειδικώς προσροφημένο, (W3) άμορφα και ασθενώς κρυσταλλικά οξείδια του Fe και Al, (W4) κρυσταλλικά ένυδρα οξείδια του Fe και Al, (WRF) υπολειμματικό, και επί των ποσοστών των Pb (b) και Zn (c) στα κλάσματα (B1) ανταλλάξιμο / διαλυτό σε ασθενές οξύ, (B2) αναγώγιμο, (B3) οξειδώσιμο και (BRF) υπολειμματικό. Οι συγκρίσεις των μέσων μεταξύ των μεταχειρίσεων για κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το Tukey HSD test ($\alpha \leq 0.05$). Η παρουσία κοινών γραμμμάτων υποδηλώνει μη σημαντική διαφορά.



7.b



7.c



αποτελεσματικά τα κρυσταλλικά οξείδια Fe, Mn και Al, ούτε διαλυτοποιήσαν τις υπολειμματικές εδαφικές φάσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις του As στα κλάσματα W1 και W2 προήλθαν από την ικανότητα του EDTA να εκχυλίζει το As από τα άμορφα μεταλλικά οξείδια, γεγονός που ενισχύθηκε περαιτέρω από την παρουσία των OMW. Τα συμπεράσματα αυτά είναι στην ίδια κατεύθυνση με τον Borggaard (1982), ο οποίος αναφέρει ότι το EDTA επέδειξε εκλεκτικότητα στην εκχύλιση As από μείγματα συνθετικών άμορφων οξειδίων του Fe και φυσικών ή συνθετικών κρυσταλλικών οξειδίων του Fe.

Η προσθήκη του EDTA και όλων των μεταχειρίσεων που περιείχαν EDTA (E + SD, E + OMW, E + SD + OMW) οδήγησε σε ισχυρή κινητοποίηση των Pb και Zn στο έδαφος. Στην περίπτωση του Pb, το ποσοστό του κλάσματος B2 μειώθηκε ενώ του B1 αυξήθηκε σημαντικά, σχεδόν 40%. Παρόμοια, για τον Zn το ποσοστό του κλάσματος B1 αυξήθηκε με τις μεταχειρίσεις που περιελάμβαναν EDTA. Παρατηρείται επίσης ότι, το μοτίβο της μεταβολής του κλάσματος B1 ήταν αντίστροφο από εκείνο του B2, γεγονός που ισχύει και για τον Pb. Τα αποτελέσματα δείχνουν σαφώς ότι το EDTA είναι ένας πολύ αποτελεσματικός παράγοντας απελευθέρωσης βαρέων μετάλλων στο έδαφος, και ιδιαίτερα του Pb (Neugschwandtner et al. 2008). Οι παρατηρηθήσες μειωμένες συγκεντρώσεις των Pb και Zn δεσμευμένων στα οξείδια Fe / Mn λόγω της ικανότητας του EDTA να προάγει τη διαλυτοποίηση των οξειδίων του Fe, συνέβαλαν σε μια σημαντική αύξηση αυτών των μετάλλων στο περισσότερο διαθέσιμο κλάσμα (B1). Στη μέθοδο BCR δεν περιλαμβάνεται κανένα στάδιο για τη διαφοροποίηση μεταξύ άμορφων και κρυσταλλικών οξειδίων των μετάλλων. Σύμφωνα με τους Rodriguez et al. (2003), η υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται στο δεύτερο στάδιο B2 της BCR) δεν μπορεί αποτελεσματικά να διασπάσει τις καλώς

κρυσταλλοποιημένες φάσεις αλλά κυρίως διαλύει τα άμορφα οξειδία των Fe και Mn. Ως εκ τούτου, το EDTA μόνο του ή σε συνδυασμό με τα OMW, αύξησε τις διαθέσιμες συγκεντρώσεις όλων των υπό μελέτη στοιχείων που πιθανώς προέρχονταν κυρίως από τη διάλυση των άμορφων οξειδίων του Fe. Οι Clemente και Bernal (2006), διαπίστωσαν ότι η προσθήκη χουμικών οξέων που απομονώθηκαν από ένα μίγμα compost (φύλλα ελιάς και το στερεό κλάσμα των OMW) σε ένα ρυπασμένο με Pb-Zn ασβεστολιθικό έδαφος, αύξησε τη συγκέντρωση του Zn στο εκχυλίσμα με EDTA κλάσμα επιβεβαιώνοντας την κινητοποίηση του μετάλλου μετά από επώαση 28 εβδομάδων.

5.3.5 Ο ρόλος των οξειδίων του Fe / Mn στην κινητικότητα των As, Pb και Zn.

Τα αποτελέσματα των κλασματώσεων έδειξαν σαφώς ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις των As, Pb και Zn στα πιο διαθέσιμα κλάσματα (δηλ. στο W1 για το As και B1 για τα Pb και Zn) προήλθαν κυρίως από τις αναγώγιμες χημικές φάσεις του εδάφους. Αυτό είναι αποτέλεσμα της ικανότητας του EDTA (κυρίως) και των άλλων μεταχειρίσεων να δημιουργούν σύμπλοκα με τα μέταλλα και το As που είναι δεσμευμένα στα οξειδία του Fe / Mn. Για την περαιτέρω διευκρίνιση του ρόλου των οξειδίων των μετάλλων στην κινητικότητα των As, Pb και Zn στις πειραματικές συνθήκες αυτής της μελέτης, δημιουργήθηκε πίνακας συντελεστών συσχέτισης (Correlation coefficient matrix) για να ελεγχθούν τυχόν σχέσεις μεταξύ των πιο ευκίνητων κλασμάτων των As, Pb, Zn, Fe και Mn (W1 ή B1 ανάλογα με το στοιχείο) για όλες τις μεταχειρίσεις και χρόνους επώασης (Πίνακας 13). Επιπρόσθετα, διενεργήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών PCA (Principal Component Analysis) όπου τα δεδομένα εισαγωγής ήταν οι συγκεντρώσεις των As, Pb, και Zn στα στάδια

W1 / B1 και οι συγκεντρώσεις των Fe, Mn στα στάδια B1, B2, B3 και BRF μετά από επώαση 90 ημερών (Σχήμα 8).

Πίνακας 13. Πίνακας συντελεστών συσχέτισης των διαθέσιμων κλασμάτων (W1 / B1) των As, Pb, Zn, Fe και Mn για όλες τις μεταχειρίσεις και τους χρόνους επώασης (N=224).

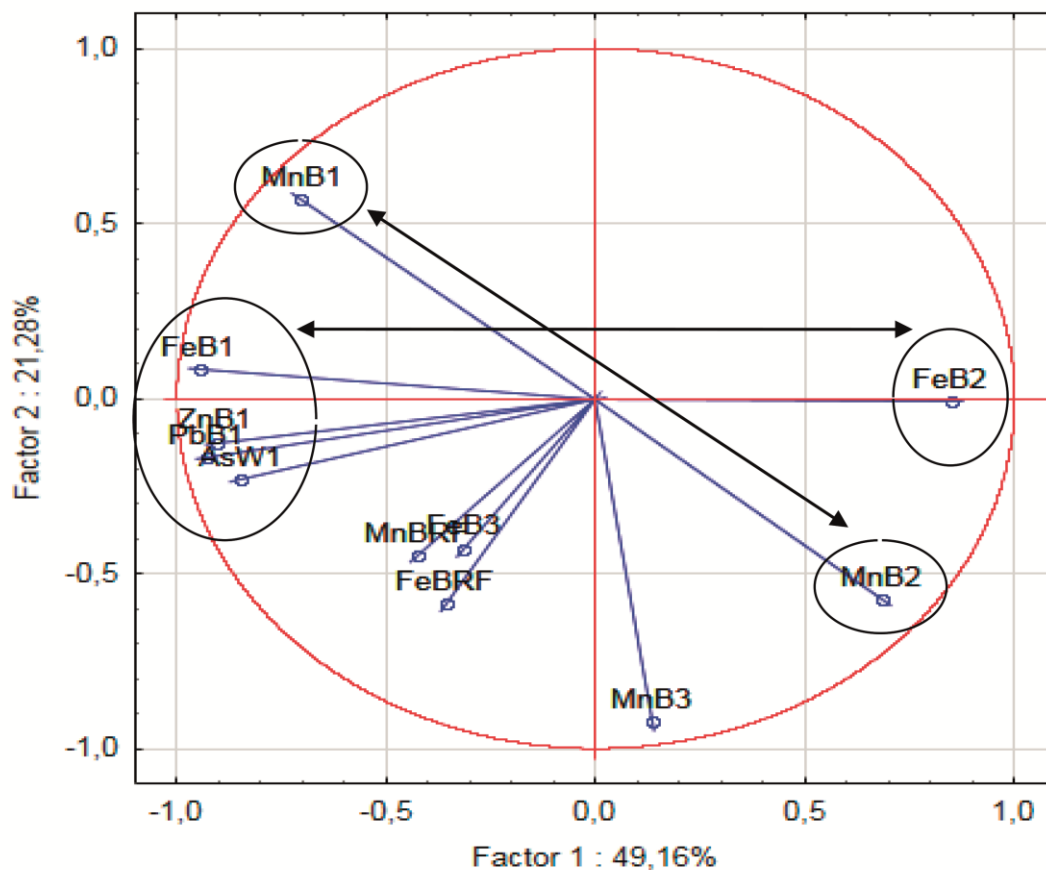
| | AsW1 | PbB1 | ZnB1 | FeB1 | MnB1 |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|
| AsW1 | 1.000 | 0.473 | 0.407*** | 0.320*** | 0.047 |
| PbB1 | 0.473*** | 1.000 | 0.873*** | 0.858*** | 0.339*** |
| ZnB1 | 0.407*** | 0.873*** | 1.000 | 0.792*** | 0.319*** |
| FeB1 | 0.320*** | 0.858*** | 0.792*** | 1.000 | 0.611*** |
| MnB1 | 0.047 | 0.339*** | 0.319*** | 0.611*** | 1.000 |

***P <0.001

Σύμφωνα με τον Πίνακα 13 τα κλάσματα W1 / B1 των As, Pb και Zn συσχετίζονται έντονα με το κλάσμα B1 του Fe που δείχνει κοινή προέλευση όλων των στοιχείων στο διαθέσιμο κλάσμα που πιθανότατα προέρχεται από τη μερική διάλυση των οξειδίων του Fe. Η συγκέντρωση του Mn στο κλάσμα B1 συσχετίστηκε σημαντικά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των Pb και Zn και όχι με του As στο W1. Αυτό όμως ήταν μάλλον ένα αναμενόμενο αποτέλεσμα, δεδομένου ότι το As προσροφάται κυρίως στα οξείδια Fe και Al και όχι στα οξείδια του Mn (Wenzel et al. 2001). Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 8, η ανάλυση PCA έδειξε ότι τα κλάσματα AsW1, PbB1, ZnB1 και FeB1 σχημάτισαν μια ομάδα (συσχετίζονται μεταξύ τους) η οποία συνδέεται αρνητικά με το αναγωγίμο κλάσμα B2 του Fe, παρέχοντας ισχυρές ενδείξεις ότι τα οξείδια του Fe ήταν η κύρια δεξαμενή για τις αυξημένες διαθέσιμες ποσότητες των As, Pb και Zn στο τέλος της περιόδου επώασης. Η άλλη σημαντική αρνητική σχέση που διαπιστώθηκε ήταν μεταξύ των B1 και B2 κλασμάτων του Mn

που δείχνει ότι η διάλυση των οξειδίων του Mn αύξησε τη διαθεσιμότητα του Μη, αλλά δεν επηρέασε ισχυρά τη διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn.

Σχήμα 8. Αποτελέσματα της PCA ανάλυσης για τα διαθέσιμα κλάσματα των As, Pb, και Zn (W1 / B1) και του ανταλλάξιμου / διαλυτό σε ασθενές οξύ (B1), αναγώγιμου (B2), οξειδώσιμου (B3) και υπολειμματικού (BRF) κλάσματος των Fe και Mn.



5.4 Μέρος 4^ο – Μελέτη σχημάτων ενισχυμένης φυτοεξαγωγής με τη χρήση EDTA, Υγρών Αποβλήτων Ελαιουργίων και του φυτού *Pteris vittata L.* για την απορρόπηση ρυπασμένου εδάφους από την ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου

Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων και η συζήτηση που ακολουθεί, αναφέρεται στο πειραματικό μέρος που περιγράφεται στη Σελίδα 59 και αποτελεί το 4^ο δημοσιευμένο άρθρο του Παραρτήματος.

5.4.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα θερμοκηπίου.

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που συλλέχθηκε από την περιοχή Θορικός, στην ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου, για την διενέργεια του πειράματος θερμοκηπίου, εμφανίζονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα θερμοκηπίου.

| Clay g kg ⁻¹ | Silt g kg ⁻¹ | Sand g kg ⁻¹ | pH (1:1) | Total CaCO ₃ g kg ⁻¹ | OM g kg ⁻¹ | CEC cmol _c kg ⁻¹ | Total As mg kg ⁻¹ | Total Pb mg kg ⁻¹ | Total Zn mg kg ⁻¹ |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|--------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 198 | 301 | 501 | 7.72 | 69 | 45 | 18 | 822 | 5677 | 4428 |

Clay=Άργιλος, Silt=Ίλύς, Sand=Άμμος, pH=Ενεργός οξύτητα, CaCO₃=Ισοδύναμο Ανθρακικό Ασβέστιο, OM=Οργανική Ουσία, CEC=Ικανότητα Ανταλλαγής Κατιόντων

5.4.2 Ανάπτυξη της φτέρης *P. vittata L.*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA), η επίδραση του παράγοντα Μεταχείριση στην ανάπτυξη της φτέρης *P. vittata* ήταν σημαντική, ενώ η επίδραση του παράγοντα Δόση δεν ήταν. Δεν παρατηρήθηκε

αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (Σχήμα 9 και συνοδευτικός πίνακας). Σε σύγκριση με τον μάρτυρα (φυτά που δεν εφαρμόστηκε καμία μεταχείριση), τόσο η προσθήκη EDTA όσο και των υγρών απόβλητων ελαιουργείων (OMW) μείωσαν σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών, οδηγώντας σε κατά 20% χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας στην περίπτωση της πρώτης προσθήκης EDTA. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα τοξικότητας ή ανεπάρκειας θρεπτικών συστατικών στα φυτά φτέρης. Η δεύτερη προσθήκη των OMW μείωσε αυτό το φαινόμενο υποδηλώνοντας μειωμένο στρες των φυτών. Είναι γνωστό ότι η προσθήκη OMW στα εδάφη μπορεί να οδηγήσει σε αναερόβιες εδαφικές συνθήκες και τοξικό στρες στα φυτά και στον μικρόκοσμο του εδάφους λόγω του αυξημένου φαινολικού φορτίου (Fiorentino et al. 2003). Από την άλλη πλευρά, τα OMW περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις θρεπτικών στοιχείων που μπορούν να προωθήσουν την ανάπτυξη των φυτών. Φαίνεται ότι, ενώ η πρώτη προσθήκη OMW επέδρασε δυσμενώς στα φυτά, στη συνέχεια το θρεπτικό φορτίο των OMW συνέβαλε στην υγιέστερη ανάπτυξη των φυτών και εξισορρόπησε τις αρχικά αρνητικές επιπτώσεις των OMW. Επιπλέον, η παρατηρούμενη αυξημένη βιομάζα των φυτών με τη δεύτερη εφαρμογή των OMW υποδηλώνει μια ταχεία προσαρμογή τόσο των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους όσο και των φυτών στις ανεπιθύμητες επιδράσεις των OMW στο οικοσύστημα του εδάφους (Karpouzas et al. 2009). Η εφαρμογή του EDTA, μόνο του ή σε συνδυασμό με τα OMW, διατάραξε το εδαφικό περιβάλλον στη περιοχή της ριζόσφαιρας με συνέπεια τα φυτά να υποστούν stress που πιθανώς οφείλεται στην αιφνίδια απελευθέρωση μεγάλων συγκεντρώσεων τοξικών στοιχείων όπως για παράδειγμα του Pb. Η *P. vittata* είναι ένα πολύ γνωστό φυτό υπερσυσσωρευτής αρσενικού αλλά είναι πιθανώς λιγότερο ανεκτικό σε περίπτωση απότομης αύξησης των διαθέσιμων συγκεντρώσεων άλλων τοξικών στοιχείων στο εδαφοδιάλυμα (An et al. 2006).

Επιπρόσθετα, το EDTA πιθανώς να επηρέασε αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και ως εκ τούτου θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μειωμένη ανάπτυξη της *P. vittata* (January et al. 2008).

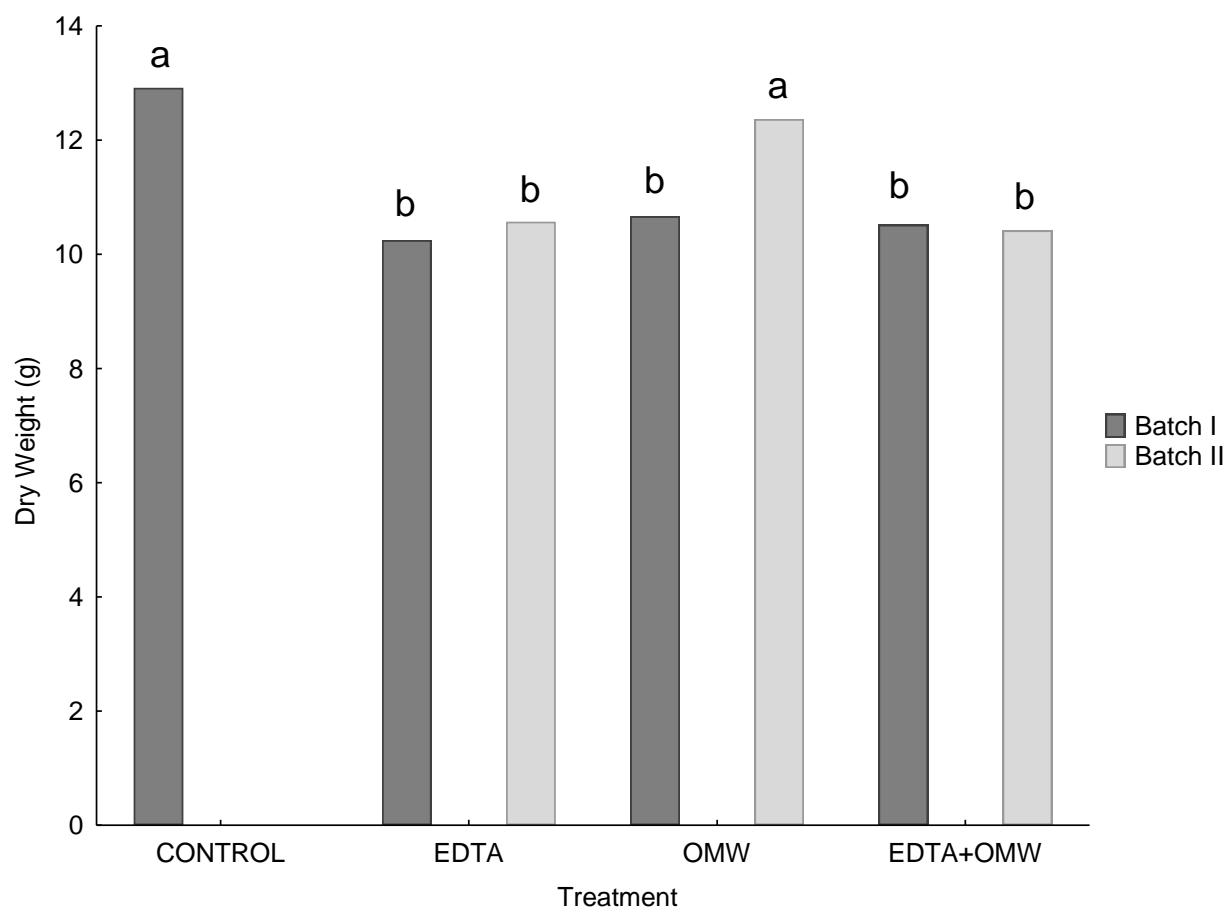
5.4.3 Συντελεστής ανακατανομής και συγκεντρώσεις των As, Pb και Zn στη φτέρη *P. Vittata* L.

Οι επιδράσεις των παραγόντων Μεταχείριση και Δόση (μονή ή διπλή) στις συγκεντρώσεις των μετάλλων και του As στην υπέργεια βιομάζα της φτέρης παρουσιάζονται στο Σχήμα 10 και στον συνοδευτικό πίνακα αποτελεσμάτων ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA). Ενώ για όλα τα στοιχεία η επίδραση των μεταχειρίσεων ήταν σημαντική, ο παράγοντας Δόση είχε σημαντική επίδραση μόνο για την πρόσληψη Pb από τα φυτά. Δεδομένου ότι για όλα τα στοιχεία παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων, οι συγκρίσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων ισχύουν για κάθε δόση ενώ οι διαφορές για την ίδια μεταχείριση μεταξύ των δύο σειρών (μονή / διπλή δόση) αξιολογήθηκαν με t-test. Όσον αφορά το As, στη Δόση I (μονή δόση) μόνο η εφαρμογή του συνδυασμού του EDTA και των OMW εμφάνισε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του As στο υπέργειο μέρος της φτέρης σε σύγκριση με τον μάρτυρα, ενώ στην Δόση II (διπλή δόση) τόσο η εφαρμογή EDTA όσο και η EDTA + OMW ενίσχυσαν την πρόσληψη As από την φτέρη. Επιπλέον, η δεύτερη εφαρμογή του EDTA αύξησε σημαντικά την συγκέντρωση του As στο υπέργειο μέρος της φτέρης σε σύγκριση με την πρώτη εφαρμογή EDTA.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μόνο η εφαρμογή EDTA ενίσχυσε την πρόσληψη των Pb και Zn από τα φυτά. Επιπρόσθετα, η δεύτερη εφαρμογή του EDTA αύξησε ακόμα περισσότερο τις συγκεντρώσεις Pb και Zn στο υπέργειο μέρος της *P. vittata*.

Οι μεταχειρίσεις EDTA και OMW και ο συνδυασμός τους επηρέασαν σημαντικά τη μεταφορά των Pb και Zn από τις ρίζες στο υπέργειο μέρος (TF, Translocation Factor) αλλά δεν επηρέασαν τον TF του As. Η επίδραση του παράγοντα Δόση (μονή ή διπλή) ήταν σημαντική για τους TF των As και Zn, ενώ δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (Δόση x Μεταχείριση) (Πίνακας 15). Σε σύγκριση με τον μάρτυρα, η δεύτερη εφαρμογή του EDTA αύξησε σημαντικά τους TF των Pb και Zn. Παρόμοιο μοτίβο, αλλά όχι στατιστικά σημαντικό, παρατηρήθηκε επίσης για τους TF του As. Οι TF του As ήταν μεγαλύτεροι από των Pd και Zn, επαληθεύοντας τη γνωστή ικανότητα της *P. vittata* να λειτουργεί ως φυτό υπερ-συσσωρευτής του As (Gonzaga et al. 2008).

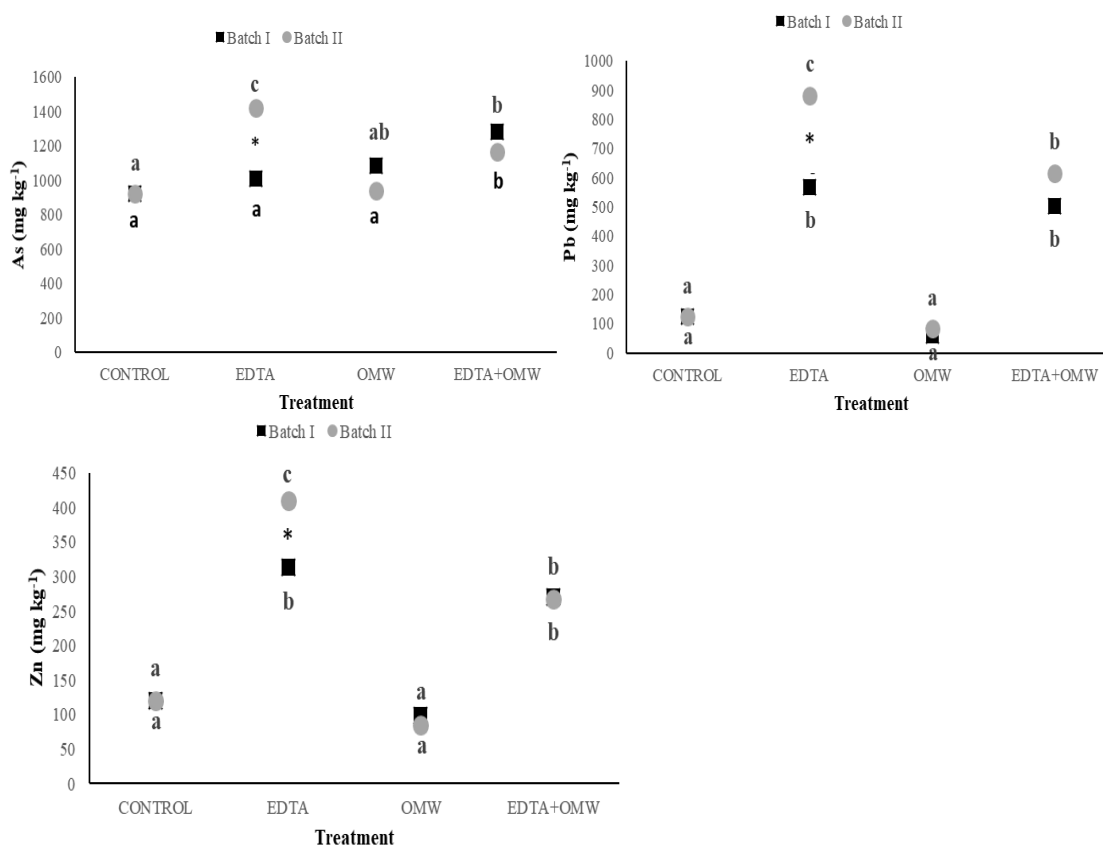
Σχήμα 9. Επίδραση των παραγόντων Μεταχείριση (Treatment) και Δόση (Batch) στην υπέργεια βιομάζα (ξηρό βάρος, Dry Weight) της *P. vittata*. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος 8 επαναλήψεων. Οι συγκρίσεις των μέσων διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας το Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$) και εμφανίζονται με μικρά γράμματα. Η παρουσία κοινών γραμμάτων υποδηλώνει μη στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA παρουσιάζουν την επίδραση των παραγόντων Μεταχείριση (Treatment) και Δόση (Batch) στην ανάπτυξη της *P. Vittata*.



| ANOVA RESULTS | | | | | |
|-----------------|-------|----|-------|-------|--------|
| Effect | SS | DF | MS | F | P |
| Treatment | 66.35 | 3 | 22.12 | 11.96 | 0.000* |
| Batch | 3.72 | 1 | 3.72 | 2.01 | 0.162 |
| Treatment*Batch | 8.31 | 3 | 2.77 | 1.5 | 0.225 |

Control=Μάρτυρας, OMW=Υγρά απόβλητα ελαιουργείων

Σχήμα 10. Επίδραση των μεταχειρίσεων στη συγκέντρωση των As, Pb, και Zn στο υπέργειο μέρος της *P. vittata*. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος 8 επαναλήψεων. Συγκρίσεις των μέσων μεταξύ των Μεταχειρίσεων (Treatment) εντός κάθε Δόσης (Batch I/II) διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας το Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$) και παρουσιάζονται με μικρά γράμματα, ενώ οι διαφορές μεταξύ των ίδιων μεταχειρίσεων που ανήκουν σε διαφορετικές σειρές εξετάστηκαν με t-test (ο αστερίσκος υποδηλώνει σημαντική διαφορά, $*p \leq 0.05$). Η παρουσία κοινών γραμμάτων υποδηλώνει μη στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) εμφανίζουν την επίδραση των παραγόντων Μεταχείριση (Treatment) και Δόση (Batch) στην πρόσληψη των As, Pb, και Zn από τα φυτά της *P. Vittata*.



Control=Μάρτυρας, OMW=Υγρά απόβλητα ελαιουργείων

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|-------------------|-------|----|-------|-------|--------|
| Effect | SS | DF | MS | F | P |
| As | | | | | |
| Treatment | 108E4 | 3 | 359E3 | 10.71 | 0.000* |
| Batch | 231E2 | 1 | 231E2 | 0.69 | 0.410 |
| Treatment x Batch | 788E3 | 3 | 263E3 | 7.84 | 0.000* |
| Pb | | | | | |
| Treatment | 499E4 | 3 | 166E4 | 63.80 | 0.000* |
| Batch | 202E3 | 1 | 202E3 | 7.73 | 0.007* |
| Treatment x Batch | 245E3 | 3 | 817E2 | 3.13 | 0.033* |
| Zn | | | | | |
| Treatment | 779E3 | 3 | 260E3 | 135.7 | 0.000* |
| Batch | 6381 | 1 | 6381, | 3.3 | 0.073 |
| Treatment x Batch | 317E2 | 3 | 106E2 | 5.5 | 0.002* |

Πίνακας 15. Συντελεστές μεταφοράς (Translocation Factor, TF) των As, Pb και Zn, στη *Pteris vittata* L. μεταξύ των διαφορετικών Μεταχειρίσεων (Treatment) για κάθε Δόση (Batch I/II). Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος 4 επαναλήψεων. Οι συγκρίσεις των μέσων όρων των TF διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας το Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$), παρουσιάζονται με μικρά γράμματα και ισχύουν για τις συγκρίσεις μεταξύ των παραγόντων για κάθε στοιχείο. Η παρουσία κοινών γραμμάτων υποδηλώνει μη στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA παρουσιάζουν την επίδραση των παραγόντων Μεταχείριση (Treatment) και Δόση (Batch) στους συντελεστές μεταφοράς (TF) των As, Pb, και Zn.

| | TRANSLOCATION FACTOR (TF) | | | | | | | |
|----|---------------------------|----------|--------|----------|----------|---------|---------|----------|
| | BATCH I | | | | BATCH II | | | |
| | CONTROL | EDTA | OMW | EDTA+OMW | CONTROL | EDTA | OMW | EDTA+OMW |
| As | 6,91 a | 6,30 a | 7,99 a | 5,11 a | 6,91 a | 14,45 a | 11,18 a | 10,44 a |
| Pb | 0,08 abc | 0,14 abc | 0,04 b | 0,14 abc | 0,08 abc | 0,25 c | 0,06 b | 0,18 abc |
| Zn | 0,16 a | 0,20 a | 0,12 a | 0,19 a | 0,16 a | 0,57 b | 0,16 a | 0,29 ab |

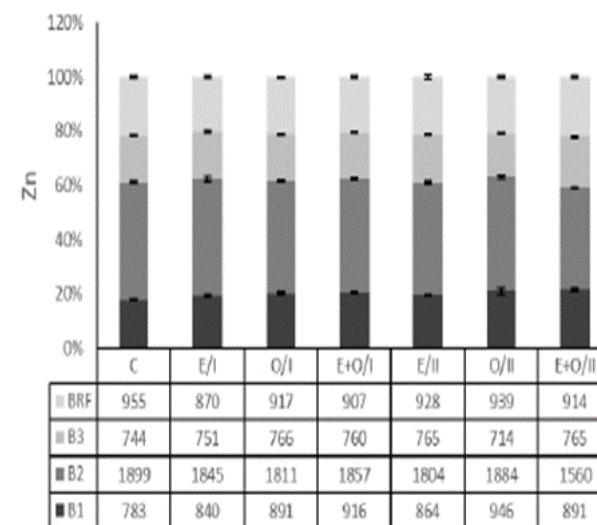
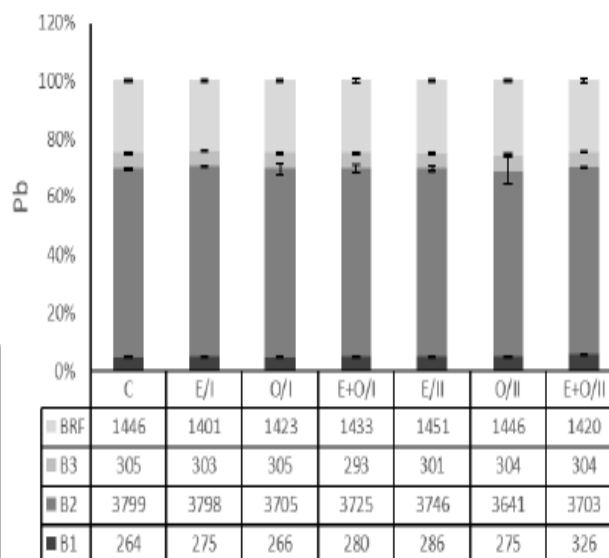
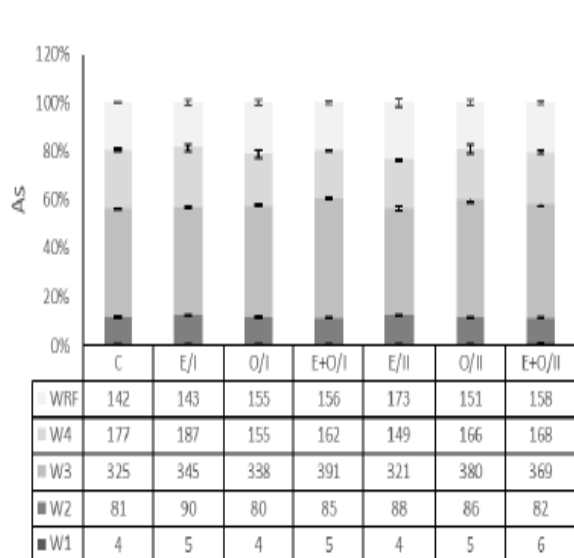
| ANOVA RESULTS | | | | | | |
|-----------------|-------|----|-------|-------|--------|--|
| Effect | SS | DF | MS | F | P | |
| As | | | | | | |
| Treatment | 61.1 | 3 | 20.4 | .662 | 0.583 | |
| Batch | 138.7 | 1 | 138.7 | 4.511 | 0.044* | |
| Treatment*Batch | 70.9 | 3 | 23.6 | .769 | 0.523 | |
| Pb | | | | | | |
| Treatment | 0.110 | 3 | .037 | 6.705 | 0.002* | |
| Batch | 0.014 | 1 | .014 | 2.633 | 0.118 | |
| Treatment*Batch | 0.013 | 3 | .004 | .794 | 0.509 | |
| Zn | | | | | | |
| Treatment | 0.296 | 3 | .099 | 4.234 | 0.015* | |
| Batch | 0.130 | 1 | .130 | 5.584 | 0.027* | |
| Treatment*Batch | 0.157 | 3 | .052 | 2.251 | 0.108 | |

Control=Μάρτυρας, OMW=Υγρά απόβλητα ελαιουργείων

5.4.4 Χημικές μορφές των As, Pb και Zn στο έδαφος

Οι μέσοι όροι των ποσοστών και των συγκεντρώσεων των As, Pb και Zn στα διάφορα κλάσματα εδάφους μετά τη κοπή των φυτών φτέρης παρουσιάζονται στο Σχήμα 11 και στους συνοδευτικούς πίνακες. Οι μέσοι όροι των ποσοστών των As, Pb και Zn στα διάφορα κλάσματα εδάφους ήταν σε αύξουσα σειρά $W1 < W2 < WRF < W4 < W3$, $B1 < B3 < BRF < B2$ και $B3 < B1 < BRF < B2$, αντίστοιχα. Η κατανομή των στοιχείων στα εδαφικά κλάσματα δεν επηρεάστηκε ούτε από την πρώτη (Batch I) ούτε από τη δεύτερη (Batch II) εφαρμογή των μεταχειρίσεων (Treatments). Η μόνη εξαίρεση παρατηρήθηκε στην εφαρμογή EDTA / Batch II, όπου το υπολειμματικό κλάσμα WRF του As ήταν μεγαλύτερο από το αναγώγιμο κλάσμα W4. Το αρσενικό βρέθηκε ότι συνδέεται κυρίως με τα άμορφα και κρυσταλλικά οξείδια του Fe. Η προσθήκη EDTA, OMW και ο συνδυασμός τους, μονής ή διπλής δόσης, δεν είχαν σημαντική επίδραση στην αύξηση των περισσότερο διαθέσιμων κλασμάτων του As (W1 και W2). Τα αποτελέσματα της μεθόδου BCR κατέδειξαν τη τάση των Pb και Zn να συνδέονται με τα οξείδια του Fe, εμφανίζοντας ποσοστά 64.9 και 41.5% αντίστοιχα, στο αναγώγιμο κλάσμα B2.

Σχήμα 11. Μέσος όρος των ποσοστών και των τιμών των As, Pb, και Zn, στα διάφορα εδαφικά κλάσματα (οι τιμές στους πίνακες αναφέρονται σε mg kg⁻¹). Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου με διάστημα εμπιστοσύνης 95% ($p \leq 0.05$, $n=3$). I (Batch I, Δόση I), II (Batch II, Δόση II), C (Control, Μάρτυρας), O (Olive Mill Wastewater, Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείων), E (EDTA), (W1) μη ειδικώς προσροφημένο, (W2) ειδικώς προσροφημένο, (W3) άμορφα και ασθενώς κρυσταλλικά οξείδια του Fe και Al, (W4) κρυσταλλικά ένυδρα οξείδια του Fe και Al, (WRF) υπολειμματικό, (B1) ανταλλάξιμο/διαλυτό σε ασθενές οξύ, (B2) αναγώγιμο, (B3) οξειδώσιμο και (BRF) υπολειμματικό.



5.4.5 Επίδραση των μεταχειρίσεων στη συγκέντρωση των As, Pb και Zn στο υπέργειο μέρος της *P. vittata*.

Όσον αφορά την πρόσληψη του As και των μετάλλων από τη φτέρη, διακρίνονται τρία διαφορετικά μοτίβα. Η συγκέντρωση του αρσενικού στην υπέργεια βιομάζα της φτέρης αυξήθηκε με τη δεύτερη εφαρμογή του EDTA (Batch II) ενώ η πρώτη εφαρμογή των OMW (Υγρά απόβλητα ελαιουργείων) ενίσχυσε την εκχυλιστική ικανότητα του EDTA (Batch I). Οι συγκεντρώσεις των Pb και Zn αυξήθηκαν μόνο με την εφαρμογή EDTA. Όπως συμπεραίνεται από την επίδραση της συνδυασμένης προσθήκης EDTA + OMW (Σχήμα 10), τα OMW μείωσαν την πρόσληψη και των Pb και Zn από τα φυτά.

Οι παρατηρούμενες μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των As, Pb και Zn στο υπέργειο μέρος της *P. vittata* λόγω της εφαρμογής του EDTA στο υπό μελέτη έδαφος, μπορούν να αποδοθούν στην αυξημένη διαθεσιμότητα αυτών των στοιχείων στο έδαφος. Πράγματι, λόγω των ισχυρών ιδιοτήτων συμπλοκοποίησης, το EDTA δρα ως ένας ισχυρός ανταγωνιστής στις ενεργές επιφάνειες του εδάφους με αποτέλεσμα να εκχυλίζει μέταλλα από διαφορετικά χημικά κλάσματα του εδάφους όπως τα ανταλλάξιμα, τα ανθρακικά, τα άμορφα οξείδια Fe / Mn και την οργανική ουσία (Manouchehri et al. 2009). Πολλοί συγγραφείς κατέδειξαν την αποτελεσματικότητα του EDTA για την κινητοποίηση των As, Pb και Zn σε εδάφη ρυπασμένα με μέταλλα. Οι Meers et al. 2005, μελέτησαν την κινητοποίηση του Zn σε ιζήματα ρυπασμένα με μέταλλα που τα μεταχειρίστηκαν με EDTA και διαπίστωσαν ότι η κινητικότητα του Zn αυξήθηκε σημαντικά. Παρομοίως, αυξημένη διαθεσιμότητα As σε ένα ρυπασμένο έδαφος από βιομηχανική περιοχή μετά την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων EDTA παρατηρήθηκε από τους Abbas και Abdelhafez 2013. Η Mühlbachová 2011,

διαπίστωσε ότι η προσθήκη EDTA σε μακροχρόνια ρυπασμένα εδάφη αροτραίων καλλιεργειών και λειμώνων οδήγησε σε αυξημένες ποσότητες NH_4NO_3 -εκχυλίσιμου Pb έως 600 και 122 φορές, αντίστοιχα.

Παρόλα αυτά, ενώ για τα Pb και Zn η επίδραση του EDTA είναι προφανής από την πρώτη μάλιστα δόση (Batch I), για το As η εφαρμογή δεύτερης δόσης EDTA (Batch II) ήταν απαραίτητη για την ενεργοποίηση του προαναφερθέντος μηχανισμού. Φαίνεται ότι η μάλλον χαμηλή δοσολογία των $2.5 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ εδάφους δεν ήταν αρκετή για να απελευθερωθεί το As που ήταν δεσμευμένο στις διαφορετικές εδαφικές φάσεις (κυρίως στα άμορφα οξείδια και σύμπλοκα εσωτερικής στιβάδας όπου το As δεσμεύεται έντονα) ενώ ο διπλασιασμός της δόσης EDTA αύξησε τη διαλυτότητα του As και αντίστοιχα ενίσχυσε σημαντικά την πρόσληψη του από τα φυτά. Σε σύγκριση με τη Δόση I (Batch I), η εφαρμογή δεύτερης δόσης EDTA αύξησε σημαντικά τις συγκεντρώσεις των Pb και Zn στο υπέργειο μέρος της *P. vittata*. Παραδόξως, η συγκέντρωση των Pb και Zn στο υπέργειο μέρος της *P. vittata* αυξήθηκε συγκριτικά με τον μάρτυρα (Control) έως εννέα και τέσσερις φορές αντίστοιχα, υποδηλώνοντας ότι με την εφαρμογή του EDTA η *P. vittata* μπορεί να λειτουργήσει ως υπερσυσσωρευτής Pb για την απορρύπανση εδαφών που έχουν ρυπανθεί με As και Pb (Wan et al. 2014). Αντιθέτως, η σχετικά μικρότερη επίδραση όλων των μεταχειρίσεων στην πρόσληψη As μπορεί να αποδοθεί άμεσα στην ικανότητα της *P. vittata* να προσλαμβάνει μεγάλες ποσότητες As κάτω από συνήθεις εδαφικές συνθήκες. Αν και η συγκέντρωση του EDTA που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία θεωρείται ως περιβαλλοντικά και φυτοϋγειονομικά ασφαλής σύμφωνα με τους Vamerali et al. 2010 ($<3 \text{ mmol EDTA kg}^{-1}$ εδάφους) και καμία έκπλυση από τις γλάστρες δεν παρατηρήθηκε, οι πιθανές αρνητικές επιδράσεις του EDTA στο

οικοσύστημα του εδάφους και στην έκπλυση των μετάλλων, θα πρέπει πάντα να αξιολογούνται.

Η προσθήκη φρέσκων υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (OMW) στο έδαφος μπορεί να ενισχύσει την πρόσληψη των μετάλλων από τα φυτά προωθώντας τη διαλυτότητα των μετάλλων στα εδάφη με δύο κύριους μηχανισμούς: i) την αναγωγική διάλυση των μεταλλικών οξειδίων ως αποτέλεσμα της ανοργανοποίησης των οργανικών συστατικών από τους μικροοργανισμούς που καταναλώνουν ελεύθερο οξυγόνο και την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων και ii) τον σχηματισμό οργανομεταλλικών συμπλόκων των διαλυτών οργανικών ενώσεων και φαινολών που αναστέλλουν την προσρόφηση των μετάλλων στα κολλοειδή του εδάφους (Madrid et al. 1994; de la Fuente et al. 2011). Σύμφωνα με τα παραπάνω, θα πρέπει να αναμένεται αυξημένη διαθεσιμότητα και αυξημένη πρόσληψη από τα φυτά για όλα τα στοιχεία. Ανάλογα με το στοιχείο, η εφαρμογή OMW παράγαγε διαφορετικά μοτίβα πρόσληψης από τα φυτά. Σε σχέση με τον μάρτυρα (Control), η εφαρμογή OMW προκάλεσε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις As, Pb και Zn στο υπέργειο μέρος της *P. vittata* μόνο όταν συνδυάστηκε με EDTA (Σχήμα 10). Εξαιρουμένου του As, αυτό μπορεί να αποδοθεί στις ιδιότητες του EDTA και όχι στις ιδιότητες των OMW, δεδομένου ότι η μεταχείριση EDTA + OMW είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των συγκεντρώσεων Pb και Zn στα φύλλα των φυτών σε σχέση με την εφαρμογή EDTA μόνου του. Φαίνεται ότι τα OMW δεν διαλυτοποιούν αποτελεσματικά τα οξείδια μετάλλων στο υπό μελέτη έδαφος και δεν προάγουν εν συνεχεία τον σχηματισμό οργανομεταλλικών συμπλοκών. Ωστόσο, αυτό μπορεί να ισχύει για τα Pb και Zn, αλλά δεν μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη συγκέντρωση του As στην υπέργεια βιομάζα της φτέρης με την εφαρμογή OMW. Αν και η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική, παρατηρήθηκε σαφής τάση αύξησης όταν οι μεταχειρίσεις

OMW και OMW + EDTA συγκρίνονται με τον μάρτυρα. Σε αντίθεση με τα Pb και Zn, το As υπάρχει σε εδάφη ως οξυανιόν και επομένως ανταγωνίζεται με τα φωσφορικά ανιόντα για τις θέσεις απορρόφησης (Violante and Pigna 2002). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα OMW περιέχουν σημαντικές ποσότητες φωσφόρου, είναι πολύ πιθανό τα φωσφορικά PO_4^{3-} που προστίθενται στο έδαφος μέσω των OMW να αντικαταστήσουν τα αρσενικά AsO_4^{3-} στις θέσεις προσρόφησης των κολλοειδών του εδάφους με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του As στο εδαφικό διάλυμα να αυξάνεται καθώς και η πρόσληψη του από τα φυτά (Fayiga and Saha 2016).

5.4.6 Απομάκρυνση των As, Pb, και Zn ανά γλάστρα

Ένας άλλος τρόπος για να εκφραστούν τα πειραματικά αποτελέσματα είναι η εξέταση της παραγωγής βιομάζας ανά γλάστρα προκειμένου να προσδιοριστούν οι πραγματικές ποσότητες As, Pb και Zn που απομακρύνονται από το φυτό *P. Vittata*. Ο Πίνακας 16 συνοψίζει τις αντίστοιχες τιμές $mg\ pot^{-1}$ (συγκέντρωση του στοιχείου στο υπέργειο μέρος του φυτού mg/kg x βάρος υπέργειας βιομάζας φυτού kg/pot). Δεδομένου ότι η προσθήκη EDTA και OMW μείωσε την ανάπτυξη της φτέρης (Σχήμα 9), η χρήση των ποσοτήτων As, Pb και Zn που εξάχθηκαν ανά γλάστρα μπορεί να απεικονίσει καλύτερα τη δυναμική των εξεταζόμενων συστημάτων και μπορεί να παράσχει αξιόπιστες πληροφορίες που θα χρησιμοποιηθούν για τη μείωση της συγκέντρωσης των As, Pb και Zn σε ρυπασμένα εδάφη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) στον Πίνακα 16, η επίδραση του παράγοντα μεταχείριση είναι στατιστικά σημαντική για όλα τα στοιχεία, η επίδραση του παράγοντα δόση (μονή ή διπλή) είναι σημαντική μόνο για τον Pb, ενώ αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων παρατηρήθηκε μόνο για το As. Το

αρσενικό που απομακρύνθηκε με τη δεύτερη προσθήκη EDTA (Batch II) βρέθηκε σχεδόν διπλάσιο σε σχέση με τον μάρτυρα, ενισχύοντας την ικανότητα υπερ-συσσώρευσης της φτέρης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι κάθε δοχείο περιείχε 2 kg εδάφους και ότι απομακρύνθηκαν 135.24 mg As, το σύστημα *P. vittata* - EDTA αποτελεί μια ελπιδοφόρο προοπτική για την απορρύπανση ρυπασμένων με As εδαφών. Παρόλα αυτά, παρόμοια αποτελέσματα με στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές As σε σχέση με τον μάρτυρα λήφθηκαν και από την πρώτη εφαρμογή του EDTA + OMW που δείχνει την συνεργιστική δράση του EDTA και των OMW για την απομάκρυνση του As από το έδαφος. Για τα Pb και Zn, αν και το EDTA αύξησε σημαντικά την ικανότητα απομάκρυνσης τους από τη φτέρη, ειδικά στη δεύτερη δόση (Batch II), τα 83.43 και 39.02 mg Pb και Zn αντίστοιχα που απομακρύνονται από το έδαφος δεν μπορούν να εκτιμηθούν ως επαρκή (ιδιαίτερα για τον Zn) για την επιτυχή αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών με αυτά τα μέταλλα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι σε εδάφη με υψηλές και πολύ υψηλές συγκεντρώσεις As, Pb και Zn, το σύστημα *P. vittata* - EDTA μπορεί να χρησιμεύσει για τη δραστική μείωση της συγκέντρωσης του As και για μια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του Pb στο έδαφος.

Πίνακας 16. Απομάκρυνση των As, Pb, και Zn εκφραζόμενη ως mg pot⁻¹ (mg ανά γλάστρα). Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος 8 επαναλήψεων. Για τα Pb και Zn οι συγκρίσεις διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας το Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$). Παρουσιάζονται με μικρά γράμματα και ισχύουν για συγκρίσεις των μεταχειρίσεων εντός και μεταξύ των δυο σειρών (Batch). Για το As οι συγκρίσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων εντός της κάθε δόσης (Batch I & II) διενεργήθηκαν με το Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$) και παρουσιάζονται με μικρά γράμματα, ενώ οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων που ανήκουν σε διαφορετική δόση (Batch) εξετάστηκαν με t-test ($p \leq 0.05$) και παρουσιάζονται με κεφαλαία γράμματα. Η παρουσία κοινών γραμμάτων υποδηλώνει μη στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) παρουσιάζουν την επίδραση των παραγόντων μεταχείριση (Treatment) και δόση (Batch) στην απομάκρυνση των As, Pb, and Zn ανά γλάστρα (mg pot⁻¹).

| | | mg pot ⁻¹ | | | | | | | |
|----|--|----------------------|--------------|----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | | BATCH I | | | | BATCH II | | | |
| | | CONTROL | EDTA | OMW | EDTA+OMW | CONTROL | EDTA | OMW | EDTA+OMW |
| As | | 73.29 a/A | 102.45 ab | 106.08 ab/A | 123.11 b/A | 73.29 a/A | 135.24 b/A | 76.87 a/B | 114.17 b/A |
| Pb | | 9.87 a | 56.95 bc | 5.90 a | 48.73 b | 9.87 a | 83.43 c | 6.74 a | 62.17 bc |
| Zn | | 9.48 a | 31.62 bc | 9.60 a | 26.11 b | 9.48 a | 39.02 c | 6.91 a | 26.65 b |

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|-----------------|-------|----|-------|-------|--------|
| Effect | SS | DF | MS | F | P |
| As | | | | | |
| Treatment | 238E2 | 3 | 7932 | 11.89 | 0.000* |
| Batch | 29 | 1 | 29 | 0.04 | 0.836 |
| Treatment*Batch | 8004 | 3 | 2668 | 4.00 | 0.012* |
| Pb | | | | | |
| Treatment | 498E2 | 3 | 166E2 | 53.52 | 0.000* |
| Batch | 1662 | 1 | 1662 | 5.36 | 0.024* |
| Treatment*Batch | 1869 | 3 | 623 | 2.01 | 0.123 |
| Zn | | | | | |
| Treatment | 8382 | 3 | 2794 | 80.92 | 0.000* |
| Batch | 27 | 1 | 27 | 0.80 | 0.376 |
| Treatment*Batch | 222 | 3 | 74 | 2.14 | 0.105 |

Control=Μάρτυρας, OMW=Υγρά απόβλητα ελαιουργείων

5.4.7 Επίδραση των μεταχειρίσεων στις χημικές μορφές των As, Pb και Zn στο έδαφος.

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των As, Pb και Zn στο υπέργειο μέρος της *P. vittata* υποδηλώνουν έντονα ότι οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν αύξησαν τη διαθεσιμότητα των στοιχείων αυτών στο έδαφος. Ωστόσο, αυτό δεν αποδείχθηκε από τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων κλασμάτωσης Wenzel και BCR, καθώς δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση των μεταχειρίσεων στην κατανομή των στοιχείων στα κλάσματα του εδάφους (Σχήμα 11, σελ. 123). Η συγκομιδή του υπέργειου μέρους της *P. vittata* οδήγησε στην εκχύλιση μικρών ποσοτήτων As, Pb και Zn σε σχέση με τις ολικές συγκεντρώσεις αυτών των στοιχείων στο υπό μελέτη έδαφος. Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι οι εφαρμογές EDTA και OMW οδήγησαν σε μικρή ανακατανομή των υπό μελέτη στοιχείων μεταξύ των φάσεων του εδάφους η οποία όμως δεν επέτρεψε την ανίχνευση ευαίσθητων αλλά σημαντικών μεταβολών στη κλασμάτωση των στοιχείων που θα μπορούσαν να σχετίζονται με την πρόσληψη των As, Pb και Zn από τα φυτά.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1 Μέρος Ι^ο

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στα 29 επιφανειακά εδάφη (0-15cm) από την ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου, οι ολικές συγκεντρώσεις των Cu, Ni και Cr βρέθηκαν κάτω από τις αντίστοιχες τιμές παρέμβασης, ενώ οι ολικές συγκεντρώσεις Zn, Pb, Cd και As ήταν 4.9, 1.4 και 17 φορές μεγαλύτερες από τα αντίστοιχα κατώτατα όρια παρέμβασης. Σύμφωνα με το γεωχημικό υπόβαθρο της περιοχής μελέτης και τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά συστάδες (Cluster analysis), οι πολύ υψηλές έως ακραίες συγκεντρώσεις των Pb, Zn, Cd, Cu και As στα υπό μελέτη εδάφη, είναι αποτέλεσμα της εξορυκτικής / μεταλλευτικής δραστηριότητας στη περιοχή, ενώ η παρουσία Ni και Cr στα εδάφη του Λαυρίου συμφωνεί με τη γεωλογία της περιοχής.

Η γεωχημική κατανομή των στοιχείων έδειξε ότι τα Cu, Ni, Cr και As συνδέονται κυρίως με το υπολειμματικό κλάσμα, ενώ τα Zn, Pb και Cd συνδέονται κυρίως με το αναγώγιμο κλάσμα. Επιπλέον, σημαντική ποσότητα του As βρέθηκε στην αναγώγιμη φάση. Στη περίπτωση ενός διαφορετικού γεωχημικού σεναρίου, όπως η επικράτηση αναερόβιων εδαφικών συνθηκών, θα μπορούσε να ευνοηθεί η διαλυτοποίηση των οξειδίων Fe / Mn με συνέπεια την αύξηση της διαθεσιμότητας των Zn, Pb, Cd και As, γεγονός που θα αποτελούσε σοβαρή περιβαλλοντική απειλή. Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) έδειξε σημαντική σχέση του αναγώγιμου κλάσματος όλων των υπό μελέτη στοιχείων με τα οξείδια του Fe, υπογραμμίζοντας τον σημαντικό ρόλο των οξειδίων του Fe στην συγκράτηση τοξικών στοιχείων σε βαριά ρυπασμένα εδάφη.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η περιοχή μελέτης είναι κατοικημένη, πρέπει να θεωρείται επιβεβλημένη η εφαρμογή μέτρων απορρύπανσης του εδάφους. Χιλιάδες στρέμματα στην ευρύτερη περιοχή της Λαυρεωτικής είναι επιβαρυνμένα με τοξικά στοιχεία και ως εκ τούτου επιβάλλεται να προωθηθούν και να υλοποιηθούν δράσεις αποκατάστασης των εδαφών αυτών που θα είναι φιλικές προς το περιβάλλον και ταυτόχρονα οικονομικά εφικτές.

6.2 Μέρος 2^ο

Προκειμένου να διερευνηθεί η γεωχημική συμπεριφορά του As σε επιφανειακά εδάφη του Λαυρίου, εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικά πρωτόκολλα διαδοχικών εκχυλίσεων, Wenzel και BCR. Στη μέθοδο Wenzel, το υψηλότερο ποσοστό του As εκχυλίστηκε από τα άμορφα και κρυσταλλικά οξείδια των Fe, Al, Mn, ενώ στη μέθοδο BCR η υψηλότερη ποσότητα του As βρέθηκε στην υπολειμματική φάση. Σύμφωνα με τον συντελεστή κινητικότητας που υπολογίστηκε και με τις δυο μεθόδους κλασμάτωσης, η κινητικότητα του As στα επιφανειακά εδάφη του Λαυρίου βρέθηκε χαμηλή.

Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του μη ειδικώς προσροφημένου (W1) και του αναλώγιμου (W3 / W4) κλάσματος του As της μεθόδου Wenzel με την άργιλο, και τα άμορφα και ελεύθερα οξείδια του Fe αντίστοιχα, επιβεβαιώνουν ότι τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο Wenzel στοχεύουν επιτυχώς στις αντίστοιχες φάσεις του εδάφους. Αντιθέτως, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο BCR απέτυχαν να επιδείξουν παρόμοιες σχέσεις, κυρίως λόγω της ατελούς διαλυτοποίησης των οξειδίων του Fe, Mn από την υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (στάδιο B2) με αποτέλεσμα την εκχύλιση μειωμένων ποσοτήτων As

στην αναγωγή φάση. Ωστόσο, σε περιπτώσεις που η μέθοδος κλασμάτωσης BCR χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη γεωχημική συμπεριφορά πολλών μετάλλων ταυτόχρονα σε ρυπασμένα εδάφη, μπορεί να παρέχει μια πρώτη και σχετικά αξιόπιστη ένδειξη της διαθεσιμότητας του As.

6.3 Μέρος 3^ο

Διεξήχθη πείραμα επώασης χρησιμοποιώντας επιβαρυνόμενο με βαρέα μέταλλα έδαφος, από την τοποθεσία Θορικό, στην ευρύτερη περιοχή του Λαυρίου, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του Na₂-EDTA, του Διθειονώδους νατρίου, των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (Olive Mill Wastewaters, OMW) και των συνδυασμών τους, στην διαθεσιμότητα των As, Pb και Zn, με τον χρόνο. Το EDTA και οι συνδυασμοί του αύξησαν την διαθεσιμότητα των υπό μελέτη στοιχείων, ενώ το διθειονώδες νάτριο και τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων επέδειξαν φτωχά αποτελέσματα. Επιπλέον, το διθειονώδες νάτριο σε συνδυασμό με το EDTA, φαίνεται ότι ανέστειλε τη χηλικοποιητική δράση του EDTA. Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων, λειτουργώντας τόσο ως χηλικοποιητικό όσο και ως αναγωγικό μέσο, αύξησαν τη διαλυτότητα του As. Σε συνδυασμό όμως με τις άλλες μεταχειρίσεις, η εφαρμογή OMW οδήγησε σε αντιφατικά αποτελέσματα ως προς την κινητικότητα των As, Pb και Zn, λειτουργώντας είτε θετικά είτε αρνητικά κατά περίπτωση στη δραστηριότητα του Διθειονώδους νατρίου και του EDTA. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των διαδοχικών εκχυλίσεων, BCR και Wenzel, έδειξε ότι το EDTA εκχυλίζει αποτελεσματικά τα As, Pb και Zn από τα άμορφα οξείδια του Fe και Mn. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA), κατέδειξαν σαφώς ότι οι παρατηρηθείσες αυξημένες διαθέσιμες συγκεντρώσεις των As, Pb και Zn στα

κλάσματα W1 και B1 (οι περισσότερο διαθέσιμες μορφές των στοιχείων) των μεθόδων Wenzel και BCR αντίστοιχα, προήλθαν κυρίως από τη μερική διαλυτοποίηση των οξειδίων του Fe.

6.4 Μέρος 4^ο

Για να διερευνηθεί η δυνατότητα φυτοαπορρύπανσης των επιφανειακών εδαφών του Λαυρίου με τη μέθοδο της ενισχυμένης φυτοεξαγωγής χρησιμοποιώντας το φυτό *Pteris vittata*, διεξήχθη πείραμα με γλάστρες σε περιβάλλον θερμοκηπίου. Τα πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν σαφώς ότι η εφαρμογή Na₂-EDTA 0.01 M σε έδαφος ρυπασμένο με As, Pb και Zn, ενίσχυσε την πρόσληψη των στοιχείων αυτών από τα φυτά φτέρης και λειτούργησε ενισχυτικά στη μεταφορά τους από τις ρίζες στην υπέργεια βιομάζα του φυτού. Σε σύγκριση με τον μάρτυρα, η *P. vittata* εξήγαγε σχεδόν τη διπλάσια ποσότητα As από το έδαφος στη περίπτωση της διπλής δόσης EDTA, γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη φυτοεξαγωγή που μπορεί να οδηγήσει σε αποτελεσματική φυτοαπορρύπανση εδαφών επιβαρυσμένων με As. Επιπλέον, η ίδια μεταχείριση ενίσχυσε σε μεγάλο βαθμό την πρόσληψη των Pb και Zn από τα φυτά. Σύμφωνα με τις ποσότητες των Pb και Zn που εκχυλίστηκαν, το σύστημα EDTA - *P. vittata* φαίνεται να καταφέρνει να μειώσει αποτελεσματικά τη συγκέντρωση των στοιχείων αυτών στο έδαφος, και ιδιαίτερα του Pb. Η εφαρμογή υγρών αποβλήτων ελαιουργείων (OMW) στο έδαφος φαίνεται να αυξάνει μόνο τη πρόσληψη του As από τη φτέρη, χωρίς ταυτόχρονα να δημιουργεί 'stress' στα φυτά. Δεδομένου ότι στις ελαιοπαραγωγικές χώρες, όπως η Ελλάδα, παράγονται μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (OMW), απαιτείται περαιτέρω και ενδελεχής μελέτη για να αξιολογηθεί η δυνατότητα αυτού του παραπροϊόντος της αγροτοβιομηχανίας να

ενισχύει την πρόσληψη του As από το φυτό *P. vittata* και να χρησιμοποιηθεί
ακολούθως για την απορρύπανση εδαφών επιβαρυσμένων με As.

7. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

7.1 *Ξένη Βιβλιογραφία*

- Abad-Valle P, Álvarez-Ayuso E, Murciego A, Muñoz-Centeno LM, Alonso-Rojo P, Villar-Alonso P. 2018. Arsenic distribution in a pasture area impacted by past mining activities. *Ecotoxicol Environ Saf.* 147:228–237.
- Abbas MHH, Abdelhafez Ahmed AA. 2013. Role of EDTA in arsenic mobilization and its uptake by maize grown on an As-polluted soil. *Chemosphere* 90:588–594.
- Abumaizar RJ, Smith EH. 1999. Heavy metal contaminants removal by soil washing. *J. Hazard. Mater.* B70:71-86.
- Akkajit P, Tongcumpou C. 2010. Fractionation of metals in cadmium contaminated soil: Relation and effect on bioavailable cadmium. *Geoderma* 156: 126–132.
- Alexandratos VG, Elzinga EJ, Reeder RJ. 2007. Arsenate uptake by calcite: macroscopic and spectroscopic characterization of adsorption and incorporation mechanisms. *Geochim Cosmochim Acta.* 71:4172–4187.
- Ali H, Khan E, Sajad MA. 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 91: 869–881.
- Alloway BJ. 2013. Heavy Metals in Soils. *Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability.* Environ Pollut. 22.
- Alvarez R, Ordóñez A, Loredó J. 2006. Geochemical assessment of an arsenic mine adjacent to a water reservoir (León, Spain). *Environ Geol* 50:873–884.
- An ZZ; Huang ZC; Lei M; Liao XY, Zheng YM, Chen TB. 2006. Zinc tolerance and accumulation in *Pteris vittata* L. and its potential for phytoremediation of Zn- and As-contaminated soil. *Chemosphere*, 62(5): 796–802.

- Anju M, Banerjee DK. 2010. Comparison of two sequential extraction procedures for heavy metal partitioning in mine tailings. *Chemosphere* 78:1393–1402.
- Arenas-Lago D, Andrade ML, Lago-Vila M, Rodríguez-Seijo A, Vega FA. 2014. Sequential extraction of heavy metals in soils from a copper mine: Distribution in geochemical fractions. *Geoderma* 230–231: 108–118.
- Azbar N, Bayram A, Filibeli A, Muezzinoglu A, Sengul F, Ozer A. 2004. A review of waste management options in olive oil production. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 34: 209–247.
- Baziotis I, Proyer A, Mposkos E. 2009. High-pressure/low-temperature metamorphism of basalts in Lavrion (Greece): Implications for the preservation of peak metamorphic assemblages in blueschists and greenschists. *European Journal of Mineralogy* 21: 133–148.
- Beeston MP, Van Elteren JT, Šlejkovec Z, Glass HJ. 2008. Migration of arsenic from old tailings ponds - A case study on the King Edward Mine, Cornwall, UK. *Environ Res.* 108:28– 34.
- Berger A, Schneider DA, Grasemann B, Stockli D. 2013. Footwall mineralization during Late Miocene extension along the West Cycladic Detachment System, Lavrion, Greece. *Terra Nova* 25: 181–191.
- Bolan N, Kunhikrishnan A, Thangarajan R, Kumpiene J, Park J, Makino T, Kirkham MB, Scheckel K. 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize?. *J. Hazard. Mater.* 266: 141– 166.
- Borggaard OK. 1982. Selective Extraction of Amorphous Iron Oxides by EDTA from Selected Silicates and Mixtures of Amorphous and Crystalline Iron Oxides. *Clay Miner.* 17: 365-368.

- Bouyoucos GH. 1951. A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soils. *Agronomy Journal* 43: 434–438.
- Brümmer GW, Gerth J, Tiller KG. 1988. Reaction kinetics of the adsorption and desorption of nickel, zinc, cadmium by goethite. *Soil Science* 39: 37-52.
- Buekers J, Van Laer L, Amery F, Van Buggenhout S, Maes A, Smolders E. 2007. Role of soil constituents in fixation of soluble Zn, Cu, Ni and Cd added to soils. *European Journal of Soil Science* 58(6):1514–1524.
- Buschmann J, Kappeler A, Lindauer U, Kistler D, Berg M, Sigg L. 2006. Arsenite and arsenate binding to dissolved humic acids: influence of pH type of humic acid, and aluminum. *Environ Sci Technol.* 40:6015–6020.
- Caille N, Swanwick S, Zhao FJ, McGrath SP. 2004. Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* from arsenic contaminated soils and the effect of liming and phosphate fertilization. *Environ Pollut.* 132:113-120.
- Camizuli E, Monna F, Bermond A, Manouchehri N, Besançon S, Losno R, Van Oort F, Labanowski J, Perreira A, Chateau C, Alibert P. 2014. Impact of historic mining assessed in soils by kinetic extraction and lead isotopic ratios. *Science of the Total Environment* 472: 425–436.
- Chang SC, Jackson ML. 1957. Fractionation of soil phosphorus. *Soil Sci.* 84:133–144.
- Chartzoulakis K, Psarras G, Moutsopoulou M, Stefanoudaki E. 2010. Application of olive mill wastewater to a Cretan olive orchard: Effects on soil properties, plant performance and the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 138: 293–298.
- Chen TB, Wei CY, Huang ZC, Huang QF, Lu QG, Fan ZL. 2002. Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chin. Sci. Bull.* 47: 902–905.

- Chen YH, Mao Y, He SB, Guo P, Xu K. 2007. Heat stress increases the efficiency of EDTA in phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* 67: 1511-1517.
- Cheng H, Hu Y, Luo J, Zhao J. 2008. Geochemical processes controlling fate and transport of arsenic in acid mine drainage (AMD) and natural systems. *J Hazard Mater.* 165:13–26.
- Chuan MC, Shu GY, Liu JC. 1996. Solubility of heavy metals in a contaminated soil: effects of redox potential and pH. *Water Air Soil Pollut.* 90: 543-556.
- Clemente R, Bernal MP. 2006. Fractionation of heavy metals and distribution of organic carbon in two contaminated soils amended with humic acids. *Chemosphere* 64: 1264–1273
- de la Fuente C, Clemente R, Martínez-Alcalá I, Tortosa G, Bernal MP. 2011. Impact of fresh and composted solid olive husk and their water-soluble fractions on soil heavy metal fractionation, microbial biomass and plant uptake. *J. Hazard. Mater.* 186: 1283–1289.
- Delgado J, Barba-Brioso C, Nieto JM, Boski T. 2011. Speciation and ecological risk of toxic elements in estuarine sediments affected by multiple anthropogenic contributions (Guadiana saltmarshes, SW Iberian Peninsula): I. Surficial sediments. *Science of the Total Environment* 409: 3666–3679.
- Demetriades A, Li XD, Ramsey MH, Thornton I. 2010. Chemical speciation and bioaccessibility of lead in surface soil and house dust, Lavrion urban area, Attiki, Hellas. *Environmental Geochemistry and Health* 32: 529–552.
- Demetriades A. 1999. Geochemical atlas of the Lavrion urban area for environmental protection and planning. Volume 2. Institute of Geology and Mineral Exploration, Athens, Open File Report.

- Demetriades A. 2010. Medical geology in Hellas: the Lavrion urban environmental pollution study. In O Selinus, RB Finkelman and JA Centeno (Eds.), *Medical Geology: a Regional Synthesis*, Springer, Dordrecht, 355–390.
- Demetriades A, Stavrakis P, Vergou-Vichou K. 1996. Contamination of surface soil of the Lavreotiki peninsula (Attiki, Greece) by mining and smelting activities. *Mineral Wealth* 98: 7-15.
- Dousis P, Anastopoulos I, Gasparatos D, Ehaliotis C, Massas I. 2013. Effects of Time and Glucose-C on the Fractionation of Zn and Cu in a Slightly Acidic Soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 44: 722–732.
- Drahota P, Grösslová Z, Kindlová H. 2014. Selectivity assessment of an arsenic sequential extraction procedure for evaluating mobility in mine wastes. *Anal Chim Acta.* 839:34–43.
- Dybowska A, Farago M, Valsami-Jones E, Thornton I. 2005. Operationally defined associations of arsenic and copper from soil and mine waste in south-west England. *Chem Spec Bioavailab.* 17(4):147-160.
- Echeverria JC, Morera MT, Mazikara'n C, Garrido JJ. 1998. Competitive sorption of heavy metals by soils. Isotherms and fractional factorial experiments. *Environmental Pollution* 101:275–284.
- European Commission 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- Evangelou MWH, Ebel M, Schaeffer A. 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, 68: 989–1003.

FAOSTAT 2013. Food and Agriculture Organisation database. Available from:
<http://faostat.fao.org>.

Favas PJC, Pratas J, Gomes MEP, Cala V. 2011. Selective chemical extraction of heavy metals in tailings and soils contaminated by mining activity: Environmental implications. *Journal of Geochemical Exploration* 111: 160–171.

Fayiga AO, Saha UK. 2016. Arsenic hyperaccumulating fern: Implications for remediation of arsenic contaminated soils. *Geoderma*, 284:132–143.

Fiorentino A, Gentili A, Isidori M, Monaco P, Nardelli A, Parrella A, Temussi F. 2003. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *J. Agric. Food Chem.* 51.

Gamaletsos P, Godelitsas A, Dotsika E, Tzamos E, Göttlicher J, Filippidis A. 2013. Geological Sources of As in the Environment of Greece: A Review. Threats to the Quality of Groundwater Resources: Prevention and Control, *Hdb. Env Chem.* 40: 77–114.

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

Gasparatos D, Haidouti C. 2001. A comparison of wet oxidation methods for determination of total phosphorus in soils. *J Plant Nutr Soil Sci.* 164:435–439.

Gasparatos D, Mavromati G, Kotsovilis P, Massas I. 2015. Fractionation of heavy metals and evaluation of the environmental risk for the alkaline soils of the Thriassio plain: a residential, agricultural and industrial area in Greece. *Environ Earth Sci.* 74: 1099-1108.

- Gasparatos D. 2012. Fe-Mn concretions and nodules to sequester heavy metals in soils. In: Lichtfouse E (eds) Environmental Chemistry for a Sustainable World, Vol 2: Remediation of Air and Water Pollution. Springer Science + Business Media B.V; p. 443–474.
- Gasparatos D. 2013. Sequestration of heavy metals from soil with Fe-Mn concretions and nodules. Environ. Chem. Lett. 11: 1–9.
- Gault AG, Cooke DR, Townsend AT, Charnock JM, Poly DA. 2003. Mechanisms of arsenic attenuation in acid mine drainage from Mount Bischoff, western Tasmania. Sci Total Environ. 345:219–228.
- Gedik K, Kongchum M, Boran M, Delaune RD. 2016. Adsorption and desorption of arsenate in Louisiana rice soils. Arch Agron Soil Sci. 62(6):856-864.
- Ghestem JP, Bermond A. 1998. EDTA extractability of trace metals in polluted soils: A chemical–physical study. J. Environ. Technol. 19: 409-416
- Gleyzes C, Tellier S, Astruc M. 2002. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. Trends in Analytical Chemistry 21: 451–467.
- Gonzaga MIS, Santos JAG, Ma LQ. 2008. Phytoextraction by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. from six arsenic-contaminated soils: Repeated harvests and arsenic redistribution. Environ. Pollut. 154(2): 212–218.
- Guillén MT, Delgado J, Albanese S, Nieto JM, Lima A, De Vivo B. 2012. Heavy metals fractionation and multivariate statistical techniques to evaluate the environmental risk in soils of Huelva Township (SW Iberian Peninsula). Journal of Geochemical Exploration 119–120: 32–43.
- Gupta DK, Srivastava S, Huang H, Romero-Puertas MC, Sandalio LM. 2011. Arsenic tolerance and detoxification mechanisms in plants. In: Sherameti I, Varma A.

- (Eds.), *Detoxification of Heavy Metals* (Book Series: Soil Biology). Heidelberg: Springer; p. 169–180.
- Hooda PS, Alloway BJ. 1998. Cadmium and lead sorption behaviour of selected English and Indian soils. *Geoderma* 84:121–134.
- Hooda PS. 2010. Trace elements in soils. School of Geography, Geology and the Environment, Kingston University London, UK.
- Jacquat O, Voegelin A, Kretzschmar R. 2009. Soil properties controlling Zn speciation and fractionation in contaminated soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73(18):5256–5272.
- January MC, Cutright TJ, Van Keulen H, Wei R. 2008. Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals? *Chemosphere*, 70: 531–537.
- Jelusic M, Lestan D. 2014. Effect of EDTA washing of metal polluted garden soils. Part I: Toxicity hazards and impact on soil properties. *Sci. Total Environ.* 475: 132–141.
- Jones JB, Jr, Case VW. 1990. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. In *Soil Testing and Plant Analysis*; Westerman, R.L., Ed.; SSSA, Inc.: Madison, WI, USA; pp. 389–427.
- Kabala C, Singh BR. 2001. Fractionation and mobility of copper, lead, and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter. *J Environ Qual.* 30:485–492.
- Kabata-Pendias A, Krakowiak A. 1995. Soils parameters as a base for the calculation of background heavy metal status, *Int. Conf. Heavy Metals in the Environment*, Wilkens, R.-D., Förstner, U., and Knöchel, A., Eds., 1:398.
- Kabata-Pendias A, Pendias H. 2001. *Trace elements in soils and plants* (3rd Ed.). Boca Raton: CRC.

- Karpouzas DG, Ntougias S, Iskidou E, Rousidou C, Papadopoulou K, Zervakis G, Ehaliotis C. 2010. Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities. *Appl. Soil Ecol.* 45: 101–111.
- Karpouzas DG, Rousidou C, Papadopoulou KK, Bekris F, Zervakis G, Singh BK, Ehaliotis C. 2009. Effect of continuous olive mill wastewater applications, in the presence and absence of N fertilization, on the structure of rhizosphere soil fungal communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70: 56–69.
- Kerndorff H, Schnitzer M. 1980. Sorption of metals on humic acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44:1701–1708.
- Kidd P, Barceló J, Bernal MP, Navari-Izzo F, Poschenrieder C, Shilev S, Clemente R, Monterroso C. 2009. Trace element behavior at the root–soil interface: Implications in phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.* 67: 243–259.
- Kim EJ, Baek K. 2015. Enhanced reductive extraction of arsenic from contaminated soils by a combination of dithionite and oxalate. *J. Hazard. Mater.* 284: 19-26.
- Kim EJ, Jeon EK, Baek K. 2016. Role of reducing agent in extraction of arsenic and heavy metals from soils by use of EDTA. *Chemosphere* 152: 274:283.
- Kim EJ, Yoo JC, Baek K. 2014. Arsenic speciation and bioaccessibility in arsenic-contaminated soils: Sequential extraction and mineralogical investigation. *Environ Pollut.* 186:29-35.
- Kim JY, Davis AP. 2003. Stabilization of Available Arsenic in Highly Contaminated Mine Tailings Using Iron. *Environ Sci Technol.* 37(1):189–195.
- Kontopoulos A, Komnitsas K, Xenidis A, Papassiopi N. 1995. Environmental characterisation of the sulfidic tailings in Lavrion. *Minerals Engineering* 8: 1209–1219.

- Kwon JC, Nejad ZD, Jung MC. 2017. Arsenic and heavy metals in paddy soil and polished rice contaminated by mining activities in Korea. *Catena* 148: 92–100.
- Larios R, Fernández-Martínez R, Rucandio I. 2012. Comparison of three sequential extraction procedures for fractionation of arsenic from highly polluted mining sediments. *Anal Bioanal Chem.* 402:2909–2921.
- Larios R, Fernández-Martínez R, Rucandio I. 2013. Assessment of a sequential extraction procedure for arsenic partitioning and application to samples from different pollution sources. *Anal Methods.* 5:4096–4104.
- Lessl JT, Luo J, Ma LQ. 2014. *Pteris vittata* continuously removed arsenic from non-labile fraction in three contaminated-soils during 3.5-year of phytoextraction. *J. Hazard. Mater.* 279:485–492.
- Lestan D, Luo CL, Li XD. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environ. Pollut.* 153:3–13.
- Lin C, Tong X, Lu W, Yan L, Wu Y, Nie C, Chu C, Long J. 2005. Environmental impacts of surface mining on mined lands, affected streams and agricultural lands in the Dabaoshan mine region, southern China. *Land Degradation & Development* 16: 463–474.
- Liu G, Cai Y. 2007. Arsenic speciation in soil: an analytical challenge for understanding arsenic biogeochemistry. In Sarkar D, Hannigan R, Datta R. (Eds.). *Developments in Environmental Sciences, Vol. 5: Concepts and Applications in Environmental Geochemistry.* Elsevier; p. 687-711.
- Liu G, Tao L, Liu X, Hou J, Wang A, Li R. 2013. Heavy metal speciation and pollution of agricultural soils along Jishui River in non-ferrous metal mine area in Jiangxi Province, China. *Journal of Geochemical Exploration* 132: 156–163.

- Loeppert RH, Suarez DL. 1996. Carbonate and gypsum. In JM Bigham and JM Bartels (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods*, SSSA, ASA, Madison, WI, 437–474.
- Lombi E, Sletten RS, Wenzel WW. 2000. Sequentially extracted arsenic from different size fractions of contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 124: 319-332.
- Ma J, Lei E, Lei M, Liu Y, Chen T. 2018. Remediation of Arsenic contaminated soil using malposed intercropping of *Pteris vittata* L. and maize. *Chemosphere*, 194:737–744.
- Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W, Cai Y, Kennelley ED. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409: 579.
- Madrid L, Diaz-Barrientos E. 1994. Retention of heavy metals by soils in the presence of a residue from olive-oil industry. *European J. Soil Sci.* 45: 71–77.
- Mahar A, Wang P, Ali A, Awasthi MK, Lahori AH, Wang Q, Li R, Zhang Z. 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 126:111–121.
- Manouchehri N, Bermond A. 2009. EDTA in Soil Science: A Review of its Application in Soil Trace Metal Studies. *Terr. Aquat. Environ. Toxicol.* 3(1):1-15.
- Margesin R, Schinner F. 2005. *Manual for Soil Analysis - Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*. Springer Science & Business Media.
- Marinos GP, Petrascheck WE. 1956. Laurium. *Geological & Geophysical Research* 4/1, Institute for Geology and Subsurface Research, 1–247.
- Martinez CE, Motto HL. 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution* 107: 153–158.

- Martínez-Sánchez MJ, Navarro MC, Pérez-Sirvent C, Marimón J, Vidal J, García-Lorenzo ML, Bech J. 2008. Assessment of the mobility of metals in a mining-impacted coastal area (Spain, Western Mediterranean). *Journal of Geochemical Exploration* 96:171–182.
- Massas I, Gasparatos D, Ioannou D, Kalivas D. 2018. Signs for secondary buildup of heavy metals in soils at the periphery of Athens international airport, Greece. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(1): 658-671.
- Massas I, Kalivas D, Ehaliotis C, Gasparatos D. 2013. Total and available heavy metal concentrations in soils of the Thriassio plain (Greece) and assessment of soil pollution indexes. *Environ Monit Assess* 185: 6751–6766.
- Matera V, Hecho IL, Laboudigue A, Thomas P, Tellier S, Astruc M. 2003. A methodological approach for the identification of arsenic bearing phases in polluted soils. *Environ Pollut.* 126:51–64.
- McBride MB, Blasiak JJ. 1979. Zinc and copper solubility as a function of pH in an acid soil. *Soil Science Society of America Journal* 43: 866–870.
- McBride MB. 1994. *Environmental chemistry of soils* (pp. 336–337). New York: Oxford University Press.
- McBride, M. 1987. Adsorption and oxidation of phenolic compounds by iron and manganese oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51:1466–1472.
- McGrath SP, Zhao J, Lombi E. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Adv. Agron.* 75, 1–56.
- Meers E, Ruttens A, Hopgood MJ, Samson D, Tack FMG. 2005. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* 58:1011–1022.

- Mehra OP, Jackson ML. 1960. Iron Oxide Removal from Soils and Clay by a Dithionite-Citrate System Buffered with Sodium Bicarbonate. *Clays and clay Min.* 7:317.
- Mekki A, Dhouib A, Sayadi S. 2013. Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 2:1–7.
- Misopolinos N, Silleos N, Kosmas K, Bilas G, Karapetsas N, Dionisiou N. 2015. Development of an integrated system for soil geographic data and delineation of agricultural zones in Greece. Funded by Payment and Control Agency for Guidance and Guarantee Community Aid (OPEKEPE) of the Greek Ministry of Agricultural Development and Food.
- Morillo JA, Antizar-Ladislao B, Monteoliva-Sánchez M, Ramos-Cormenzana A, Russell NJ. 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 25–39.
- Mühlbachová G. 2011. Soil microbial activities and heavy metal mobility in long-term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. *Ecol. Eng.* 37: 1064–1071.
- Müller K, Daus B, Morgenstern P, Wennrich R. 2007. Mobilization of Antimony and Arsenic in Soil and Sediment Samples – Evaluation of Different Leaching Procedures. *Water Air Soil Pollut.* 183(1–4):427–436.
- Nannoni F, Protano G, Riccobono F. 2011. Fractionation and geochemical mobility of heavy elements in soils of a mining area in northern Kosovo. *Geoderma* 161: 63–73.
- Nelson DW, Sommers LE. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds) *Methods of soil analysis. Part 2: chemical and microbiological properties.* ASA, SSSA, Madison, WI, USA.

- Netherlands Ministry of Housing, Physical Planning and Environment (Netherlands MHPPE) 2000. Annexes circular on target values and intervention values for soil remediation. The Netherlands: MHPPE.
- Neugschwandtner RW, Tlustos P, Komárek M, Száková J. 2008. Phytoextraction of Pb and Cd from a contaminated agricultural soil using different EDTA application regimes: laboratory versus field scale measures of efficiency. *Geoderma* 144: 446–454.
- NF ISO 10693 1995. Détermination de la teneur en carbonate – Méthode volumétrique. *Qualité des sols AFNOR*, 177–186.
- Nowack B. 2002. Environmental chemistry of aminopolycarboxylate chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 36:4049-4016.
- Nriagu JO. 1978. The biogeochemistry of lead (pp. 18–88). Amsterdam: Elsevier.
- Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS, Dean LA. 1954. Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate, 939. Washington, DC: US Dept Agric Circ.
- Padmavathiamma PK, Li LY. 2007. Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water Air Soil Pollut.* 184:105–126.
- Pardo T, Bernal P, Clemente R. 2017. The use of olive mill waste to promote phytoremediation. *Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management*, pp. 183-204.
- Passariello B, Giuliano V, Quaresima S, Barbaro M, Caroli S, Forte G. 2002. Evaluation of the environmental contamination at an abandoned mining site. *Microchemical Journal* 73: 245–250.

- Paul CJ, Khan FA, Puls RW. 2003. Chapter 16 – In Situ Reduction of Chromium-Contaminated Groundwater, Soils, and Sediments by Sodium Dithionite. Applications to Radionuclides, Trace Metals, and Nutrients, pp. 465–493.
- Pérez-López R, Álvarez-Valero AM, Nieto JM, Sáez R, Matos JX. 2008. Use of sequential extraction procedure for assessing the environmental impact at regional scale of the São Domingos Mine (Iberian Pyrite Belt). *Applied Geochemistry* 23:3452–3463.
- Quevauviller Ph. 2002. Methodologies in Soil and Sediment Fractionation Studies, Single and Sequential Extraction Procedures. The Royal Society of Chemistry.
- Rauret G, López-Sánchez JF, Sahuquillo A, Rubio R, Davidson C, Ure A, Quevauviller Ph. 1999. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *Journal of Environmental Monitoring* 1: 57–61.
- Redman A, Macalady D, Ahmann D. 2002. Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. *Environ Sci Technol.* 36(13):2889–2896.
- Rhoades JD. 1982. Cation Exchange Capacity. In A.L. Page et al. (ed.) *Methods of soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*, 2nd ed, Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI; p. 149-157.
- Rodríguez L, Ruiz E, Alonso-Azcarate J, Rincon J. 2009. Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in Spain. *Journal of Environmental Management* 90: 1106–1116.
- Rodríguez RR, Basta NT, Casteel SW, Armstrong FP, Ward DC. 2003. Chemical extraction methods to assess bioavailable arsenic in soil and solid media. *J Environ Qual.* 32:876–884.

- Romero E, Benítez E, Nogales R. 2005. Suitability of Wastes from Olive-Oil Industry for Initial Reclamation of a Pb/Zn Mine Tailing. *Water Air Soil Pollut.* 165(1-4):153-165.
- Root RA, Hayes SM, Hammond C, Maier RM, Chorover J. 2015. Toxic metal(loid) speciation during weathering of iron sulfide mine tailings under semi-arid climate. *Appli Geochem.* 62:131-149.
- Sarwar N, Imran M, Shaheen MR, Ishaque W, Kamran MA, Matloob A, Rehim A, Hussain S. 2017. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere* 171:710-721.
- Scheffer C, Vanderhaeghe O, Lanari P, Tarantola A, Ponthus L, Photiades A, France L. 2016. Syn to post-orogenic exhumation of high-grade nappes: structure and thermobarometry of the western Attic-Cycladic metamorphic complex (Lavrion, Greece). *Journal of Geodynamics* 96: 174–193.
- Schwertmann U, Taylor RM. 1989. Iron Oxides. In Dixon JB and Weed SB (Eds.), *Minerals in Soil Environments*, SSA, Madison, WI, 380–438.
- Sheoran V, Sheoran A, Poonia P. 2011. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41:168–214.
- Shuman LM. 1982. Separating soil iron - and manganese - oxide fractions for microelement analysis. *Soil Sci Soc Am J.* 46:1099–1102.
- Skarpelis N, Argyraki A, Grypioti A. 2009. Characterization of sources of inhalable particulate matter (PM10) in the old processing and smelting site of Lavrion, Greece. *Goldschmidt 2009, Davos, Switzerland, Special Supplement Geoch. et Cosmoch. Acta* 73, no 13S, p. A 1324.

- Skarpelis N, Argyraki A. 2009. Geology and Origin of Supergene Ore at the Lavrion Pb-Ag-Zn Deposit, Attica, Greece. *Resource Geology* 59: 1–14.
- Skarpelis N, Argyraki A. 2009. The geology and origin of supergene ores in Lavrion (Attica, Greece), *Resource Geology*, 59:1-14.
- Skarpelis N, Triantafyllidis S, Baziotis I. 2004. Acid rock drainage in the mine of Lavrion, Greece *Advances in Mineral Resources Management and Environmental Geotechnology*, Hania 2004, Greece, 531.
- Skarpelis N, Tsikouras B, Pe-Piper G. 2008. The Miocene igneous rocks in the Basal Unit of Lavrion (SE Attica, Greece): petrology and geodynamic implications. *Geol. Mag.* 145 (1):1–15.
- Skarpelis N. 2007. The Lavrion deposit (SE Attika, Greece): geology, mineralogy and minor elements chemistry. *Neues Jahrbuch für Mineralogie* 183: 227–249.
- Spry PG, Mathur RD, Bonsall TA. 2014. Re-Os Isotope Evidence for Mixed Source Components in Carbonate-Replacement Pb-Zn-Ag Deposits in the Lavrion District, Attica, Greece. *Mineralogy and Petrology* 108: 503–513.
- Thanabalasingam P, Pickering W. 1986. Arsenic sorption by humic acids. *Environ Pollut.* 12(3):233–246.
- Udovic M, Lestan D. 2012. EDTA and HCl leaching of calcareous and acidic soils polluted with potentially toxic metals: Remediation efficiency and soil impact. *Chemosphere* 88:718–724.
- Vamerali T, Bandiera M, Mosca G. 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. *Environ. Chem. Lett.* 8, 1–17.
- Van Herreweghe S, Swennen R, Vandecasteele C, Cappuyens V. 2003. Solid phase speciation of arsenic by sequential extraction in standard reference materials and industrially contaminated soil samples. *Environ Pollut.* 122:323–342.

- Varadachari C, Goswami G, Chosh K. 2006. Dissolution of iron oxides. *Clay Res.* 25:1-19.
- Vaxevanidou K, Papassiopi N, Paspaliaris I. 2008. Removal of heavy metals and arsenic from contaminated soils using bioremediation and chelant extraction techniques. *Chemosphere*, 70:1329–1337.
- Violante A, Pigna M. 2002. Competitive sorption of arsenate and phosphate on different clay minerals and soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66(6):1788–1796.
- Voudouris P, Melfos V, Spry PG, Bonsall TA, Tarkian M, Solomos Ch. 2008. Carbonate-replacement Pb–Zn–Ag±Au mineralization in the Kamariza area, Lavrion, Greece, Mineralogy and thermochemical conditions of formation. *Mineralogy and Petrology* 94: 85–106.
- Wan XM, Lei M, Chen TB, Zhou GD, Yang J, Zhou XY, Zhang X, Xu RX 2014. Phytoremediation potential of *Pteris vittata* L. Under the combined contamination of As and Pb: Beneficial interaction between As and Pb. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21:325–336.
- Wenzel W, Brandstetter A, Brauner E, Jockwer F, Lombi E, Mushtaq A, Kirchbaumer N, Schnepf A, Tulipan M, Unterfrauner H, Valersi T, Wutte H, Stingeder G, Prohaska T, Sletten R. 1998. Arsenic in soils of Austria (Forschungsbericht). Forschungsprojekt der Bund/Bundeslander-Kooperation, im Auftrag des Landes Salzburg, Abteilung Land - und Forstwirtschaft.
- Wenzel W, Brandstetter A, Wutte H, Lombi E, Prohaska T, Stingeder G, Adriano DC. 2002. Arsenic in field-collected soil solutions and extracts of contaminated soils and its implication to soil standards. *J Plant Nutr Soil Sci.* 165:221-228.

- Wenzel W, Kirchbaumer N, Prohaska T, Stingeder G, Lombi E, Adriano D. 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Anal Chim Acta*. 436(2):309–323.
- Wenzel W, Kirchbaumer N, Prohaska T, Stingeder G, Lombi E, Adriano D. 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta*. 436(2):309–323.
- Williams PN, Zhang H, Davison W, Meharg AA, Hossain M, Norton GJ, Islam MR, Brammer H. 2011. Organic matter-solid phase interactions are critical for predicting arsenic release and plant uptake in Bangladesh paddy soils. *Environmental Science & Technology* 45: 6080–6087.
- Willscher S, Jablonski L, Fona Z, Rahmi R, Wittig J. 2017. Phytoremediation experiments with *Helianthus tuberosus* under different pH and heavy metal soil concentrations. *Hydrometallurgy*, 168:153–158.
- Xenidis A, Papassiopi N, Komnitsas K. 2003. Carbonate-rich mining tailings in Lavrion: risk assessment and proposed rehabilitation schemes. *Adv Environ Res*. 7:479–494.
- Xiao X, Chen T, An Z, Lei M, Huang Z, Liao X, Liu Y. 2008. Potential of *Pteris vittata* L. for phytoremediation of sites co-contaminated with cadmium and arsenic: The tolerance and accumulation. *J. Environ. Sci.* 20:62–67.
- Yao Z, Li J, Xie H, Yu C. 2012. Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. *Procedia Environ. Sci.* 16:22–729.
- Yolcubal I, Akyol NH. 2008. Adsorption and transport of arsenate in carbonate-rich soils: Coupled effects of nonlinear and rate-limited sorption. *Chemosphere* 73:1300–1307.

- Zeien H, Brümmer G. 1991. Ermittlung der Mobilität und Bindungsformen von Schwermetallen in Böden mittels Sequentieller Extraktionen [Determination of the mobility and the binding forms of heavy metals in soils using sequential extractions]. Mitt Dtsch Bodenk Ges. 66(I):439–442. German.
- Zhang Y, Wan X, Lei M. 2017. Application of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. to contaminated soil in Northern China. J. Geochem. Explor. 182:132–137.
- Zimmerman AJ, Weindorf DC. 2010. Heavy Metal and Trace Metal Analysis in Soil by Sequential Extraction: A Review of Procedures. Int. J. Anal. Chem. Art. ID: 387803.

7.2 *Ελληνική Βιβλιογραφία*

- Γρυπιώτη Α. 2009. Διερεύνηση αιωρούμενων σωματιδίων PM10 στην οικιστική περιοχή Λαυρίου. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστημίου Αθηνών, σελ. 98.
- Δερμάτης Γ. 1994. Τοπίο και μνημεία της Λαυρεωτικής. Έκδοση Δήμου Λαυρεωτικής.
- Κανναβού Α. 2009. Διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας αέρος και της ρύπανσης του εδάφους με μόλυβδο στη σύνθεση της βλάστησης περιοχών της Λαυρεωτικής Χερσονήσου. Διδακτορική Διατριβή, σελ. 224.
- Κατερινόπουλος Α, Ζησιμοπούλου Ε. 1994. Ορυκτά των μεταλλείων Λαυρίου. Εταιρεία Συλλεκτών Ορυκτών και Απολιθωμάτων, Αθήνα
- Κονοφάγος Κ. 1980. Το Αρχαίο Λαύριο και η Ελληνική τεχνική παραγωγή του αργύρου. Εκδοτική Αθηνών 223-246.
- Σκαρπέλης Ν. 2002. Εισαγωγή στην Κοιτασματολογία. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΑΡΘΡΑ

Άρθρο 1^ο

Kalyvas G, Gasparatos D, Papassiopi N, Massas I. 2018. Top soil pollution as ecological footprint of historical mining activities in Greece. *Land degradation and Development* 29:2025-2035. <https://doi.org/10.1002/ldr.2963>

Άρθρο 2^ο

Kalyvas G, Gasparatos D, Massas I. 2018. A critical assessment of arsenic partitioning in mine-affected soils by using two sequential extraction protocols. *Archives of Agronomy and Soil Science* 64(11):1549-1563. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1443443>

Άρθρο 3^ο

Single and combined effect of chelating, reducing agents and agro-industrial by-product treatments on As, Pb and Zn mobility in a mine affected soil over time. Σε διαδικασία αξιολόγησης στο περιοδικό *Journal of Soils and Sediments*.

Άρθρο 4^ο

Kalyvas G, Tsitselis G, Gasparatos D, Massas I. 2018. Efficacy of EDTA and Olive Mill Wastewater to enhance As, Pb, and Zn phytoextraction by *Pteris vittata* L. from a soil heavily polluted by mining activities. *Sustainability* 10(6):1962. <https://doi.org/10.3390/su10061962>

SPECIAL ISSUE ARTICLE

Topsoil pollution as ecological footprint of historical mining activities in Greece

Georgios Kalyvas¹ | Dionisios Gasparatos² | Nymphodora Papassiopi³ | Ioannis Massas¹ 

¹Soil Science Laboratory, Agricultural University of Athens, Athens Iera Odos 75, 11855, Greece

²Soil Science Laboratory, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

³Laboratory of Metallurgy, National Technical University of Athens, Athens 15780, Greece

Correspondence

I. Massas, Agricultural University of Athens, Soil Science Laboratory, Iera Odos 75, 11855, Greece.

Email: massas@aua.gr

Abstract

From ancient times until recently, mining and metallurgical activities in the greater Lavrion area, Greece, have resulted in the production of large amounts of metal wastes that enrich the surrounding soils with toxic metal(loid)s. Since the area is inhabited, soil dust inhalation, consumption of vegetables grown on the contaminated soils, and of dairy products from small ruminants grazing in the area, may impose a real threat for the health of the local residents. After more than 3,000 years of mining history, this study is the first report on the chemical partitioning and behavior of Zn, Cu, Ni, Cr, Cd, Pb, and As in the topsoils (0–15 cm) of Lavrion. Community Bureau of Reference (BCR) sequential extraction was applied to 29 topsoil samples and 4 chemical fractions of the studied elements were defined (a) exchangeable/acid soluble (F1), (b) reducible (F2), (c) oxidisable (F3), and (d) residual (RF). Total concentrations of all elements were above the geochemical background. Zinc, Pb, Cd, and As median total concentration values were 4, 9, 1.4, and 17 times higher than the respective intervention thresholds, indicating severe soil pollution. Most of Cd (78.2%), Pb (69.7%), and Zn (53.3%) were found in F1 + F2 sum, suggesting high availability under modified conditions that periodically can occur in soils. Copper, Ni, As, and Cr were mainly associated with the residual fraction. Principal component analysis results showed that F2 fraction of all studied elements was associated to Fe oxides, confirming the crucial role of Fe oxides in metal(loid)s sequestration in the soil matrix.

KEYWORDS

arsenic, BCR sequential extraction, heavy metals, mining areas, soil

1 | INTRODUCTION

Mining is one of the main sources of heavy metals in the environment and results in serious land degradation (Passariello et al., 2002). The large amounts of metal-rich wastes produced from mining and mineral processing activities have become a severe worldwide issue, representing a potentially hazardous risk to environmental and human health.

Although many studies have focused on the ecological impact of mining activity in recently or currently active mining areas (Kwon, Nejad, & Jung, 2017; Lin et al., 2005), much less attention has been paid to the ecological footprint of intense ancient mining activities. Pollution deposited in the soils of ancient mining areas affects the

local ecosystems and therefore it is of great importance to assess metal dynamics and bioavailability in such soils (Camizuli et al., 2014).

This study focuses on one of the most important soil degradation problems in the Mediterranean and addresses the effect of intense mining and metallurgical activities from ancient times until the late 20th century on the quality of the Lavrion topsoils, Greece. The main objectives were (a) to record the total concentrations of Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, and As in the surface soils; (b) to estimate the potential mobility/availability of these metals and As by using the BCR scheme; (c) to discuss on metal(loid)s partitioning in the studied soils; and (d) to utilize cluster and principal component analysis in order to elucidate interelement relationships and elements relations with key soil properties.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study area

The greater Lavrion area is located approximately 60 km SSE of Athens, Attica, Greece, and covers an area of about 150 km² (Figure 1). The annual average air temperature is 17.3 °C with minimum in January (4.2 °C) and maximum in July (26.6 °C). The average annual precipitation is around 360 mm; the highest precipitation occurs in December (85.2 mm) and the lowest in June (4.4 mm). Heavy rain events may occur, especially in November and December. The climate is typically Mediterranean with dry and hot summer periods. The region is hilly to semimountainous and is crossed by small streams. Elevation ranges between sea level and 372 m (Figure 1). Due to the mining and metallurgical activities, the soils of the area are extensively disturbed and eroded in medium and high slopes. Hence, the studied soils are a mixture of residual soils, allochthonous soil materials, and fine-grained metallurgical processing wastes (Demetriades, Li, Ramsey, & Thornton, 2010).

Details of the complex geology of the Lavrion area are provided by Skarpelis (2007), Voudouris et al. (2008), Baziotis, Proyer, and Mposkos (2009), and Scheffer et al. (2016). The Lavrion area occurs in the Attic-Cycladic Crystalline Belt which includes three major tectonometamorphic units: the basal unit, the Cycladic blueschist unit, and the upper unit (Figure 2). According to Spry, Mathur, and Bonsall (2014), the basal unit contains two Late Triassic–Early Jurassic age marble units, the upper and lower marbles, and the Kessariani schists, which contain pods of intercalated marbles and occur between the

upper and lower marbles. The blueschist unit consists of high-pressure, low-temperature metapelites, metasandstones, marbles, metabasic rocks, and minor quartzites that structurally overlie the basal unit. The upper unit has limited exposure and consists of serpentinites, red cherts, and upper Cretaceous limestones. During the Miocene, granodiorite stocks intruded these units with main representative the Plaka stock which is the largest postmetamorphic intrusion in the Lavrion area and is spatially associated with a Cu–Fe skarn (Voudouris et al., 2008).

Lavrion is one of the oldest mining areas in the world and is well known for the exploitation of Pb–Ag-rich ore during ancient times (Spry et al., 2014). The sulfide mineralization in Lavrion has been intensively studied and various types of deposits including intrusion-hosted, skarn, carbonate-replacement, and vein-type ores that are enriched in Pb, Zn, Fe, Cu, As, Sb, Ag, Bi, and Au were described by Skarpelis (2007), Voudouris et al. (2008), and Berger, Schneider, Grasmann, and Stockli (2013). The main ore minerals are Ag-bearing galena, sphalerite, and pyrite accompanied by lesser amounts of chalcopyrite and arsenopyrite. The major mining centers in Lavrion are located at Plaka and Agios Konstantinos (Figure 2). Yet, there are several smaller sulfide deposits in the area.

Three main types of waste materials containing metals and metalloids (Pb, Zn, As, Cd, Cu, Hg, etc.) at high concentrations are identified in Lavrion as the result of intensive mining exploitation and metallurgical activities for over 3,000 years: (a) sulphidic tailings derived from the metallurgical process of flotation; (b) oxidic-carbonaceous-silicates tailings, including mainly wastes from hydromechanical separation stages; and (c) metallurgical slag and sand-blasting wastes. The town

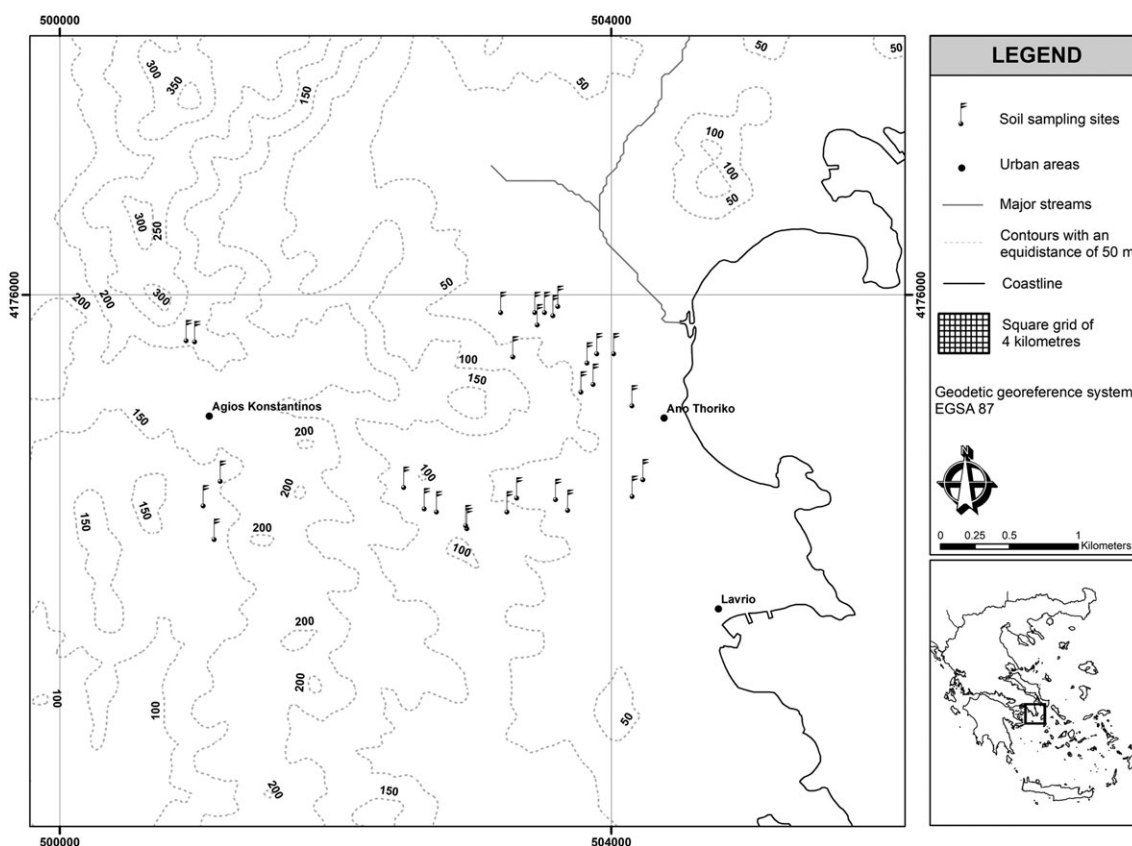


FIGURE 1 Study area, sampling sites, and basic geomorphic features

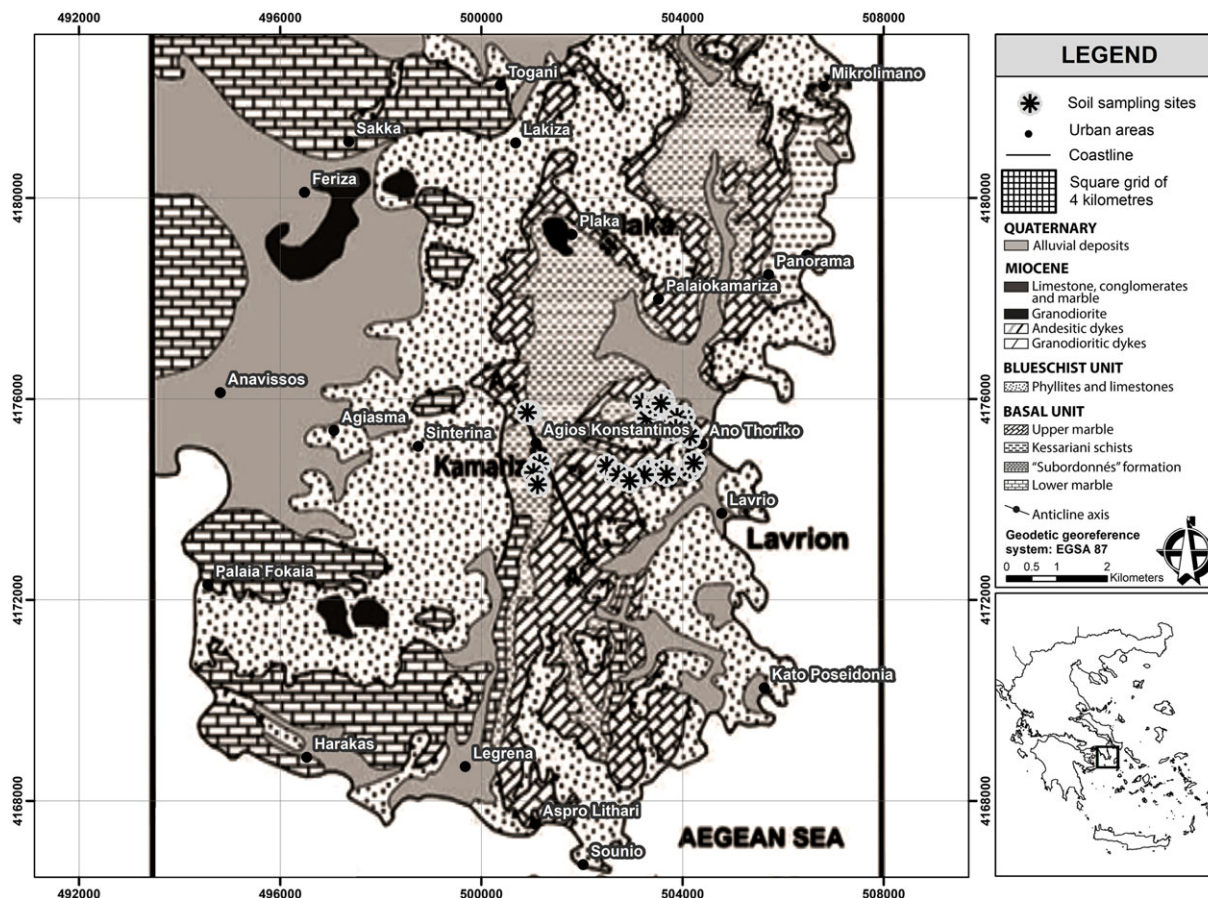


FIGURE 2 Simplified geological map of the Lavrion district (modified after Voudouris et al., 2008) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

of Lavrion, with current population of more than 10,500 inhabitants was developed on or close to waste stockpiles. Nowadays, the land of the area is used for residential, agricultural, or even recreational purposes (Kontopoulos, Komnitsas, Xenidis, & Papassiopi, 1995).

2.2 | Mining history

The mining potential of Lavrion was discovered by the Phoenicians. Findings of litharge (PbO) within a dated stratigraphy on the island of Makronissos, located a few hundred meters from the port of Lavrion, suggest that silver production started around 3,000 BC. However, it was the establishment of city-country institution in ancient Greece around eighth century BC that promoted the intense exploitation of the Lavrion mines.

At 546 BC Peisistratos (a tyrant of Athens) introduced to the ancient markets the first Athenian currency, the silver four drachma coin decorated with Goddess Athena on the one side and the wise owl (glafka) on the other. Silver for the drachma coins was produced in the Lavrion mines. The greatest silver production by that time, estimated as 20 t per year, was achieved during the fifth century BC, the century of Themistocles and Pericles. It is recorded that approximately 20,000 slaves were working under the command of Athenians to produce silver. The silver was used to amplify the leadership of Athens in the Mediterranean and to contribute to the great glory of the city, the so-called golden age. Until the first century BC, the ancient Greeks mined about 13 Mt of ore, from which 1,400,000 t of Pb and

3,500 t of Ag were extracted. From the second century BC until the sixth century AD, mining was practically ceased and only minor slag remelting and secondary treatment of mining wastes was performed. The real rejuvenation of Lavrion as a significant mining area occurred in the middle of the 19th century. By that time, Serpieri-Roux de Frassine Company and the Greek Company of Lavrion Smelters along with the French Mining Company, decided to extract silver lead and iron-manganese ore from the huge amounts of slag and tailings left by the ancient Athenians (estimated at 1.5 and 10 million tons, respectively; Skarpelis & Argyraki, 2009).

In the following years, the French Mining Company exploited undisturbed ledges of smithsonite ($ZnCO_3$) and produced lead until the Second World War; in 1900, 3% of the world lead production was derived from smelters in Lavrion. In fact, smelting processes in the area constituted the first heavy industry in Greece and in the Balkans. Smelting continued less intensively until 1989, when all metallurgical operations in Lavrion ceased (Demetriades, 2010).

2.3 | Soil sampling

Soil contamination maps of the Lavrion area, produced by Demetriades, Stavrakis, and Vergou-Vichou (1996), were used as reference for the selection of the sampling sites. Soil sampling was performed in two areas (Figure 1). The first area is around the industrial facilities of the old French Mining Company (currently Technological Cultural Park of Lavrion). The metallurgical treatment of lead-silver

deposits in these facilities resulted in the production of large amounts of toxic and hazardous metallurgical wastes. These wastes were disposed of without particular precautions in and around the city of Lavrion forming huge heaps (Kontopoulos et al., 1995; Xenidis, Papassiopi, & Komnitsas, 2003). The second area is the wider area of Agios Konstantinos, where the main mining activities occurred. The region is characterized by the shafts, the crushing sites, the washing plants, and the tailings scattered all over the land surface.

To obtain soil samples with a sufficiently wide range of total metal(oid)s concentrations, twenty-nine bulk topsoil samples (0–15 cm) were collected from open spaces, forest and agricultural land. Sampling sites were located relatively close to residential areas and to highly contaminated spots such as stockpiles, tailings, and slag. Each bulk soil sample obtained from the mixing of three subsamples that were collected from a 100 × 100 cm surface area.

2.4 | Analytical methods

The soil samples were air dried and passed through a 2 mm sieve for further analysis. Soil samples used for the sequential extraction procedure passed through a 0.5 mm sieve. Soil pH was measured in 1:1 (w/v) soil/water slurry. Total carbonates were determined by measuring the evolved CO₂ following HCl dissolution (NF ISO 10693, 1995), whereas active carbonate was obtained according to the ammonium oxalate method (Loeppert & Suarez, 1996). Particle size analysis was performed by the Bouyoucos hydrometer method (Bouyoucos, 1951), organic matter was measured by the Walkley–Black procedure (Nelson & Sommers, 1982) and cation exchange capacity was determined by the NaOAc method (Rhoades, 1982). Total free Fe oxides content was obtained by using the sodium citrate–bicarbonate–dithionite method (Mehra & Jackson, 1960). Ammonium oxalate buffer method (Schwertmann & Taylor, 1989) was used for the determination of amorphous and poorly crystallized iron oxides. Aqua regia digestion provided the “pseudototal” metal concentrations that for simplicity are termed as total (Gasparatos & Haidouti, 2001).

2.5 | Sequential extraction

The improved BCR sequential extraction procedure was adopted to determine metals and As speciation in the studied soils (Rauret et al., 1999). Three chemical fractions are operationally defined; exchangeable/acid soluble (F1), reducible (F2), and oxidisable (F3). The residual

fraction (RF) was obtained by aqua regia digestion of the residue from the third extraction step (Table 1).

The percentage recovery for all the studied elements was calculated as follows:

$$\text{Recovery}\% = [(F1 + F2 + F3 + RF)/\text{Total}] \times 100.$$

2.6 | Analytical determinations

The concentrations of Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, and As in the chemical fractions were determined by inductively coupled plasma–mass spectrometry using a Thermo X series II spectrometer. Total concentrations of the studied elements were determined by an atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer 2100). For quality control, internal standards provided by Merck were used, whereas quality assurance of metal analysis was assessed using duplicates and method blanks. Mean recovery values obtained for 103Rh and 185Re inductively coupled plasma–mass spectrometry internal standard reference materials were 104.12% (98.03–111.71%) and 107.59% (102.08–114.44%), respectively. To test the single step aqua regia digestion method, the ERM-CC141 loam soil was used as reference material. The mean recoveries of Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, and As were 104, 95, 95, 106, 104, 97, and 94%, respectively.

2.7 | Statistical analysis

STATISTICA software (Version 10) was used for the performed correlation analysis, principal component and cluster analysis, and the determination of descriptive statistics.

3 | RESULTS

3.1 | Soil physicochemical properties

Descriptive statistics of the main soil physicochemical properties are presented in Table 2. The studied soils were alkaline with a mean pH value of 7.8, reflecting the presence of carbonates that showed a mean content of 89 g kg⁻¹, whereas active carbonate content averaged 13 g kg⁻¹. Most soils are characterized as sandy-clay loam with mean clay, sand, and silt contents of 260, 558, and 181 g kg⁻¹, respectively. The average organic matter content was 26 g kg⁻¹ and cation exchange capacity values were medium to high with a mean of 23.8 cmol_c/kg. Generally, in soils under Mediterranean climate oxidizing

TABLE 1 The BCR sequential extraction scheme

| Step | Fraction | Extractant | Extraction Conditions | Extractant volume for 1 g of soil |
|------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|
| F1 | Exchangeable/acid soluble | Acetic acid 0.11 mol L ⁻¹ | Shaking for 16 hr at 22 ± 5 °C | 40 ml |
| F2 | Bound to Fe–Mn oxides (reducible) | Hydroxylammonium chloride 0.5 mol L ⁻¹ | Shaking for 16 hr at 22 ± 5 °C | 40 ml |
| F3 | Bound to organic matter (oxidisable) | Hydrogen peroxide 8.8 mol L ⁻¹ | Digestion for 1 hr at 85 ± 2 °C in a water bath | 10 + 10 ml |
| | | Ammonium acetate 1.0 mol L ⁻¹ | Shaking for 16 hr at 22 ± 5 °C | 50 ml |
| RF* | Residual | Aqua regia (HCl/HNO ₃) | Digestion for 16 hr | 25 ml |

Note. RF = residual fraction.

*Not included in the BCR specifications.

TABLE 2 Main soil physicochemical properties ($n = 29$)

| | Clay (g kg ⁻¹) | Silt (g kg ⁻¹) | Sand (g kg ⁻¹) | pH (1:1) | CaCO ₃ (g kg ⁻¹) | Act. CaCO ₃ (g kg ⁻¹) | OM (g kg ⁻¹) | CEC (cmol _c kg ⁻¹) | Fed (g kg ⁻¹) | Feo (g kg ⁻¹) | Feo/Fed |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------|
| Mean | 260 | 181 | 558 | 7.8 | 89 | 13 | 26 | 24 | 43.0 | 6.1 | 0.14 |
| Median | 250 | 180 | 568 | 7.9 | 68 | 11 | 23 | 22 | 39.3 | 4.0 | 0.11 |
| Min. | 150 | 80 | 410 | 7.3 | 12 | 0 | 13 | 9 | 26.4 | 2.0 | 0.04 |
| Max. | 430 | 320 | 766 | 8.3 | 236 | 30 | 64 | 37 | 78.3 | 29.8 | 0.67 |
| SD | 73 | 53 | 90 | 0.2 | 66 | 9 | 12 | 6 | 12.1 | 6.0 | 0.14 |
| CV (%) | 28 | 29 | 16 | 3 | 74 | 68 | 46 | 27 | 28 | 98 | 95 |

Note. CEC = cation exchange capacity; OM = Organic Matter.

conditions are favored. In the soils of the studied area good aeration prevails most of the year, but reduced conditions may periodically occur after heavy rain events (most likely during winter).

Mean free (Fed) and amorphous (Feo) iron oxides concentrations were 43.0 and 6.1 g kg⁻¹, respectively. Feo:Fed ratio demonstrates the degree of free iron oxides crystallization and is commonly used as an index of soil development. The values of Feo:Fed ratio ranged between 0.04 and 0.67 pointing to soils with variable amounts of crystalline Fe oxides, most probably as a result of the different types of mining and metallurgical waste materials incorporated in the soils of the area and less likely as an indication of soils being at different stages of development.

3.2 | Total elements concentrations

The severe contamination with toxic elements, complicates the determination of the natural background and baseline variation of the metal(l)oids in the soils of the studied area. Therefore, concentrations of the studied elements in surface rock samples that were considered as the only natural geological medium of the area by Demetriades (2010) served as background levels. To evaluate the ecotoxicological and human toxicological risk of the considered metals and As, the respective Dutch intervention thresholds were used as reference (Massas, Kalivas, Ehalotis, & Gasparatos, 2013; Netherlands MHPPE, 2000).

Total concentrations of the studied elements varied greatly, reflecting the uneven distribution of mining and metallurgical wastes in the area (Table 3). Because data did not follow normal distribution

(Shapiro–Wilk test), median concentration values were used for the evaluation of the results. Median total concentrations of all the studied elements were significantly higher than the corresponding background levels, indicating metal soil enrichment from human activities. Furthermore, median total concentrations of Zn, Pd, Cd, and As were 4, 9, 1.4, and 17 times higher than the respective intervention thresholds, indicating severe soil contamination that leads to impaired or threatened soil functional properties (Netherlands MHPPE, 2000). Median total concentrations of Cu, Ni, and Cr were lower than the corresponding intervention values, suggesting low or negligible risks for the soil ecosystem and the local environment.

3.3 | Chemical partitioning of metals and arsenic

The partitioning of the studied elements is presented in Table 4. The relative mean concentrations in each fraction, expressed as a percent of the cumulative mean total concentration, are illustrated in Figure 3.

3.4 | Zinc

Zinc was mainly related to reducible (37.1%) and residual fractions (27.1%) though mean relative concentrations of Zn in oxidisable (19.6%) and acid soluble fractions (16.2%) were also high. Consequently, Fe–Mn oxides/hydroxides seem to be the main mechanism for Zn immobilization in the studied soils while organic matter and carbonates may also play an important role. High relative concentrations of Zn in the reducible fraction (up to 46%) have also been reported by

TABLE 3 Total concentrations of Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, and As in the studied topsoils, geochemical background levels and Dutch intervention values (mg kg⁻¹)

| Elements | Geochemical background levels ^a | | | Total concentrations | | | | Dutch intervention values ^b |
|----------|--------------------------------------------|--------|-----------|----------------------|--------|------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|
| | Mean | Median | Range | Mean | Median | Range | Shapiro–Wilk test p values ^c | |
| Zn | 210.60 | 57.00 | <6.0–5200 | 6500 | 3188 | 969–30000 | 0.00 | 720 |
| Cu | 32.80 | 25.00 | 3.00–225 | 149 | 96 | 54–522 | 0.00 | 190 |
| Pb | 76.85 | 22.00 | <1.0–1850 | 8668 | 4625 | 1219–40313 | 0.00 | 530 |
| Ni | 168.30 | 54.50 | <1.0–1600 | 229 | 152 | 43–1066 | 0.00 | 210 |
| Cr | 100.40 | 20.00 | <1.0–610 | 210 | 144 | 63–1353 | 0.00 | 380 |
| Cd | 1.89 | 0.50 | <1.0–41 | 28 | 17 | 4.2–110 | 0.00 | 12 |
| As | 62.80 | 15.60 | <0.5–1032 | 1415 | 921 | 204–5001 | 0.00 | 55 |

^aDemetriades, 2010.

^bNetherlands MHPPE, 2000.

^c $p > .05$ indicates normal distribution.

TABLE 4 Descriptive statistics of Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, and As concentrations in the four chemical fractions defined by BCR procedure (F1, F2, F3, and RF; mg kg⁻¹) and percentage of recovery (i.e., Recovery [%] = [(F1 + F2 + F3 + RF)/Total] × 100)

| | | F1 | F2 | F3 | RF | Sum (F1 + F2 + F3 + RF) | Total** | Recovery (%) |
|----|--------|-------|--------|--------|--------|-------------------------|---------|--------------|
| Zn | Mean | 1,255 | 2,532 | 906 | 1,203 | 5,896 | 6,500 | 95.4 |
| | Median | 585 | 1,220 | 725 | 872 | 3,323 | 3,188 | 96.1 |
| | Min. | 61 | 245 | 185 | 453 | 1,036 | 969 | 73.0 |
| | Max. | 7,300 | 11,980 | 4,025 | 4,516 | 27,821 | 30,000 | 113.5 |
| | SD | 1,880 | 2,925 | 799 | 896 | 5,954 | 6,755 | 10.0 |
| | CV (%) | 150 | 116 | 88 | 75 | 101 | 104 | 10.5 |
| Cu | Mean | 3.3 | 40 | 45 | 69 | 158 | 149 | 104.3 |
| | Median | 0.0 | 24 | 32 | 57 | 104 | 96 | 105.7 |
| | Min. | 0.0 | 1.3 | 8.7 | 30 | 46 | 54 | 83.8 |
| | Max. | 26 | 174 | 128 | 261 | 559 | 522 | 119.2 |
| | SD | 6.9 | 44 | 34 | 50 | 123 | 113 | 8.4 |
| | CV (%) | 210 | 110 | 75 | 72 | 78 | 76 | 8.0 |
| Pb | Mean | 638 | 4,847 | 1,381 | 1,462 | 8,328 | 8,668 | 95.2 |
| | Median | 178 | 3,052 | 703 | 281 | 4,412 | 4,625 | 97.6 |
| | Min. | 20 | 512 | 165 | 69 | 1,188 | 1,219 | 76.6 |
| | Max. | 5,480 | 19,020 | 11,225 | 1,2969 | 40,614 | 40,313 | 109.5 |
| | SD | 1,242 | 4,757 | 2,253 | 3,015 | 10,345 | 10,420 | 8.8 |
| | CV (%) | 195 | 98 | 163 | 206 | 124 | 120 | 9.3 |
| Ni | Mean | 6.3 | 49 | 33 | 144 | 232 | 229 | 101.4 |
| | Median | 3.7 | 25 | 20 | 93 | 150 | 152 | 104.2 |
| | Min. | 0.0 | 2.9 | 5.7 | 35 | 44 | 43 | 78.3 |
| | Max. | 21 | 277 | 141 | 748 | 1,157 | 1,066 | 109.8 |
| | SD | 5.1 | 68 | 31 | 145 | 241 | 235 | 7.4 |
| | CV (%) | 82 | 138 | 95 | 101 | 104 | 103 | 7.3 |
| Cr | Mean | * | 3.1 | 14 | 206 | 223 | 210 | 107.9 |
| | Median | | 2.4 | 11 | 142 | 156 | 144 | 109.0 |
| | Min. | | 0.4 | 5.2 | 61 | 67 | 63 | 87.2 |
| | Max. | | 12 | 49 | 1,408 | 1,464 | 1,353 | 151.6 |
| | SD | | 2.5 | 9.5 | 244 | 252 | 236 | 12.9 |
| | CV (%) | | 81 | 69 | 118 | 113 | 113 | 11.9 |
| Cd | Mean | 13 | 14 | 3.5 | 2.8 | 33 | 28 | 118.7 |
| | Median | 7.0 | 9.7 | 2.4 | 1.9 | 21 | 17 | 121.0 |
| | Min. | 1.1 | 1.8 | 1.0 | 0.3 | 4.6 | 4.2 | 94.1 |
| | Max. | 63 | 36 | 21 | 12 | 132 | 110 | 132.3 |
| | SD | 14 | 10 | 3.7 | 2.4 | 29 | 24 | 9.2 |
| | CV (%) | 109 | 73 | 107 | 84 | 87 | 85 | 7.7 |
| As | Mean | 14 | 229 | 46 | 944 | 1231 | 1415 | 90.2 |
| | Median | 8.2 | 111 | 33 | 650 | 826 | 921 | 88.9 |
| | Min. | 1.4 | 8.3 | 3.1 | 136 | 163 | 204 | 73.0 |
| | Max. | 68 | 1,209 | 186 | 3207 | 4195 | 5001 | 111.9 |
| | SD | 14 | 259 | 45 | 834 | 1087 | 1305 | 10.2 |
| | CV (%) | 106 | 114 | 98 | 88 | 88 | 92 | 11.3 |

*No Cr detected in F1.

**Total concentration values from Table 3.

Rodriguez, Ruiz, Alonso-Azcarate, and Rincon (2009) in mine tailings. McBride and Blasiak (1979) suggest that a strongly pH-dependent retention of Zn in alkaline soils (pH > 7) may be produced by the adsorption of Zn oxides/hydroxides on clay surfaces, a scenario that reflects the conditions of the studied soils and supports the significant

presence of Zn in the reducible fraction. Nannoni, Protano, and Riccobono (2011) report that in soils of a mining area in northern Kosovo, Zn in the reducible fraction represented 22% of the total concentration and most of the metal was related to the residual fraction (54%). Moreover, high values of Zn obtained in the residual fraction

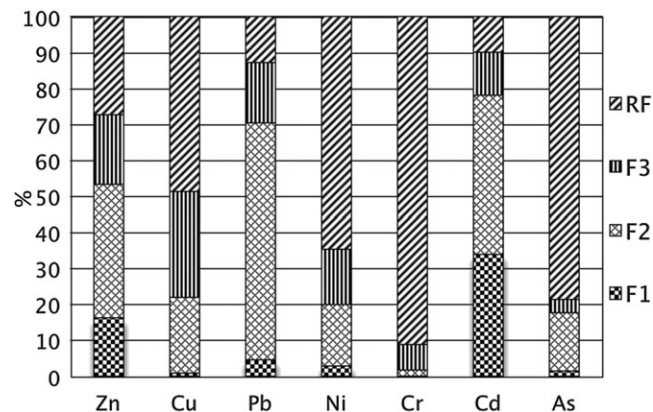


FIGURE 3 Relative percentages of mean Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, and As concentrations in the chemical fractions of the studied soils. F1—exchangeable/acid soluble, F2—reducible, F3—oxidisable, and RF—residual

can be explained considering the tendency of clay minerals to absorb zinc irreversibly by lattice penetration (Gasparatos, Mavromati, Kotsovilis, & Massas, 2015).

3.5 | Copper

The highest amount of Cu (48.5%) was found in the residual fraction followed by the Cu related to the oxidisable (29.5%) and reducible (21.1%) fractions. For most samples, Cu concentration extracted in the first step of BCR was below detection limit and thus, mean exchangeable fraction represented only 0.9% of the total Cu concentration. Copper is one of the least mobile metals in soils, and it is strongly associated with clay minerals, organic matter, and Fe–Mn oxides (Hooda, 2010). Hence, the distribution of Cu among the different fractions in the studied soils corresponded to its chemical behavior. Similar findings obtained by Liu et al. (2013) for the soils of a nonferrous metal mine area in China. Guillén et al. (2012) report that the amount of Cu associated with the sum of F2 + F3 was up to 53% (50.6% in our study), reflecting the high affinity of Cu for Fe–Mn oxides, sulfides, and organic substances.

3.6 | Lead

Lead fractionation showed that more than 65% of the total Pb was associated with the reducible fraction. However, Demetriades et al. (2010) applied the Tessier sequential extraction protocol in surface soils of the Lavrion urban area and report that 32% of total Pb concentration was related to the reducible fraction. The relative concentrations of Pb associated with the oxidisable and residual fractions were 17% and 12.6%, respectively, while only 4.7% of the total Pb was obtained in the exchangeable fraction. Some authors found a higher selective sorption of Pb by Fe oxides, while others have reported Mn oxides as having the greatest affinity to Pb (Gasparatos, 2013; Hooda, 2010). According to Martinez and Motto (2000), high soil pH may promote the formation of relatively stable Pb–organic complexes which can explain the significant amount of Pb found in the oxidisable fraction. Considering the very high total Pb concentrations in most of Lavrion soils, the 4.7% of total Pb in F1 suggests that

a considerable amount of Pb is readily or potentially available for plant uptake, and thus toxic phenomena may emerge for plants and the soil biota. Moreover, the wide range of CaCO_3 concentration in the studied soils, the tendency of Pb to bound with carbonates, and the incomplete dissolution of Pb-carbonates by the acetic acid (Gleyzes, Tellier, & Astruc, 2002), may have led to an underestimation of F1 fraction and consequently to the underestimation of the potential Pb availability in the studied soils.

3.7 | Nickel

Nickel was mainly associated with the residual fraction (64.7% of the total amount), followed by the reducible and oxidisable fractions that showed similar mean relative concentrations (17.1% and 15.2%, respectively). The lowest amount of Ni, up to 3.1%, was found in the exchangeable/acid soluble fraction. Similar findings reported by Arenas-Lago, Andrade, Lago-Vila, Rodríguez-Seijo, and Vega (2014), who found 77% to 95% of total Ni in the residual fraction. Furthermore, Liu et al. (2013) recorded that 80% of Ni was extracted from the residual fraction of agricultural soils polluted by mining activities. It is suggested that the highest stabilization energy of Ni^{+2} among the common divalent metals can explain the high potential of Ni to be enriched in clay minerals (Brümmer, Gerth, & Tiller, 1988). Moreover, the presence of Ni as inclusions in the silicate structure of smectite and illite and by isomorphous substitution of Fe and Al in the spinel group minerals further elucidates the affinity of Ni for the residual fraction (Favas, Pratas, Gomes, & Cala, 2011).

3.8 | Chromium

The predominant form of Cr was the residual, being approximately 91.1% of the total content, while no Cr was detected in F1 indicating the low availability of Cr in soils. The amounts of total Cr bound to organic matter and to Fe–Mn oxides were 7.2 and 1.7%, respectively. The results showed that most indigenous Cr exists generally as occluded lattice forms in soil minerals, and therefore, Cr is generally poorly soluble and immobile. The strong affinity of Cr for the residual fraction is reported by many researchers (Delgado, Barba-Brioso, Nieto, & Boski, 2011; Liu et al., 2013). According to Arenas-Lago et al. (2014), up to 95% of total Cr was found in the residual fraction of soils contaminated by a copper mine operation.

3.9 | Cadmium

Most of Cd was associated with the reducible fraction (44.1%). Relative concentration of Cd in the exchangeable fraction was also high (34.1%), indicating high Cd availability in the studied soils. The oxidisable and the residual fractions accounted for about 11.9 and 9.9% of the total content, respectively. Two main mechanisms appear to control the behavior of Cd in the studied soils. The first one is the adsorption of Cd on Fe–Mn oxides, and the second one is the formation of Cd-carbonates precipitants or/and the Cd incorporation into carbonates. Akkajit and Tongcumpou (2010) also reported that Cd in contaminated soils close to a Zn mine was mainly related with the reducible (41.5%) and the exchangeable/acid soluble (29.2%) fractions.

3.10 | Arsenic

The mean relative concentration of As into the various fractions was in the order RF > F2 > F3 > F1. In the studied soils, the most important fraction for As was the residual (78.4%) followed by the reducible fraction (16.2%). Very low amounts of As were extracted in the oxidisable and exchangeable/acid soluble fractions (3.8 and 1.6%, respectively). It seems that As is strongly retained in the lattices of primary minerals (like arsenopyrite) and secondary minerals (mostly assemblages with Fe oxides). The relatively high amount of As in F2 suggests that under reducing conditions the mobility/availability of As can increase due to the dissolution of the Fe–Mn oxides. Similarly, Nannoni et al. (2011) concluded that As extracted in the residual and reducible fractions represent 84% and 10% of the total As concentration in soils.

4 | DISCUSSION

4.1 | Elements partitioning and mobility

Metals forms solubilized in the three sequential steps of the BCR scheme are considered as the reactive fractions, because altered soil conditions can lead to increased metals concentrations in the soil solution. However, fractions F1 and F2 may be regarded as the most significant for soil ecosystems. Indeed, metal forms extracted in the first extraction step are considered as readily available, or available in cases of soil pH reduction. Extraction matrix at the second step mimics to some extent soil conditions that may occur under excessive water inputs either as heavy rainfall or as high irrigation levels. In soils with medium to high clay contents as the soils in this study, reducing conditions can frequently occur especially into microaggregates. Accordingly, Zn and Pb that were associated with the reducible fraction and Cd that was mainly associated with both available and reducible fractions (Figure 3), in relation to the high concentrations of these metals in the respective fractions, can be considered as potential threats for below and above ground ecosystems. Arsenic was mainly associated with the residual fraction, but the significant amount of total As that was extracted in the reducible fraction suggests increased mobility under reducing conditions and groups As with Pb, Zn, and Cd. These results indicate that significant amounts of Cd, Zn,

Pb, and As remain in relatively weakly bound or potentially available forms in the surface horizons of the studied soils, thus posing phytotoxic and health hazards.

4.2 | Origin of the studied elements

According to the correlation coefficients (Table 5) and the cluster analysis results (Figure 4) performed for the total elements concentrations, three groups of elements can be distinguished. The first group is consisted by Zn, Cu, and Cd with r values ranging between 0.76 and 0.95 ($p < .001$). The strongest correlation for the metals of this group was observed between Zn and Cd ($r = 0.95$, $p < .001$). The second group includes Pb and As with $r = 0.73$ ($p < .001$), whereas Ni and Cr compose the third group with $r = 0.76$ ($p < .001$). The metals of the first group were negatively correlated to clay either significantly ($r = -0.41$, $p < .05$ for Zn and $r = -0.39$, $p < .05$ for Cd) or not significantly ($r = -0.35$, $p > .05$ for Cu). Total As and Pb concentrations were negatively correlated with carbonates indicating the important role of carbonates on the geochemical occurrence of both As and Pb in the soils of the studied area. The first and second group of metals forms a joint cluster suggesting common origin, whereas the third group seems to be unrelated to the others. Taking into account that soil contamination in the Lavrion area is a result of previous mining and ore processing activities, these relations are indicative of the chemical and mineralogical composition of the produced metallurgical wastes. However, the common grouping and the comparatively low total concentrations of Ni and Cr, suggest that the presence of these two metals in the mining and metallurgical wastes is relatively low.

4.3 | Relations between elements fractions and soil properties

Principal component analysis (PCA) was conducted to investigate the relations between the reactive phases of the metals and clay, carbonates (total and active CaCO_3), organic matter, crystalline, and amorphous Fe oxides contents in the studied soils. For each reactive phase, the number of the variables was reduced to two principal factors (Factors 1 and 2) that explained about 60% of the total variance for F1 and F2, 62% for F3, and 65% for RF (Figure 5).

TABLE 5 Correlation coefficient matrix: main soil properties, and Zn, Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, and As total concentrations ($n = 29$)

| | Clay | pH | Total CaCO_3 | Active CaCO_3 | OM | Zn | Cu | Pb | Ni | Cr | Cd | As |
|------------------------|--------|--------|-----------------------|------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|-------|------|------|
| Clay | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| pH | 0.41* | 1.00 | | | | | | | | | | |
| Total CaCO_3 | -0.24 | 0.16 | 1.00 | | | | | | | | | |
| Active CaCO_3 | 0.15 | 0.51** | 0.74* | 1.00 | | | | | | | | |
| OM | -0.16 | -0.34 | 0.05 | -0.22 | 1.00 | | | | | | | |
| Zn | -0.41* | -0.08 | 0.03 | -0.24 | 0.04 | 1.00 | | | | | | |
| Cu | -0.35 | -0.16 | -0.20 | -0.36 | -0.03 | 0.81*** | 1.00 | | | | | |
| Pb | -0.34 | -0.32 | -0.24 | -0.51** | -0.08 | 0.50** | 0.51** | 1.00 | | | | |
| Ni | 0.47** | 0.37* | -0.07 | 0.11 | -0.25 | -0.01 | -0.07 | -0.19 | 1.00 | | | |
| Cr | 0.28 | 0.12 | -0.11 | -0.05 | -0.19 | -0.12 | -0.17 | -0.19 | 0.76*** | 1.00 | | |
| Cd | -0.39* | -0.10 | 0.04 | -0.26 | 0.17 | 0.95*** | 0.76*** | 0.47** | -0.04 | -0.15 | 1.00 | |
| As | -0.21 | -0.38* | -0.47* | -0.48** | -0.16 | 0.18 | 0.51** | 0.73*** | -0.22 | -0.25 | 0.18 | 1.00 |

* $p < .05$. ** $p < .01$. *** $p < .001$.

Tree Diagram for 7 Variables
Weighted pair-group average
1-Pearson r

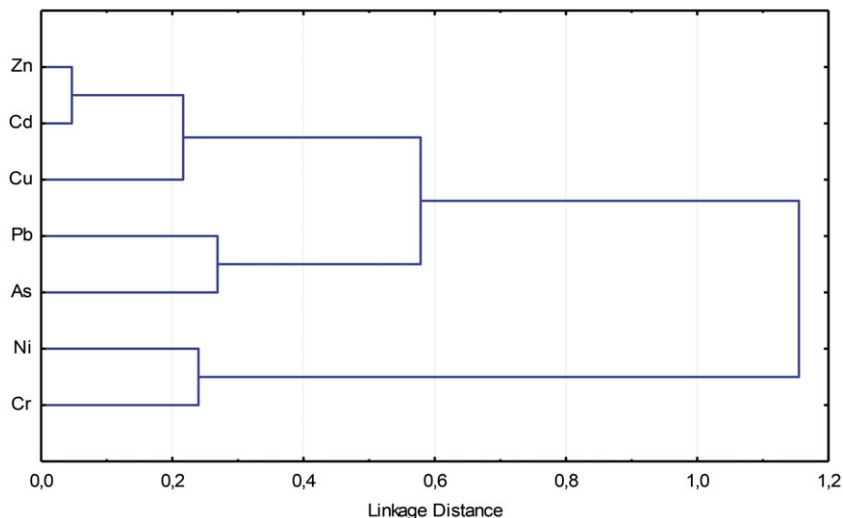


FIGURE 4 Hierarchical clustering results of the total elements concentrations in the soils of Lavrion ($n = 29$) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

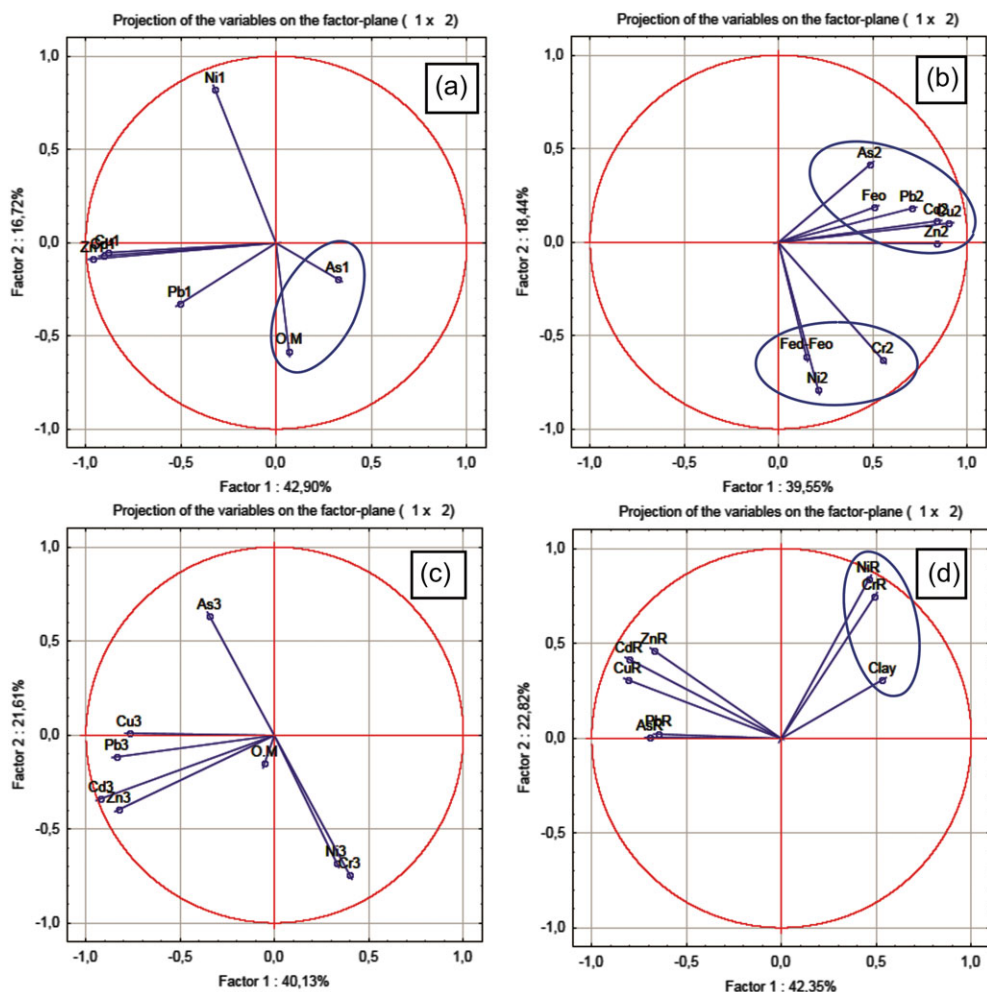


FIGURE 5 Principal component analysis of the elements chemical fractions and soil properties in the Lavrio area. (a) F1 exchangeable/acid soluble fraction and organic matter content, (b) F2 reducible fraction and amorphous (Feo)/crystalline (Fed-Feo) oxides content, (c) F3 oxidisable fraction and organic matter content, and (d) F4 residual fraction and clay content ($n = 29$) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

No significant association between F1 exchangeable/acid soluble fraction and soil properties was observed, except a weak relation of As with organic matter that points to the formation of outer/inner-sphere As complexes with humic and fluvic acids (Williams et al., 2011). PCA results showed a significant association of the F2 reducible fraction of As, Pb, Zn, Cu, Cd, Cr, and Ni with iron oxides, confirming the great importance of Fe oxides in the sequestration of toxic elements in heavily polluted soils. Indeed, the F2 fraction of As, Pb, Zn, Cu, and Cd was strongly associated with the amorphous (Feo) iron oxides, whereas the F2 fraction of Cr and Ni was related to the crystalline (Fed-Feo) iron oxides. Similarly, Delgado et al. (2011), by studying estuarine sediments affected by multiple anthropogenic contributions (including mining activities), concluded that the F2 fraction of Cd, Cr, Cu, and Zn was strongly related to Fe oxides.

The F3 oxidisable fraction was not associated with the organic matter content, indicating the minor contribution of organic matter to the retention of the metal(loid)s in the studied soils. Oxidizing reagents used in the F3 fraction can release metal(loid)s bound to sulfides also (Quevauviller, 2002). Thus, it can be stated that the relative concentrations of metals and As extracted in this fraction were mainly originated from the dissolution of sulfide salts associated with the studied elements, rather than from less stable organometal complexes. These results are in line with the recent findings by Root, Hayes, Hammond, Maier, and Chorover (2015) who report that ferric iron and sulfate minerals in mine tailings produced by exploitation of massive sulfite deposit (like those of our study), act to buffer against the release of toxic elements into the environment. Finally, PCA analysis demonstrated an important association of Ni and Cr residual fractions with clay, confirming the affinity of Ni and Cr to the silicate minerals and the common lithogenic origin of these metals.

5 | CONCLUSIONS

Thousands of years of mining and processing activities have led to serious land degradation in the greater Lavrion area. According to the findings of this study, total concentrations of Cu, Ni, and Cr were below the corresponding intervention values, whereas total concentrations of Zn, Pd, Cd, and As were 4, 9, 1.4, and 17 times greater than the respective intervention thresholds. Geochemical background levels and cluster analysis results showed that the very high to extreme concentrations of Pb, Zn, Cd, Cu, and As in the studied soils are a consequence of the mining history of Lavrion, whereas Ni and Cr presence in the soils corresponds to the geology of the area.

Chemical partitioning of the elements demonstrated that Cu, Ni, Cr, and As were mainly associated with the residual fraction, whereas Zn, Pb, and Cd were mainly associated with the reducible fraction. A significant amount of As was also found in the reducible phase. A different geochemical scenario, as the prevalence of anaerobic soil conditions, could favor the solubilization of Fe–Mn oxides and may lead to increased Zn, Pb, Cd, and As mobility, posing a serious environmental threat. Finally, PCA analysis showed a significant association of the reducible fraction of all the studied metals and As with Fe oxides, emphasizing the significant role of Fe oxides on the sequestration of toxic elements in heavily polluted soils.

Considering that the studied area is inhabited, cleanup measures for soil decontamination should be promptly implemented. Nevertheless, thousands of hectares are contaminated and thus environmentally friendly and cost effective soil remediation actions should be promoted and implemented in order to achieve a better life for the local population and healthier soils that will successfully fulfill their ecological role.

ACKNOWLEDGMENTS

Sincere thanks to Dr. Orestis Kairis for his assistance in the production of Figures 1 and 2 and Mr. Nick Angelou for the graphical editing.

ORCID

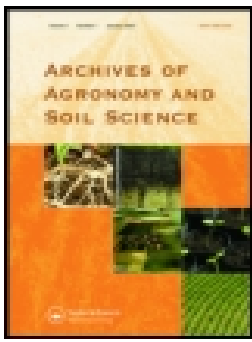
Ioannis Massas  <http://orcid.org/0000-0001-5486-1218>

REFERENCES

- Akkajit, P., & Tongcumpou, C. (2010). Fractionation of metals in cadmium contaminated soil: Relation and effect on bioavailable cadmium. *Geoderma*, 156, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.02.007>
- Arenas-Lago, D., Andrade, M. L., Lago-Vila, M., Rodríguez-Seijo, A., & Vega, F. A. (2014). Sequential extraction of heavy metals in soils from a copper mine: Distribution in geochemical fractions. *Geoderma*, 230–231, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.04.011>
- Baziotis, I., Proyer, A., & Mposkos, E. (2009). High-pressure/low-temperature metamorphism of basalts in Lavrion (Greece): Implications for the preservation of peak metamorphic assemblages in blueschists and greenschists. *European Journal of Mineralogy*, 21, 133–148. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2008/0020-1853>
- Berger, A., Schneider, D. A., Grasemann, B., & Stockli, D. (2013). Footwall mineralization during Late Miocene extension along the West Cycladic Detachment System, Lavrion, Greece. *Terra Nova*, 25, 181–191. <https://doi.org/10.1111/ter.12016>
- Bouyoucos, G. H. (1951). A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soils. *Agronomy Journal*, 43, 434–438.
- Brümmer, G. W., Gerth, J., & Tiller, K. G. (1988). Reaction kinetics of the adsorption and desorption of nickel, zinc, cadmium by goethite. *Soil Science*, 39, 37–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1988.tb01192.x>
- Camizuli, E., Monna, F., Bermond, A., Manouchehri, N., Besançon, S., Losno, R., ... Alibert, P. (2014). Impact of historic mining assessed in soils by kinetic extraction and lead isotopic ratios. *Science of the Total Environment*, 472, 425–436. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.103>
- Delgado, J., Barba-Brioso, C., Nieto, J. M., & Boski, T. (2011). Speciation and ecological risk of toxic elements in estuarine sediments affected by multiple anthropogenic contributions (Guadiana saltmarshes, SW Iberian Peninsula): I. Surficial Sediments. *Science of the Total Environment*, 409, 3666–3679. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.013>
- Demetriades, A. (2010). Medical geology in Hellas: the Lavrion urban environmental pollution study. In O. Selinus, R. B. Finkelman, & J. A. Centeno (Eds.), *Medical geology: A regional synthesis* (pp. 355–390). Dordrecht: Springer.
- Demetriades, A., Li, X. D., Ramsey, M. H., & Thornton, I. (2010). Chemical speciation and bioaccessibility of lead in surface soil and house dust, Lavrion urban area, Attiki, Hellas. *Environmental Geochemistry and Health*, 32, 529–552. <https://doi.org/10.1007/s10653-010-9315-9>
- Demetriades, A., Stavarakis, P., & Vergou-Vichou, K. (1996). Contamination of surface soil of the Lavreotiki peninsula (Attiki, Greece) by mining and smelting activities. *Mineral Wealth*, 98, 7–15.
- Favas, P. J. C., Pratas, J., Gomes, M. E. P., & Cala, V. (2011). Selective chemical extraction of heavy metals in tailings and soils contaminated by mining activity: Environmental implications. *Journal of Geochemical Exploration*, 111, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2011.04.009>
- Gasparatos, D. (2013). Sequestration of heavy metals from soil with Fe–Mn concretions and nodules. *Environmental Chemistry Letters*, 11, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10311-012-0386-y>

- Gasparatos, D., & Haidouti, C. (2001). A comparison of wet oxidation methods for determination of total phosphorus in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164, 435–439. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200108\)164:4%3C435::AID-JPLN435%3E3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200108)164:4%3C435::AID-JPLN435%3E3.0.CO;2-5)
- Gasparatos, D., Mavromati, G., Kotsovilis, P., & Massas, I. (2015). Fractionation of heavy metals and evaluation of the environmental risk for the alkaline soils of the Thriassio plain: A residential, agricultural and industrial area in Greece. *Environmental Earth Sciences*, 74, 1099–1108. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4096-1>
- Gleyzes, C., Tellier, S., & Astruc, M. (2002). Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: A review of sequential extraction procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 451–467. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00603-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00603-9)
- Guillén, M. T., Delgado, J., Albanese, S., Nieto, J. M., Lima, A., & De Vivo, B. (2012). Heavy metals fractionation and multivariate statistical techniques to evaluate the environmental risk in soils of Huelva township (SW Iberian Peninsula). *Journal of Geochemical Exploration*, 119–120, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.06.009>
- Hooda, P. S. (2010). *Trace elements in soils*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.
- Kontopoulos, A., Komnitsas, K., Xenidis, A., & Papassiopi, N. (1995). Environmental characterisation of the sulfidic tailings in Lavrion. *Minerals Engineering*, 8, 1209–1219. [https://doi.org/10.1016/0892-6875\(95\)00085-5](https://doi.org/10.1016/0892-6875(95)00085-5)
- Kwon, J. C., Nejad, Z. D., & Jung, M. C. (2017). Arsenic and heavy metals in paddy soil and polished rice contaminated by mining activities in Korea. *Catena*, 148, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.01.005>
- Lin, C., Tong, X., Lu, W., Yan, L., Wu, Y., Nie, C., ... Long, J. (2005). Environmental impacts of surface mining on mined lands, affected streams and agricultural lands in the Dabaoshan mine region, southern China. *Land Degradation & Development*, 16, 463–474. <https://doi.org/10.1002/ldr.675>
- Liu, G., Tao, L., Liu, X., Hou, J., Wang, A., & Li, R. (2013). Heavy metal speciation and pollution of agricultural soils along Jishui River in non-ferrous metal mine area in Jiangxi Province, China. *Journal of Geochemical Exploration*, 132, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.06.017>
- Loeppert, R. H., & Suarez, D. L. (1996). Carbonate and gypsum. In J. M. Bigham, & J. M. Bartels (Eds.), *Methods of soil analysis, part 3, chemical methods* (pp. 437–474). Madison, WI: SSSA, ASA.
- Martinez, C. E., & Motto, H. L. (2000). Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution*, 107, 153–158. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00111-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00111-6)
- Massas, I., Kalivas, D., Ehaliotis, C., & Gasparatos, D. (2013). Total and available heavy metal concentrations in soils of the Thriassio plain (Greece) and assessment of soil pollution indexes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 6751–6766. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3062-1>
- McBride, M. B., & Blasiak, J. J. (1979). Zinc and copper solubility as a function of pH in an acid soil. *Soil Science Society of America Journal*, 43, 866–870. <https://doi.org/10.2136/sssaj1979.03615995004300050009x>
- Mehra, O. P., & Jackson, M. L. (1960). Iron oxide removal from soils and clay by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays and Clay Minerals*, 7, 317–327. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1958.0070122>
- Nannoni, F., Protano, G., & Riccobono, F. (2011). Fractionation and geochemical mobility of heavy elements in soils of a mining area in northern Kosovo. *Geoderma*, 161, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.12.008>
- Nelson, D. W., & Sommers, L. E. (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In A. L. Page, R. H. Miller, & D. R. Keeney (Eds.), *Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbiological properties* (pp. 539–580). Madison, WI: SSSA, ASA.
- Netherlands Ministry of Housing, Physical Planning and Environment (Netherlands MHPPE) (2000). *Annexes circular on target values and intervention values for soil remediation*. The Netherlands: MHPPE.
- NF ISO 10693. Détermination de la teneur en carbonate—Méthode volumétrique. Qualité Des Sols AFNOR, 1995; 177–186.
- Passariello, B., Giuliano, V., Quaresima, S., Barbaro, M., Caroli, S., & Forte, G. (2002). Evaluation of the environmental contamination at an abandoned mining site. *Microchemical Journal*, 73, 245–250. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(02\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(02)00069-3)
- Quevauviller, P. (2002). *Methodologies in soil and sediment fractionation studies, single and sequential extraction procedures*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847551412>
- Rauret, G., López-Sánchez, J. F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., & Quevauviller, P. (1999). Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *Journal of Environmental Monitoring*, 1, 57–61. <https://doi.org/10.1039/A807854H>
- Rhoades, J. D. (1982). Cation exchange capacity. In A. L. Page, R. H. Miller, & D. R. Keeney (Eds.), *Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbiological properties* (pp. 149–158). Madison, WI: SSSA, ASA.
- Rodriguez, L., Ruiz, E., Alonso-Azcarate, J., & Rincon, J. (2009). Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in Spain. *Journal of Environmental Management*, 90, 1106–1116. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.04.007>
- Root, R. A., Hayes, S. M., Hammond, C., Maier, R. M., & Chorover, J. (2015). Toxic metal(loid) speciation during weathering of iron sulfide mine tailings under semi-arid climate. *Applied Geochemistry*, 62, 131–149. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.01.005>
- Scheffer, C., Vanderhaeghe, O., Lanari, P., Tarantola, A., Ponthus, L., Photiades, A., & France, L. (2016). Syn to post-orogenic exhumation of high-grade nappes: Structure and thermobarometry of the western Attic-Cycladic metamorphic complex (Lavrion, Greece). *Journal of Geodynamics*, 96, 174–193. <https://doi.org/10.1016/j.jog.2015.08.005>
- Schwertmann, U., & Taylor, R. M. (1989). Iron Oxides. In J. B. Dixon, & S. B. Weed (Eds.), *Minerals in soil environments* (pp. 380–438). Madison, WI: SSSA.
- Skarpelis, N. (2007). The Lavrion deposit (SE Attika, Greece): Geology, mineralogy and minor elements chemistry. *Neues Jahrbuch für Mineralogie*, 183, 227–249. <https://doi.org/10.1127/0077-7757/2007/0067>
- Skarpelis, N., & Argyraki, A. (2009). Geology and origin of supergene ore at the Lavrion Pb–Ag–Zn deposit, Attica, Greece. *Resource Geology*, 59, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1751-3928.2008.00076.x>
- Spry, P. G., Mathur, R. D., & Bonsall, T. A. (2014). Re-Os isotope evidence for mixed source components in carbonate-replacement Pb–Zn–Ag deposits in the Lavrion district, Attica, Greece. *Mineralogy and Petrology*, 108, 503–513. <https://doi.org/10.1007/s00710-013-0314-2>
- Voudouris, P., Melfos, V., Spry, P. G., Bonsall, T. A., Tarkian, M., & Solomos, C. (2008). Carbonate-replacement Pb–Zn–Ag–Au mineralization in the Kamariza area, Lavrion, Greece, mineralogy and thermochemical conditions of formation. *Mineralogy and Petrology*, 94, 85–106. <https://doi.org/10.1007/s00710-008-0007-4>
- Williams, P. N., Zhang, H., Davison, W., Meharg, A. A., Hossain, M., Norton, G. J., ... Brammer, H. (2011). Organic matter–solid phase interactions are critical for predicting arsenic release and plant uptake in Bangladesh paddy soils. *Environmental Science & Technology*, 45, 6080–6087. <https://doi.org/10.1021/es2003765>
- Xenidis, A., Papassiopi, N., & Komnitsas, K. (2003). Carbonate-rich mining tailings in Lavrion: Risk assessment and proposed rehabilitation schemes. *Advances in Environmental Research*, 7, 479–494. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00017-5](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00017-5)

How to cite this article: Kalyvas G, Gasparatos D, Papassiopi N, Massas I. Topsoil pollution as ecological footprint of historical mining activities in Greece. *Land Degrad Dev*. 2018;29:2025–2035. <https://doi.org/10.1002/ldr.2963>



A critical assessment on arsenic partitioning in mine-affected soils by using two sequential extraction protocols

Georgios Kalyvas, Dionisios Gasparatos & Ioannis Massas

To cite this article: Georgios Kalyvas, Dionisios Gasparatos & Ioannis Massas (2018): A critical assessment on arsenic partitioning in mine-affected soils by using two sequential extraction protocols, Archives of Agronomy and Soil Science, DOI: [10.1080/03650340.2018.1443443](https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1443443)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1443443>



Accepted author version posted online: 27 Feb 2018.
Published online: 05 Mar 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 36



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

ARTICLE



A critical assessment on arsenic partitioning in mine-affected soils by using two sequential extraction protocols

Georgios Kalyvas^a, Dionisios Gasparatos^b and Ioannis Massas^a

^aSoil Science Laboratory, Agricultural University of Athens, Athens, Greece; ^bSoil Science Laboratory, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

ABSTRACT

The highly degraded mine-affected soils of Lavrion, central Greece, are greatly polluted by heavy metals and arsenic (As). To assess As partitioning in the soils of the area, Wenzel and BCR (Community Bureau of Reference) sequential extraction procedures (SEP) were applied to 29 top soils. The results of the Wenzel SEP showed that As was mainly bound to the well-crystallized (33.3%) and to the amorphous/poorly-crystalline (30.1%) oxides of Fe, Al, and Mn. According to the BCR scheme, most of the total As (78.4%) was retained in the residual phase. Low mobility factor values (Wenzel: 0.34%; BCR: 1.56%) clearly demonstrate the low availability and mobility of As in the studied soils. The specifically-sorbed/inner-sphere and the reducible fractions of As, obtained by the Wenzel SEP, were positively correlated with clay and Fe oxides content, respectively. The reducible As fractions of both SEPs were negatively correlated with carbonates content indicating that carbonates may partially control As sorption on Fe oxides. The comparative evaluation of the two SEPs showed that the application of the BCR protocol in contaminated soils cannot provide reliable information on As sequestration in soils but it can be a first estimate of As labile forms.

ARTICLE HISTORY

Received 4 October 2017
Accepted 18 February 2018

KEYWORDS

Wenzel fractionation scheme; BCR sequential extraction protocol; arsenic; mining; soil

Introduction

Soil contamination by arsenic (As) poses a severe threat to human, plant and animal life, disturbing ecosystem functions. In nature As occurs in organic and inorganic forms, and in various oxidation states such as As^{3-} (arsine), As° (arsenic), As^{3+} (arsenite) and As^{5+} (arsenate) which is the most stable form (Gupta et al. 2011). In the soil environment, the predominant forms of As are arsenite in case of reduced/anaerobic soil conditions and arsenate when oxidized/aerobic soil conditions prevail (Alloway 2013). Nevertheless, according to Liu and Cai (2007), the prediction of the predominant form of As in soils cannot be based only on the redox potential since the metabolic processes of certain microorganisms may alter arsenites and arsenates relative concentrations, regardless of reduced or oxidized conditions. Besides redox potential, As solubility in soils is highly dependent on the pH, the soil texture, the types of the minerals present, the competing ions, the reaction kinetics, the organic matter content and the As minerals themselves (Gedik et al. 2016).

Sequential extraction procedures (SEPs) were developed to assess metal(loid)s geochemical forms in soils (Kim et al. 2014). Despite the inherent weaknesses of these procedures (e.g. limited selectivity of the extractants, re-adsorption and precipitation phenomena, poor reproducibility) sequential extraction schemes are widely accepted and adopted (Drahota et al. 2014; Massas et al. 2017).

To achieve harmonization among the various SEP protocols and comparability between the results obtained, Community Bureau of Reference (BCR), now European Standard, Measurements and Testing (SM & T) program, proposed a standardized three-step extraction procedure for heavy metals fractionation in sediments and soils (Quevauviller 2002). However, although it was originally tested for heavy metals, BCR scheme has been also used by many researchers for arsenic fractionation in soils and sediments (Larios et al. 2012).

As most SEPs are based on the cationic nature of heavy metals, the necessity to develop appropriate protocols compatible with arsenic's anionic nature in soils was emerged. Since arsenic and phosphorus have similar chemical behavior in soils (both form oxyanions), many fractionation schemes for arsenic are modifications of sequential extraction procedures for phosphorus (Van Herreweghe et al. 2003). Taking into consideration the geochemical characteristics of As, Wenzel et al. (2001) modified the Zeien and Brümmer (1991) scheme and the Chang and Jackson (1957) SEP for P and proposed a five-step sequential extraction procedure for the determination of As chemical forms in soils.

The main objectives of the present study were: (a) to assess As potential mobility – availability and partitioning in the heavily polluted surface soils of a former mining area by using the Wenzel and the BCR sequential extraction methods (b) to evaluate the results of the two methods and (c) to discuss on possible associations of As fractions with soil properties.

Materials and methods

Study area

Centuries of intensive mining activities and metallurgical processes had led to the production of huge quantities of metal-rich wastes that were unevenly spotted over the wide area of Lavrion, Greece. Sulphidic flotation tailings, oxidic-carbonaceous-silicate beneficiation tailings and metallurgical slag are the three main types of wastes identified in the area. The large spoil heaps formed by these mine waste residues are subjected to weathering processes (i.e. wind, rain, atmospheric oxygen, bacterial metabolic processes) that affect the physicochemical conditions at the disposal sites and enrich the surrounding soils with toxic metals (Xenidis et al. 2003).

High total concentrations of As in the surface soils of Lavrion originate from the As-bearing minerals that exist in the carbonated-hosted massive sulfide Pb–Zn–Ag ores of the area. Mineralogical studies determined the sulfide mineral assemblages and confirmed the presence of arsenopyrite [FeAsS], sulfosalts such as proustite [Ag₃AsS₃] and tetrahedrite [(Cu,Fe)₁₂Sb₄S₁₃], primary sulfarsenides such as gersdorffite [NiAsS] and realgar [AsS], arsenides such as löllingite [FeAs₂] and rammelsbergite [NiAs₂], as well as native arsenic that occurs as inclusions in galena crystals forming crusts on open cracks of carbonate minerals and spatially associated with silver sulfosalts (Gamaletsos et al. 2013).

Soil sampling sites

The selection of sampling sites was based on a contamination map for arsenic produced by the Institute of Geology and Mineral Exploration of Greece (I.G.M.E) for the soils of Lavrion (Demetriades 1999). Top soil samples were collected from twenty-nine (29) sampling sites, located close to the Technological – Cultural Park of Lavrion (former metallurgical treatment facilities) and from the wider area of Ag. Konstantinos (i.e. former mining area characterized from the number of shafts, crushing sites, washing plants and tailings). The sampling objective was to obtain soil samples with a sufficiently wide range of total As concentrations and with different physicochemical parameters. Thus, top soil samples were collected using stainless-steel equipment from open spaces, forest and agricultural land located relatively close to highly contaminated spots such as stockpiles, tailings and slag. From each sampling

site, three sub-samples were collected from a depth of 15 cm corresponding to a 100 × 100 cm surface area. The three soil sub-samples were mixed to provide one representative bulk sample.

Soil properties

Soil samples were air-dried, crushed and passed through a 2 mm sieve for further analyses. For the sequential extraction procedures, a portion of the sieved samples was further grounded to pass through a 0.5 mm sieve. pH was measured in a 1:1 (w/v) soil/water slurry, total carbonates content (CaCO₃) was calculated by measuring the evolved CO₂ following HCl dissolution (NF ISO 10693 1995), active carbonate was obtained according to the ammonium oxalate method described by Loeppert and Suarez (1996) and particles size was determined by the Bouyoucos hydrometer method (Bouyoucos 1951). To measure organic matter (OM) the Walkley–Black wet oxidation method was followed (Nelson and Sommers 1982), the cation exchange capacity (CEC) was determined by using the sodium acetate method (Rhoades 1982) and available phosphorus (P) was obtained by the Olsen method (Olsen et al. 1954). Amorphous and poorly crystallized Fe oxides and free Fe oxides contents were determined by using the ammonium oxalate buffer method (Schwertmann and Taylor 1989) and the sodium citrate – bicarbonate – dithionite (CBD) method proposed by Mehra and Jackson (1960), respectively. Total As concentration in the studied soil samples was obtained by a single step aqua regia extraction (Gasparatos and Haidouti 2001). However, aqua regia digestion does not completely destroy silicates and provides the ‘pseudo-total’ metal concentrations that for simplicity are termed as ‘total’ in this study. Cambisols mainly and Fluvisols secondarily, dominate the study area according to FAO soil classification system (Misopolinos et al. 2015). Moreover, the studied soils are calcareous, eroded and characterized as sandy-clay-loams (SCL) with an alkaline pH (Table 1).

Sequential extraction procedures (SEP)

The BCR and the Wenzel sequential extraction schemes used in this study are described in Table 2.

The Wenzel et al. (2001) sequential extraction method has been applied in several studies (Gault et al. 2003; Caille et al. 2004) because it targets the most abundant and environmentally important fractions of arsenic, providing fairly reliable results on As fractionation in contaminated soils and sediments. According to the Wenzel scheme, the following fractions are operationally defined: W1, non-specifically sorbed (easily mobilizable, outer-sphere complexes); W2, specifically-sorbed (readily mobilizable, inner-sphere complexes); W3, bound to amorphous and poorly-crystalline oxides; W4, bound to well-crystallized hydrous oxides; WRF, residual. In this study, aqua regia was used to extract As from the residual phase replacing a mixture of HNO₃/H₂O₂ proposed in the original method. In the Wenzel method, a separate oxidisable fraction is not included and no specific consideration is taken for As – bound to carbonates. In calcareous soil samples and prior to the reducing phase, Wenzel et al. (2001) applied NaOAc/HOAc buffer solution but the extracted amounts of As were negligible, pointing to low As affinity for carbonates. Moreover, preliminary tests conducted by Wenzel et al. (2001) showed that the amounts of As extracted from soils by reagents containing EDTA were not significantly related with the organic matter content of the soils (SOM). Recently, Larios et al. (2012) developed a SEP specifically designed for As fractionation in contaminated soils and sediments that does not include a separate step for As bound to carbonates, but includes a step for As bound to organic matter. To dissolve humic acids that are considered as the major organic pool of As in soils, Larios et al. (2012) used 0.1 mol L⁻¹ of pyrophosphate solution. However, the same authors (Larios et al. 2013) suggested as highly possible that As extracted in the oxidisable fraction of their method was not directly bound to organic matter but indirectly, since As species could have formed complexes with Fe and Ca cations bound to humic matter.

Table 1. Soil physicochemical properties (n = 29).

| | Clay g kg ⁻¹ | Silt g kg ⁻¹ | Sand g kg ⁻¹ | pH (1:1) | Total CaCO ₃ g kg ⁻¹ | Act. CaCO ₃ g kg ⁻¹ | OM g kg ⁻¹ | CEC cmol _c kg ⁻¹ | Available P mg kg ⁻¹ | Fed g kg ⁻¹ | Feo g kg ⁻¹ | Fed+Feo g kg ⁻¹ |
|-----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Mean ± Sd | 260 ± 73 | 181 ± 53 | 558 ± 90 | 7.8 ± 0.2 | 89 ± 66 | 13 ± 9 | 26 ± 12 | 24 ± 6 | 9.2 ± 4.9 | 43 ± 12 | 6.1 ± 6.0 | 36.9 ± 12 |
| CV % | 28 | 29 | 16 | 3 | 74 | 68 | 46 | 27 | 53 | 28 | 98 | 33 |
| Median | 250 | 180 | 568 | 7.9 | 68 | 11 | 23 | 22 | 8.2 | 39 | 4.0 | 35 |
| Min. | 150 | 80 | 410 | 7.3 | 12 | 0 | 13 | 9 | 1.8 | 26 | 2.0 | 14 |
| Max. | 430 | 320 | 766 | 8.3 | 236 | 30 | 64 | 37 | 27.6 | 78 | 30 | 75 |

Table 2. The BCR and Wenzel sequential extraction schemes.

| Step | Fraction | Extractant | Extraction Conditions | Extractant volume (mL) for 1g of soil |
|------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| B1 | Exchangeable/acid soluble | Acetic acid 0.11 mol L ⁻¹ | 16h shaking at 22 ± 5°C | 40 |
| B2 | Bound to Fe/Mn oxides (reducible) | Hydroxylammonium chloride 0.5 mol L ⁻¹ pH = 1.5 | 16h shaking at 22 ± 5°C | 40 |
| B3 | Bound to organic matter (oxidisable) | Hydrogen peroxide 8.8 mol L ⁻¹ Ammonium acetate 1.0 mol L ⁻¹ , pH = 2 ± 0.1 Aqua regia (HCl/HNO ₃) | 1h digestion at 85 ± 2°C 16h shaking at 22 ± 5°C | 10 + 10 50 |
| BRF ^b | Residual | | 16h digestion | 25 |
| W1 | Non-specifically sorbed | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 mol L ⁻¹ | 4h shaking at 20°C | 25 |
| W2 | Specifically sorbed | NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.05 mol L ⁻¹ | 16h shaking at 20°C | 25 |
| W3 | Amorphous and poorly crystalline hydrous oxides of Fe and Al | NH ₄ ⁺ - oxalate buffer 0.2 mol L ⁻¹ , pH = 3.25 | 4h shaking in the dark at 20°C | 25 |
| W4 | Well-crystallized hydrous oxides of Fe and Al | NH ₄ ⁺ - oxalate buffer 0.2 mol L ⁻¹ + ascorbic acid 0.1 mol L ⁻¹ , pH = 3.25 Aqua regia (HCl/HNO ₃) ^d | 30min shaking in the light at 96°C 16h digestion ^d | 25 |
| WRF | Residual | | | 25 |

^a Rauret et al. (1999)

^b not included in the BCR specifications

^c Wenzel et al. (2001)

^d modification of the original method

The second method used in this study was developed for metal cations and is the well-established BCR method (Rauret et al. 1999). The BCR protocol includes three chemical fractions of As in soils: (B1) exchangeable/acid soluble, (B2) reducible and (B3) oxidisable. A residual step (BRF) was also included to calculate % recovery of the method and to discuss on any relations of As extracted in BRF with the soil properties.

To check the recovery of arsenic by both SEPs, the sum of As concentrations in all fractions was expressed as percentage of total As concentration obtained by single step aqua regia digestion (total) and calculated as follows:

$$\text{Recovery \%} = [(W1 + W2 + W3 + W4 + \text{WRF}) / \text{Total}] \times 100 \text{ for the Wenzel scheme} \quad (1)$$

$$\text{Recovery \%} = [(B1 + B2 + B3 + \text{BRF}) / \text{Total}] \times 100 \text{ for the BCR scheme} \quad (2)$$

Mobility factor

The potential mobility of the metal(loid)s can be estimated by computing a relative index called Mobility Factor (MF %) based on the absolute and relative content of fractions weakly bound to soil components (Kabala and Singh 2001). According to Beeston et al. (2008), MF reflects the risk for the ecosystem that is related to the soil and is defined by the metalloid's fraction found within the non-specific sites. The most labile fractions of As are represented by steps B1 and W1 of the BCR and the Wenzel SEPs, respectively. The Mobility Factor for both schemes was calculated as follows:

$$\text{MF}_{\text{Wenzel}} \% = \frac{W1}{(W1 + W2 + W3 + W4 + \text{WRF})} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{MF}_{\text{BCR}} \% = \frac{B1}{(B1 + B2 + B3 + \text{BRF})} \times 100 \quad (4)$$

Analytical determinations

Arsenic concentrations were determined by flame atomic absorption spectrophotometry (F-AAS) using a Varian SpectrAA-300 system. Spectrometer working conditions were: 193.7 nm wavelength, 0.5 nm slit width, 10 mA lamp current, acetylene/nitrous oxide fuels, and reducing flame (red cone, 1–2 cm high). Under these operating conditions, the recommended optimum working range was 3–150 mg L⁻¹. A hydride generator Varian model VGA 77 (HG-AAS) was used for the determination of the lower As concentrations, under the same spectrometer working conditions, except that air was used as support gas. Hydride generator uses a chemical reaction to produce As hydrides and employs continuous flow technology where samples and liquid reagents (HCl; KI/NaBH₄ diluted in NaOH) are pumped together and mixed. The gaseous reactions products are swept by a flow of argon gas into the spectrometer. For the determination of available P concentrations, a SHIMADZU UV-1700 spectrophotometer was used.

At all stages of sample preparation and analysis, stringent precautions were taken to minimize contamination through air, glassware and reagents. All measurements were conducted in duplicate. A control sample was analyzed for every 10 samples and reproducibility was tested by re-analyzing 30% of the samples. The analytical precision, estimated as relative standard deviation (RSD) of three measurements, was less than 3%. ERM-CC141 European Reference Material (loam soil with certified As value of 7.5 ± 1.4 mg kg⁻¹, extracted with aqua regia following the ISO11466 protocol) was used to check the accuracy of aqua regia procedure followed for the total As determination. The results showed that mean As recovery ranged between 98 and 102%. For the preparation of the standard solutions through serial dilutions, a 1000 mg L⁻¹ As standard solution

was used. As a reagent blank, de-ionized water was used. All extracts were acidified with HNO_3 for stability reasons and kept in a refrigerator. Prior to analysis, all extracts, blank and the standard solutions were diluted to HCl 1M. As recommended by European Commission (2002) Decision No. 657/2002, the calibration curve was prepared with at least five points in the range $3 - 15 \mu\text{g L}^{-1}$ when the measurements were obtained by HG-AAS and $3 - 15 \text{mg L}^{-1}$ when the measurements were obtained by F-AAS. The linearity of the calibration curve was acceptable when the linear regression coefficient (r^2) was ≥ 0.998 .

All reagents used in this study were of analytical grade and supplied from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). The reagents used were: Ammonium sulfate $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, Ammonium dihydrogen phosphate $[(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4]$, di-Ammonium oxalate monohydrate $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$, Oxalic acid dihydrate $[(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, L(+)-Ascorbic Acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), Nitric acid (HNO_3 , 65% w/v), Hydrochloric acid (HCl , 37% w/v), Acetic acid (glacial) (CH_3COOH , 100% w/v), Hydroxylammonium chloride ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$), Hydrogen peroxide (H_2O_2 , 30% w/v), Ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), Potassium iodide (KI), Sodium borohydride (NaBH_4), Sodium Hydroxide (NaOH) and 1000mg L^{-1} As, (As_2O_5 in H_2O) Titrisol®.

Statistical analysis

The descriptive statistical parameters, correlation and cluster analysis were carried out by using STATISTICA software (Version 10).

Results and discussion

Arsenic fractionation using Wenzel SEP

According to Table 3, mean As recovery was 96.7%, higher than the average recovery (~88%) obtained by Wenzel et al. (2001). The higher centrifugation speed used in the present study (2300 vs. 1700 g in the original method) was probably resulted to better sedimentation of humus and clay particles and to less loss of the associated As in the subsequent filtration step in each fraction (Wenzel et al. 2001).

The mean percentage of As concentration into the various fractions followed the order $\text{W4} > \text{W3} > \text{WRF} > \text{W2} > \text{W1}$ (Table 3). Only 0.3% of As was released in the first fraction W1 (non-specifically sorbed), supporting that As availability in the studied soils is very low. However, the average As concentration extracted in W1 was 1.73mg kg^{-1} , considerably higher than the value of 0.62mg kg^{-1} for the freshwater protection, proposed by Wenzel et al. (2002) as the threshold of As concentration in W1 fraction. Arsenic extracted in the W1 fraction was highly correlated with the available phosphorus P (Table 5), indicating a similar geochemical behavior of As and P in terms of availability in the studied soils.

The specifically sorbed As (W2 fraction) was low (7.1%) but not negligible. Arsenic leached in W2 fraction was significantly correlated with both clay and Olsen-P content (Table 5), suggesting that As oxyanions form innersphere complexes with inorganic soil colloids and that As extracted in this step and Olsen-P may have been derived to some extent from the same pools in the studied soils. Considering that the basis of the second step of the Wenzel method is the exchange between phosphates (PO_4^{3-}) and arsenates (AsO_4^{3-}), the quantity and the type of inorganic colloids in soils are critical for arsenic bioavailability since any addition of PO_4^{3-} (e.g. through P fertilization) might increase As mobility in the soil environment.

Arsenic was mainly associated with the reducible phases since 30.1% and 33.3% of total As were extracted in the W3 and W4 fractions, respectively. Such results confirm the strong relation of As with Fe oxides mainly, but also with Mn and Al oxides in the matrix of the studied soils (Gasparatos 2012). As it is also reported in various studies (Dybowska et al. 2005; Müller et al. 2007), ammonium oxalate buffer used in the Wenzel SEP, sufficiently extract As associated with amorphous oxides.

Table 3. Descriptive statistics of As concentrations in the different fractions obtained by the Wenzel method in the studied soils (n = 29, mg kg⁻¹).

| | W1 | W2 | W3 | W4 | WRF | Sum* | Total ** | Recovery % | W1% | W2% | W3% | W4% | WRF% |
|-----------|----------|--------|----------|----------|----------|------------|------------|------------|----------|----------|-----------|-----------|------------|
| Mean ± Sd | 2.8± 3.1 | 64± 49 | 364± 288 | 419± 406 | 428± 525 | 1277± 1115 | 1415± 1305 | 96.7± 13.1 | 0.3± 0.3 | 7.1± 4.7 | 30.1± 9.8 | 33.3± 7.4 | 29.1± 12.6 |
| CV % | 111 | 76 | 79 | 97 | 123 | 87 | 92 | 13.5 | 93.9 | 66.2 | 32.5 | 22.3 | 43.3 |
| Median | 1.7 | 47 | 247 | 278 | 170 | 802 | 921 | 92.5 | 0.2 | 6.9 | 31.2 | 31.3 | 27.3 |
| Min. | 0.2 | 10 | 68 | 75 | 51 | 221 | 204 | 73.7 | 0.0 | 0.5 | 10.6 | 18.1 | 11.2 |
| Max. | 15 | 223 | 1050 | 1791 | 2185 | 4735 | 5001 | 124.0 | 1.3 | 19.3 | 48.3 | 48.6 | 63.3 |

W1, W2, W3, W4, WRF: non-specifically sorbed, specifically-sorbed, amorphous hydrous oxide-bound, crystalline hydrous oxide-bound and the residual fraction

* W1 + W2 + W3 + W4 + WRF

** single step digestion with Aqua regia

The addition of ascorbic acid in the buffer solution increases the reductive potential of the extractant to efficiently target the crystalline oxides (Shuman 1982). Indeed, As extracted in W3 and W4 fractions was significantly correlated with amorphous Fe (Feo) and free Fe (Fed) oxides (Table 5). However, As leached in the W4 fraction was positively but not significantly correlated with crystalline Fe oxides (Fed-Feo), indicating that NH_4 -oxalate buffer used in the third step adequately mobilized As from amorphous Fe oxides but the addition of ascorbic acid in the fourth step, though significantly increased the reductive potential of NH_4 -oxalate buffer, was partially succeed to extract As from the crystalline Fe oxides.

Arsenic extracted in the residual phase was 29.1% of the total As concentration. Residual As was significantly and positively related with As leached in W3 and W4 fractions (Table 5), strongly indicating a common origin of As extracted in W3, W4 and WRF fractions. The latter is in accordance with Alvarez et al. (2006) who suggest that the weathering of sulphide minerals may form a complex assemblage of As-bearing phases like iron oxides and iron arsenates. Moreover, the very low affinity of As for carbonates in the heavily polluted soils of this study is well manifested by the strong negative correlation between the WRF As fractions and the total and active carbonates content (Table 5).

Arsenic fractionation using BCR SEP

According to the BCR results, the mean As recovery was 90.2% (Table 4). Arsenic was found to be predominantly associated with the residual fraction (78.4%) followed by the reducible fraction (16.2%). Only minor portion of total As was leached in the B3 oxidisable (3.8%) and B1 exchangeable/acid soluble (1.6%) fractions.

Arsenic extracted in B1 can be considered as exchangeable/weakly bound to carbonates. It has been suggested that calcium carbonates can provide sites for As adsorption and that arsenate can interact with Ca^{2+} to form outer sphere complexes (Larios et al. 2012). In some SEPs specifically designed for As, acetate solutions were used to leach As from carbonates but failed to extract appreciable amounts of arsenic (Kim and Davis 2003; Matera et al. 2003). In this study, no significant relation between As extracted in B1 and carbonates content was found (Table 5). Results concerning the affinity of arsenic for carbonates are contradictory (Yolcubal and Akyol 2008). Although arsenic may co-precipitate with carbonates or incorporate into the lattice structure of calcite under alkaline pH (Alexandratos et al. 2007), it appears that calcite have negligible role in As immobilization in the presence of Fe oxy/hydroxides even in highly contaminated soils (Wenzel et al. 1998, 2001; Lombi et al. 2000).

Arsenic leached in the B1 step of the BCR scheme was strongly related with Olsen-P (Table 5), suggesting that As extracted in this step and Olsen-P may have been derived to some extent from the same pools in the studied soils.

A major limitation of the BCR procedure is that it underestimates the association of As with oxides and that does not differentiate between amorphous and crystalline oxides phases. It is well known that hydroxylamine hydrochloride has low dissolution efficiency for well-crystallized phases and therefore dissolves only amorphous Fe and Mn oxides (Rodriguez et al. 2003; Larios et al. 2013). However, considering that As extracted in B2 (16.2%) accounts for nearly half of the arsenic extracted from amorphous oxides in W3 (30.1%) fraction of the Wenzel SEP, hydroxylamine hydrochloride did not only fail to extract As from the crystalline oxides but it also failed to adequately release As from the amorphous oxides in the studied soils. This is further supported by the positive but non-significant correlations between Feo and Fed with As extracted in the reducible step of the BCR scheme (Table 5). The negative correlation between the B2 fraction and the total and active carbonates contents indicates a possible competition between carbonates and arsenates for binding sites on Fe oxides.

By dissolving organic matter with hydrogen peroxide in the third step of the BCR, As bound to organic substances and sulfides is released (Quevauviller 2002; Dybowska et al. 2005; Larios et al. 2012).

Table 4. Descriptive statistics of As concentrations in the different fractions obtained by the BCR method in the studied soils (n = 29, mg kg⁻¹).

| | B1 | B2 | B3 | BRF | Sum* | Total ** | Recovery % | B1% | B2% | B3% | BRF% |
|-----------|---------|-----------|---------|-----------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------|-----------|-------------|
| Mean ± Sd | 14 ± 14 | 228 ± 259 | 46 ± 45 | 943 ± 834 | 1231 ± 1087 | 1415 ± 1305 | 90.2 ± 10.2 | 1.6 ± 1.2 | 16.2 ± 9.6 | 3.8 ± 1.8 | 78.4 ± 10.5 |
| CV % | 106 | 114 | 98 | 88 | 88 | 92 | 11.3 | 77.3 | 59.0 | 46.9 | 13.4 |
| Median | 8.2 | 111 | 33 | 650 | 826 | 921 | 88.9 | 1.3 | 13.0 | 4.0 | 80.2 |
| Min. | 1.4 | 8.3 | 3.1 | 136 | 163 | 204 | 73.0 | 0.1 | 1.2 | 0.5 | 55.6 |
| Max. | 68 | 1209 | 186 | 3206 | 4195 | 5001 | 111.9 | 4.1 | 36.1 | 8.8 | 98.1 |

B1, B2, B3, BRF: exchangeable/weak acid soluble, reducible, oxidisable and residual fraction

* B1 + B2 + B3 + BRF

** single step digestion with Aqua regia

Table 5. Matrix of correlation coefficients between As chemical fractions of both Wenzel and BCR methods and the soil properties (n = 29).

| | Clay | pH | T.CaCO ₃ | A.CaCO ₃ | OM | CEC | P | Fed | Feo | Fed-Feo | W1 | W2 | W3 | W4 | WRF | B1 | B2 | B3 | BRF | Total As |
|---------------------|---------|--------|---------------------|---------------------|-------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|----------|
| Clay | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH | 0.41* | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T.CaCO ₃ | -0.24 | 0.15 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A.CaCO ₃ | 0.15 | 0.51** | 0.74*** | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| OM | -0.16 | -0.34 | 0.05 | -0.23 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| CEC | 0.77*** | 0.22 | -0.22 | -0.01 | 0.36 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| P | 0.22 | -0.02 | -0.31 | -0.07 | -0.10 | 0.29 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | |
| Fed | 0.45* | -0.10 | -0.61*** | -0.47* | -0.13 | 0.32 | 0.18 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| Feo | -0.02 | 0.11 | -0.08 | 0.10 | -0.02 | 0.02 | 0.10 | 0.21 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| Fed-Feo | 0.45* | -0.16 | -0.56** | -0.51** | -0.12 | 0.33 | 0.13 | 0.88*** | -0.28 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| W1 | 0.35 | 0.12 | -0.18 | 0.14 | -0.04 | 0.32 | 0.70*** | 0.09 | 0.18 | 0.01 | 1.00 | | | | | | | | | |
| W2 | 0.43* | 0.15 | -0.23 | 0.12 | -0.08 | 0.44* | 0.55** | 0.36 | 0.48** | 0.12 | 0.76*** | 1.00 | | | | | | | | |
| W3 | -0.25 | -0.36 | -0.34 | -0.29 | -0.02 | 0.22 | 0.35 | 0.26 | 0.56** | -0.02 | 0.19 | 0.39* | 1.00 | | | | | | | |
| W4 | -0.12 | -0.36 | -0.48** | -0.49** | -0.14 | -0.22 | 0.30 | 0.45* | 0.22 | 0.34 | -0.06 | 0.07 | 0.65*** | 1.00 | | | | | | |
| WRF | -0.30 | -0.46* | -0.39* | -0.48** | -0.23 | -0.40* | 0.31 | 0.22 | 0.03 | 0.20 | -0.10 | -0.16 | 0.64*** | 0.86*** | 1.00 | | | | | |
| B1 | 0.08 | -0.07 | -0.21 | 0.03 | -0.06 | 0.13 | 0.85*** | -0.04 | 0.06 | -0.07 | 0.76*** | 0.56** | 0.34 | 0.12 | 0.17 | 1.00 | | | | |
| B2 | -0.12 | -0.16 | -0.46* | -0.41* | -0.02 | -0.13 | 0.50** | 0.34 | 0.32 | 0.18 | 0.20 | 0.29 | 0.63*** | 0.84*** | 0.65*** | 0.35 | 1.00 | | | |
| B3 | -0.28 | -0.30 | -0.13 | -0.17 | -0.04 | -0.31 | 0.43* | 0.10 | 0.33 | -0.07 | 0.17 | 0.22 | 0.77*** | 0.71*** | 0.69*** | 0.43* | 0.73*** | 1.00 | | |
| BRF | -0.24 | -0.43* | -0.46* | -0.49** | -0.21 | -0.32 | 0.39* | 0.36 | 0.20 | 0.26 | -0.01 | 0.03 | 0.73*** | 0.93*** | 0.96*** | 0.24 | 0.77*** | 0.77*** | 1.00 | |
| Total As | -0.21 | -0.38* | -0.47* | -0.48** | -0.16 | -0.28 | 0.41* | 0.35 | 0.26 | 0.22 | 0.04 | 0.11 | 0.77*** | 0.96*** | 0.92*** | 0.27 | 0.87*** | 0.80*** | 0.98*** | 1.00 |

W1, W2, W3, W4, WRF: non-specifically sorbed, specifically sorbed, amorphous hydrous oxide-bound, crystalline hydrous oxide-bound and the residual fraction
 B1, B2, B3, BRF: exchangeable/weak acid soluble, reducible, oxidisable and residual fraction
 *, **, *** significant at the 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels

The low percentage of As found in B3 indicates the weak tendency of As to form stable complexes with organic substances (Table 4). Indeed, As concentration in the oxidisable fraction (B3) of the BCR method was not correlated with the organic matter content of the studied soils (Table 5), suggesting that As extracted in this step was mainly bound to sulfides. Dybowska et al. (2005) by including an oxidizing step in the Wenzel SEP concluded that the amount of As extracted in this step most likely represented the sulfide bound arsenic. Nevertheless, some studies report strong positive correlations between the dissolved organic carbon (DOC) and As concentrations in soil solutions, and suggest that organic matter can provide sites for As adsorption (Thanabalasingam and Pickering 1986; Buschmann et al. 2006). Yet, other authors report that increased SOM and DOC contents increased As solubility by decreasing As sorption on Fe oxy/hydroxides, due to the anionic nature of organic compounds that compete with As oxyanions for sorption sites (Redman et al. 2002; Wenzel et al. 2002).

In the studied soils and in line with Müller et al. (2007), Larios et al. (2012) and Abad-Valle et al. (2018), most of the total As (78.4%) was found in the residual fraction (BRF) suggesting that the amount of As that hydroxylammonium chloride failed to extract from the reducible phase being incorporated into the oxidisable and residual fractions of the BCR scheme. In accordance to the results obtained by the Wenzel scheme for the studied soils, As extracted in BRF was strongly correlated with As extracted in B2 and B3 (Table 5) indicating a common origin of As extracted in these steps.

For the heavily contaminated soils of this study, BCR scheme did not provide evidence for any relations between As leached in the various steps of the procedure and the soil constituents that are considered as the most important for As sequestration in contaminated soils.

Cluster analysis

To better clarify possible associations between the Wenzel and the BCR operationally defined chemical fractions of As, cluster analysis was performed on the normalized data. As it is shown in Figure 1, two main clusters were obtained. The first cluster consists from W1, W2, and B1 fractions while in the second cluster the remaining fractions were grouped together. The obtained associations between the fractions of the two protocols indicate that the reagents used in the BCR method were partially and not specifically extracted As from the targeted soil phases. The close relation between B3 and W3 that were grouped together in the second cluster implies that H₂O₂ used in the BCR scheme to release As bound to organic matter and sulfides, may have also extracted As from Fe oxides that were associated with Mn phases (Larios et al. 2012). Furthermore, though the residual BRF and WRF fractions were strongly related, BRF was 2.5 times higher than WRF (BRF: 78.4%, WRF: 29.1%), supporting the incomplete dissolution of Fe oxides by hydroxylammonium chloride.

Mobility factor (MF)

According to the results, the mean MF of As obtained by the Wenzel method was $0.34 \pm 0.32\%$ (min: 0.00, max: 1.30) while the BCR method produced a mean MF percentage of $1.56 \pm 1.21\%$ (min: 0.11, max: 4.10). Both schemes demonstrated the very low mobility of As in the studied soils indicating the affinity of As for more stable soil phases, such as amorphous and crystalline oxides of Fe/Al/Mn, and primary and secondary minerals. However, possible alteration in the soil conditions (e.g. fluctuations of redox potential, changes of pH, phosphate addition) could significantly increase As mobility and availability, thus posing a severe environmental threat by entering into the biota or by contaminating ground waters (Gasparatos et al. 2015). Additionally, since acetic acid used in B1 is stronger extractant than ammonium sulfate used in W1, BCR method seems to overestimate the actual availability of As in soils. The BCR protocol is frequently used in risk assessment studies to simultaneously provide information on the potential bioavailability of many metals in polluted soils. In this context, and in terms of routine environmental monitoring

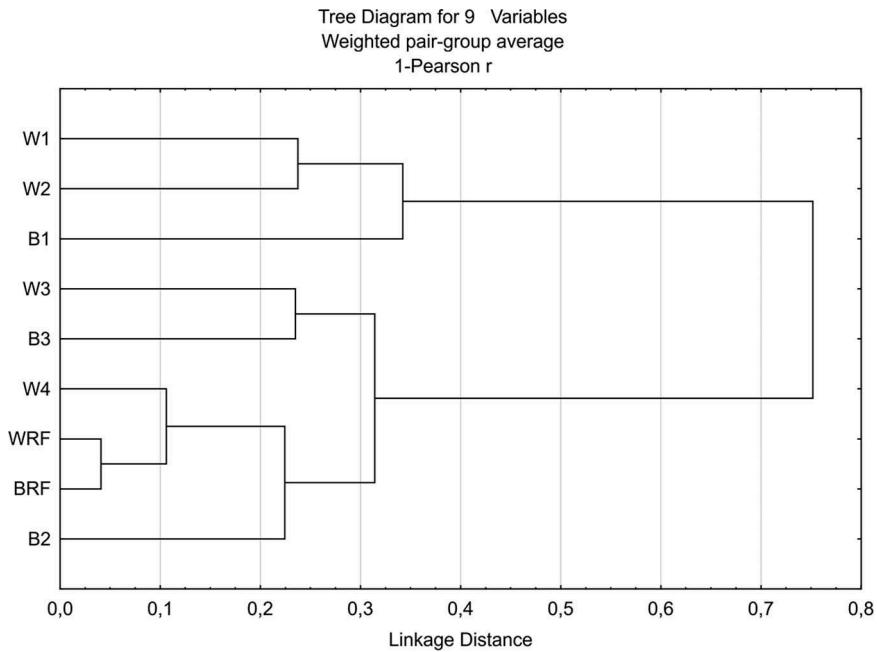


Figure 1. Hierarchical clustering results of the Wenzel (W1: non-specifically sorbed, W2: specifically-sorbed, W3: amorphous hydrous oxide-bound, W4: crystalline hydrous oxide-bound, WRF: residual) and the BCR (B1: exchangeable/weak acid soluble, B2: reducible, B3: oxidisable, BRF: residual) operationally defined chemical fractions.

studies, the B1 fraction can describe to some extent As availability in contaminated soils, in accordance with Larios et al. (2012).

Conclusions

In order to investigate As geochemical behavior in the mine-affected surface soils of Lavrion, the Wenzel and the BCR sequential extraction procedures were applied. In the Wenzel method, the highest percentage of As was extracted from the amorphous/poorly crystallized and the well crystallized Fe, Al, Mn oxides, while in the BCR method the highest amount of As was found to be retained in the residual soil phase. According to both schemes, the mobility of arsenic in the Lavrio top soils was low.

The significant correlations between the specifically-sorbed and the reducible As fractions of the Wenzel method with clay, amorphous and free iron oxides respectively, strongly indicate that the reagents used in the Wenzel method are successfully targeting the corresponding soil phases. On the contrary, the reagents used in the BCR method failed to provide similar relations, primarily due to the incomplete dissolution of metal oxides by the hydroxylamine hydrochloride reagent that resulted to lower As content in the reducible phase. However, when the BCR method is used to describe the partitioning of several metals in polluted soils, it can also provide a first indication of As mobility.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Abad-Valle P, Álvarez-Ayuso E, Murciego A, Muñoz-Centeno LM, Alonso-Rojo P, Villar-Alonso P. 2018. Arsenic distribution in a pasture area impacted by past mining activities. *Ecotoxicol Environ Saf.* 147:228–237.
- Alexandratos VG, Elzinga EJ, Reeder RJ. 2007. Arsenate uptake by calcite: macroscopic and spectroscopic characterization of adsorption and incorporation mechanisms. *Geochim Cosmochim Acta.* 71:4172–4187.
- Alloway BJ. 2013. Heavy metals in soils. Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. *Environ pollut.* 22:241–282.
- Alvarez R, Ordóñez A, Loredó J. 2006. Geochemical assessment of an arsenic mine adjacent to a water reservoir (León, Spain). *Environ Geol.* 50:873–884.
- Beeston MP, Van Elteren JT, Šlejček Z, Glass HJ. 2008. Migration of arsenic from old tailings ponds - A case study on the King Edward Mine, Cornwall, UK. *Environ Res.* 108:28–34.
- Bouyoucos GH. 1951. A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soils. *Agron J.* 43:434–438.
- Buschmann J, Kappeler A, Lindauer U, Kistler D, Berg M, Sigg L. 2006. Arsenite and arsenate binding to dissolved humic acids: influence of pH type of humic acid, and aluminum. *Environ Sci Technol.* 40:6015–6020.
- Caille N, Swanwick S, Zhao FJ, McGrath SP. 2004. Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* from arsenic contaminated soils and the effect of liming and phosphate fertilization. *Environ Pollut.* 132:113–120.
- Chang SC, Jackson ML. 1957. Fractionation of soil phosphorus. *Soil Sci.* 84:133–144.
- Demetriades A. 1999. Geochemical atlas of the Lavrion urban area for environmental protection and planning. Vol. 2. Institute of Geology and Mineral Exploration, Athens, Greece, Open File Report.
- Drahota P, Grösslová Z, Kindlová H. 2014. Selectivity assessment of an arsenic sequential extraction procedure for evaluating mobility in mine wastes. *Anal Chim Acta.* 839:34–43.
- Dybowska A, Farago M, Valsami-Jones E, Thornton I. 2005. Operationally defined associations of arsenic and copper from soil and mine waste in south-west England. *Chem Spec Bioavailab.* 17(4):147–160.
- European Commission. 2002. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC, Brussels.
- Gamaletsos P, Godelitsas A, Dotsika E, Tzamos E, Göttlicher J, Filippidis A. 2013. Geological sources of as in the environment of greece: a review. threats to the quality of groundwater resources: prevention and control, Hdb. *Env Chem.* 40:77–114.
- Gasparatos D. 2012. Fe-Mn concretions and nodules to sequester heavy metals in soils. In: Lichtfouse E, Schwarzbauer J, Robert D. eds. *Environmental chemistry for a sustainable world, Vol 2: remediation of air and water pollution.* Springer Science + Business Media B.V; Netherlands, p. 443–474.
- Gasparatos D, Haidouti C. 2001. A comparison of wet oxidation methods for determination of total phosphorus in soils. *J Plant Nutr Soil Sci.* 164:435–439.
- Gasparatos D, Mavromati G, Kotsovilis P, Massas I. 2015. Fractionation of heavy metals and evaluation of the environmental risk for the alkaline soils of the Thriassio plain: a residential, agricultural and industrial area in Greece. *Environ Earth Sci.* 74(2):1099–1108.
- Gault AG, Cooke DR, Townsend AT, Charnock JM, Poly DA. 2003. Mechanisms of arsenic attenuation in acid mine drainage from Mount Bischoff, western Tasmania. *Sci Total Environ.* 345:219–228.
- Gedik K, Kongchum M, Boran M, Delaune RD. 2016. Adsorption and desorption of arsenate in Louisiana rice soils. *Arch Agron Soil Sci.* 62(6):856–864.
- Gupta DK, Srivastava S, Huang H, Romero-Puertas MC, Sandalio LM. 2011. Arsenic tolerance and detoxification mechanisms in plants. In: Sherameti I, Varma A, Eds. *Detoxification of heavy metals (Book series: soil biology).* Heidelberg: Springer; p. 169–180.
- Kabala C, Singh BR. 2001. Fractionation and mobility of copper, lead, and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter. *J Environ Qual.* 30:485–492.
- Kim EJ, Yoo JC, Baek K. 2014. Arsenic speciation and bioaccessibility in arsenic-contaminated soils: sequential extraction and mineralogical investigation. *Environ Pollut.* 186:29–35.
- Kim JY, Davis AP. 2003. Stabilization of available arsenic in highly contaminated mine tailings using Iron. *Environ Sci Technol.* 37(1):189–195.
- Larios R, Fernández-Martínez R, Rucandio I. 2012. Comparison of three sequential extraction procedures for fractionation of arsenic from highly polluted mining sediments. *Anal Bioanal Chem.* 402:2909–2921.
- Larios R, Fernández-Martínez R, Rucandio I. 2013. Assessment of a sequential extraction procedure for arsenic partitioning and application to samples from different pollution sources. *Anal Methods.* 5:4096–4104.
- Liu G, Cai Y. 2007. Arsenic speciation in soil: an analytical challenge for understanding arsenic biogeochemistry. In: Sarkar D, Hannigan R, Datta R, eds. *Developments in environmental sciences, Vol. 5: concepts and applications in environmental geochemistry.* Elsevier; Netherlands, p. 687–711.
- Loeppert RH, Suarez DL. 1996. Carbonate and gypsum. In: Bigham JM, Bartels JM, ed. *Methods of soil analysis, part 3, chemical methods.* Madison (Wisconsin, Etats-Unis): SSSA, ASA; p. 437–474.

- Lombi E, Sletten RS, Wenzel WW. 2000. Sequentially extracted arsenic from different size fractions of contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 124:319–332.
- Massas I, Gasparatos D, Ioannou D, Kalivas D. 2017. Signs for secondary buildup of heavy metals in soils at the periphery of Athens international airport, Greece. *Environ Sci Pollut Res.* doi:10.1007/s11356-017-0455-7
- Matera V, Hecho IL, Laboudigue A, Thomas P, Tellier S, Astruc M. 2003. A methodological approach for the identification of arsenic bearing phases in polluted soils. *Environ Pollut.* 126:51–64.
- Mehra OP, Jackson ML. 1960. Iron oxide removal from soils and clay by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays and Clay Min.* 7:317.
- Misopolinos N, Silleos N, Kosmas K, Bilas G, Karapetsas N, Dionisiou N. 2015. Development of an integrated system for soil geographic data and delineation of agricultural zones in Greece. Funded by Payment and Control Agency for Guidance and Guarantee Community Aid (OPEKEPE) of the Greek Ministry of Agricultural Development and Food, Athens, Greece.
- Müller K, Daus B, Morgenstern P, Wennrich R. 2007. Mobilization of antimony and Arsenic in soil and sediment samples – evaluation of different leaching procedures. *Water Air Soil Pollut.* 183(1–4):427–436.
- Nelson DW, Sommers LE. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR, eds. *Methods of soil analysis. Part 2: chemical and microbiological properties.* Madison (WI, USA): ASA, SSSA.
- NF ISO 10693. 1995. Détermination de la teneur en carbonate – méthode volumétrique. *Qualité des sols AFNOR*; p. 177–186.
- Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS, Dean LA. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Vol. 939. Washington (DC): US Dept Agric Circ.
- Quevauviller P. 2002. Methodologies in soil and sediment fractionation studies. Single and sequential extraction procedures. *Royal Soc Chem.* 1-2:1–27.
- Rauret G, López-Sánchez JF, Sahuquillo A, Rubio R, Davidson C, Ure A, Quevauviller P. 1999. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *J Environ Monit.* 1:57–61.
- Redman A, Macalady D, Ahmann D. 2002. Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. *Environ Sci Technol.* 36(13):2889–2896.
- Rhoades JD. 1982. Cation exchange capacity. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR, eds. *Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbiological properties.* 2nd ed. Madison (WI): Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA; p. 149–157.
- Rodriguez RR, Basta NT, Casteel SW, Armstrong FP, Ward DC. 2003. Chemical extraction methods to assess bioavailable arsenic in soil and solid media. *J Environ Qual.* 32:876–884.
- Schwertmann U, Taylor RM. 1989. Iron oxides. In: Dixon JB, Weed SB, Eds. *Minerals in soil environments.* second ed. Madison (WI): SSA; p. 380–438.
- Shuman LM. 1982. Separating soil iron - and manganese - oxide fractions for microelement analysis. *Soil Sci Soc Am J.* 46:1099–1102.
- Thanabalasingam P, Pickering W. 1986. Arsenic sorption by humic acids. *Environ Pollut.* 12(3):233–246.
- Van Herreweghe S, Swennen R, Vandecasteele C, Cappuyns V. 2003. Solid phase speciation of arsenic by sequential extraction in standard reference materials and industrially contaminated soil samples. *Environ Pollut.* 122:323–342.
- Wenzel W, Brandstetter A, Brauner E, Jockwer F, Lombi E, Mushtaq A, Kirchbaumer N, Schnepf A, Tulipan M, Unterfrauner H, et al. 1998. Arsenic in soils of Austria (Forschungsbericht). Forschungsprojekt der Bund/Bundesländer-Kooperation, im Auftrag des Landes Salzburg, Abteilung Land - und Forstwirtschaft, Salzburg, Österreich.
- Wenzel W, Kirchbaumer N, Prohaska T, Stingeder G, Lombi E, Adriano D. 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Anal Chim Acta.* 436(2):309–323.
- Wenzel WW, Brandstetter A, Wutte H, Lombi E, Prohaska T, Stingeder G, Adriano DC. 2002. Arsenic in field-collected soil solutions and extracts of contaminated soils and its implication to soil standards. *J Plant Nutr Soil Sci.* 165:221–228.
- Xenidis A, Papassiopi N, Komnitsas K. 2003. Carbonate-rich mining tailings in Lavrion: risk assessment and proposed rehabilitation schemes. *Adv Environ Res.* 7:479–494.
- Yolcubal I, Akyol NH. 2008. Adsorption and transport of arsenate in carbonate-rich soils: coupled effects of nonlinear and rate-limited sorption. *Chemosphere.* 73:1300–1307.
- Zeien H, Brümmer G. 1991. Ermittlung der Mobilität und Bindungsformen von Schwermetallen in Böden mittels Sequentieller Extraktionen [Determination of the mobility and the binding forms of heavy metals in soils using sequential extractions]. *Mitt Dtsch Bodenk Ges.* 66(1):439–442. German.

Journal of Soils and Sediments

Single and combined effect of chelating, reducing agents and agro-industrial by-product treatments on As, Pb and Zn mobility in a mine affected soil over time --Manuscript Draft--

| | |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | Single and combined effect of chelating, reducing agents and agro-industrial by-product treatments on As, Pb and Zn mobility in a mine affected soil over time |
| Article Type: | Research Article |
| Section/Category: | Soils |
| Corresponding Author: | Ioannis Massas Agricultural University of Athens GREECE |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | Agricultural University of Athens |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Georgios Kalyvas |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | Georgios Kalyvas Dionisios Gasparatos Christiana Liza Ioannis Massas |
| Order of Authors Secondary Information: | |
| Funding Information: | |
| Abstract: | <p>Abstract</p> <p>Purpose: A heavily polluted soil from Lavrion, Greece, a mine affected area with serious soil degradation problems, was used in a laboratory incubation experiment to investigate the effect of EDTA (chelating agent), sodium dithionite (reducing agent), and olive mill wastewater (agro-industrial bio-product) and their combinations, on As, Pb, and Zn mobility over time.</p> <p>Materials and methods: Soil samples were incubated for 1, 3, 7, 15, 30, 60, and 90 days. At each incubation time the easily mobilizable fraction of the elements was obtained by (NH₄)₂SO₄ (for As) and CH₃COOH (for Pb / Zn). To investigate the treatment effect on elements distribution among the soil chemical fractions, two different sequential extraction protocols (SEPs), Wenzel (for As) and BCR (for Pb and Zn) were applied to the soil samples incubated for 90 days. To elucidate the role of Fe / Mn oxyhydroxides on As, Pb and Zn mobility, Fe and Mn concentrations were also determined in all acetic acid and BCR extracts.</p> <p>Results and discussion: EDTA and all treatments that contained EDTA resulted to significantly higher available concentrations of the metal(loid)s than the non-EDTA treatments. Sodium dithionite, as reducing agent, did not alter the mobility of the studied elements and when combined with EDTA suppressed the efficacy of EDTA. Olive mill wastewater (OMW) enhanced only As mobility, probably due to competition between As and P added with OMW for sorption sites. The results of both SEPs strongly indicated that the increased amounts of As, Pb, and Zn in the easily mobilizable / exchangeable fractions obtained for the EDTA treatments were mainly due to the ability of EDTA to complex metal(loid)s bound to amorphous oxides of Fe / Mn. Furthermore, principal component analysis (PCA) results clearly support that As, Pb, and Zn increased available concentrations were mainly originated from the partial dissolution of Fe oxides.</p> <p>Conclusions: EDTA increased As, Pb and Zn mobility, in contrast to the minor effect of</p> |

| | |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | dithionite that restricted the chelating strength of EDTA. OMW increased only As solubility, while combined with EDTA and dithionite either reinforced or suppressed extracting ability of these agents. As indicated by the sequential extractions results that were also strongly supported by PCA outcome, the observed higher available elements concentrations were primarily derived from the partial dissolution of Fe oxides. |
| Suggested Reviewers: | Antonis Zorpas antonis.zorpas@ouc.ac.cy Helena Grčman helena.grcman@bf.uni-lj.si |
| Opposed Reviewers: | |

To: The Editor,
Journal of Soils and Sediments

24 September 2018

Dear Sir,

Please find attached the manuscript entitled: '*Single and combined effect of chelating, reducing agents and agro-industrial by-product treatments on As, Pb and Zn mobility in a mine affected soil over time*' by G. Kalyvas, D. Gasparatos, C. Liza and I. Massas, which we would like you to consider for publication in the Journal of Soils and Sediments.

The aim of our study was to investigate the effect of Na₂-EDTA 0.01 M, Sodium Dithionite 0.01 M and Olive Mill Wastewater 40% and their combinations on As, Pb and Zn mobility and chemical behavior in a heavily polluted soil from an inhabited former mining area in Lavrion, Greece. As it is historically recorded, mining and metallurgical activities in this area are the oldest in Greece and among the oldest in Mediterranean since they were practiced for more than 3000 years.

Treated soil samples incubated for 1, 3, 7, 15, 30, 60, and 90 days and at each incubation time the easily mobilizable fraction of the elements was obtained by (NH₄)₂SO₄ (for As) and CH₃COOH (for Pb / Zn). To examine possible alterations of As, Pb and Zn partitioning in the studied soil, at the end of the 90 days incubation period all samples were subjected to two different sequential extraction protocols: (i) the widely used BCR method (Pb and Zn) and (ii) a fractionation scheme specifically developed for As, by Wenzel et al. 2001. Since all studied elements are greatly associated with the reducible phase in soils, Fe and Mn concentrations were also determined at all stages.

We consider that the main merits of our work are: (i) this is the first study aiming to enhance for phyto-remediation purposes As, Pb and Zn availability in a soil from Lavrion, an area that faces one the most serious land degradation problems in the Mediterranean region. Moreover, since soils from mining areas are contaminated with both As and heavy metals, the combination of reducing and chelating agents could be promising for the concurrent removal of both anionic As and cationic heavy metals from this mine affected soil (ii) to our knowledge, it is the first evaluation of the efficacy of olive mill wastewaters, that are enormously produced to olive oil producing countries, to promote As, Pb and Zn mobility over time in soils from former mining areas and (iii) the thorough data analysis and interpretation that conclusively highlight amorphous Fe oxides dissolution as the main source of elements increased availability in a mine affected soil treated with EDTA and olive mill wastewaters.

All authors listed have approved the manuscript and declare that this is an original contribution and none of the material in this paper is under consideration for publication elsewhere.

We look forward to hearing from you in due course.

Yours sincerely

Ioannis Massas
Associate Professor,
Soil Science and Agricultural Chemistry Lab,
Dept. of Natural Resources Management and Agricultural Engineering,
Agricultural University of Athens,
75 Iera Odos st.,
Athens 118 55
GREECE
e-mail massas@aua.gr, tel. ++3010 5294098, fax ++3010 5294092

[Click here to view linked References](#)

1 **Single and combined effect of chelating, reducing agents and agro-industrial by-**
2 **product treatments on As, Pb and Zn mobility in a mine affected soil over time**

3

4 Georgios Kalyvas¹, Dionisios Gasparatos², Christina Anastasia Liza¹, Ioannis
5 Massas^{1,*}

6

7 ¹ *Agricultural University of Athens, Soil Science Laboratory, Iera Odos 75, 11855,*
8 *Greece*

9 ² *Aristotle University of Thessaloniki, Soil Science Laboratory, 54124, Greece*

10

11 * *Corresponding author: E-mail address: massas@aua.gr*

12

13 **Abstract**

14 **Purpose** A heavily polluted soil from Lavrion, Greece, a mine affected area with
15 serious soil degradation problems, was used in a laboratory incubation experiment to
16 investigate the effect of EDTA (chelating agent), sodium dithionite (reducing agent),
17 and olive mill wastewater (agro-industrial bio-product) and their combinations, on As,
18 Pb, and Zn mobility over time.

19 **Materials and methods** Soil samples were incubated for 1, 3, 7, 15, 30, 60, and 90
20 days. At each incubation time the easily mobilizable fraction of the elements was
21 obtained by (NH₄)₂SO₄ (for As) and CH₃COOH (for Pb / Zn). To investigate the
22 treatment effect on elements distribution among the soil chemical fractions, two
23 different sequential extraction protocols (SEPs), Wenzel (for As) and BCR (for Pb
24 and Zn) were applied to the soil samples incubated for 90 days. To elucidate the role

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

of Fe / Mn oxyhydroxides on As, Pb and Zn mobility, Fe and Mn concentrations were also determined in all acetic acid and BCR extracts.

Results and discussion EDTA and all treatments that contained EDTA resulted to significantly higher available concentrations of the metal(loid)s than the non-EDTA treatments. Sodium dithionite, as reducing agent, did not alter the mobility of the studied elements and when combined with EDTA suppressed the efficacy of EDTA. Olive mill wastewater (OMW) enhanced only As mobility, probably due to competition between As and P added with OMW for sorption sites. The results of both SEPs strongly indicated that the increased amounts of As, Pb, and Zn in the easily mobilizable / exchangeable fractions obtained for the EDTA treatments were mainly due to the ability of EDTA to complex metal(loid)s bound to amorphous oxides of Fe / Mn. Furthermore, principal component analysis (PCA) results clearly support that As, Pb, and Zn increased available concentrations were mainly originated from the partial dissolution of Fe oxides.

Conclusions EDTA increased As, Pb and Zn mobility, in contrast to the minor effect of dithionite that restricted the chelating strength of EDTA. OMW increased only As solubility, while combined with EDTA and dithionite either reinforced or suppressed extracting ability of these agents. As indicated by the sequential extractions results that were also strongly supported by PCA outcome, the observed higher available elements concentrations were primarily derived from the partial dissolution of Fe oxides.

Keywords Soil incubation, EDTA, Dithionite, Olive mill wastewater, Arsenic, Heavy metals.

1
2
3
4
50 **1 Introduction**

51

52 Heavy metals and metalloids occur naturally in soils. Still, anthropogenic
53 activities associated with metalliferous mining and metallurgical industries, fossil
54 fuels combustion, application of agrochemicals, fertilizers, liming materials, sewage
55 sludge, manure, municipal wastes, and transport emissions are the main sources of
56 soil enrichment with metal(loid)s posing a severe threat to the ecosystem (Massas et
57 al. 2018). When the concentrations of the metal(loid)s in soils reach or exceed the
58 corresponding toxic thresholds for humans, animals or plants, cleanup actions are
59 needed (Kalyvas et al. 2018b).

60 Various physical, chemical, and biological techniques have been proposed to
61 remediate metal polluted soils. Conventional methods include in situ vitrification, soil
62 incineration, excavation and landfill, soil spading, soil washing, soil flushing,
63 chemical fixation (Ali et al. 2013; Yao et al. 2012), while greener and cost-effective
64 methods have been emerged such as phytoimmobilization, phytostabilization,
65 phytoextraction, and phytovolatilization (Sarwar et al. 2017; Padmavathiamma and Li
66 2007). Metal(loid)s cannot be microbially or chemically degraded but they are only
67 transformed from one oxidation state or organic complex to another becoming more
68 or less soluble (Garbisu and Alkorta 2001). Therefore, most of the remediation
69 strategies target to the immobilization or to the mobilization of the toxic metal(loid)s
70 in the soil media.

71 Depending on the remediation approach, several chemical reagents and
72 amendments have been used to enhance the mobilization of the contaminants.
73 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) chelating agent, Sodium dithionite
74 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) reductive agent, and olive mill wastewater (OMW) that induce both

1
2
3
4
5
6
75 complexation and reductive reactions in soils, are amongst those that have been used
76 to achieve redistribution of contaminants in the soil solid phases in order to increase
77 their mobility / bioavailability (Bolan et al. 2014; Jelusic et al. 2014).

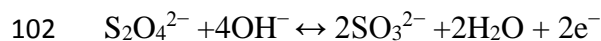
78 EDTA is an aminopolycarboxylic acid with extremely high complexing
79 capabilities that efficiently extracts potentially toxic metals from surface sites of
80 different soil solid phases (Manouchehri and Bermond 2009). The new formed metal-
81 EDTA complexes are water soluble and therefore can be leached out of the soil or in
82 case of enhanced phytoextraction strategies, the increased metal solubility /
83 availability promotes plant uptake (Udovic and Lestan 2012; Chen et al. 2007). Soil
84 pH, redox potential, metal(loid) speciation, ions competition, the type of the
85 metal(loid) bond with the soil fractions, and exchange reactions, are amongst the most
86 important factors that control EDTA's chemical behavior and effectiveness as a
87 chelating agent in the soil media (Bolan et al. 2014; Nowack 2002).

88 Oxidation - reduction soil conditions are critical parameters that affect the
89 geochemical behavior of the metal(loid)s (Chuan et al. 1996; Gasparatos 2012). By
90 regulating soil redox conditions, the solubility of the metal(loid)s can be increased.
91 Indeed, reduced soil conditions promote the reductive dissolution of Fe-Mn
92 oxyhydroxides and result to the release of significant amounts of adsorbed metals
93 (Gasparatos 2013). Moreover, reduced conditions weaken the binding of the metals
94 with the soil solid fractions by lowering their oxidation state and thus increasing their
95 solubility (Kim et al. 2015; Varadachari et al. 2006; Abumaizar and Smith 1999). The
96 ability of dithionite salts such as sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) to produce reduced
97 conditions in soils is well known (Kim et al. 2015; Mehra and Jackson 1960; Paul et
98 al. 2003). Dithionite anions ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$) consist a strong reducing agent that exhibit a

1 99 standard reduction potential (E°) of -1.12V in alkaline conditions (Kim et al. 2016).

2 100 Dithionite anions are oxidized to sulfate anions according to the following reaction:
3
4

5 101



9 103

10
11
12 104 Greece is amongst the biggest producers of olive oil worldwide (FAOSTAT
13
14 105 2013). According to the method used for oil extraction, olive oil processing may
15
16 106 result to the generation of significant quantities of olive mill wastewater (OMW)
17
18 107 consisted by olive tissue and process water (Azbar et al. 2004). This dark colored by-
19
20 108 product has an acidic pH $\sim 4-6$, high organic load (i.e. proteins, lipids,
21
22 109 polysaccharides) and C/N ratio, and contains large amounts of toxic phenolic
23
24 110 compounds (Morillo et al. 2009). The use of OMWs as a soil amendment for
25
26 111 remediation purposes, can highly influence soil redox processes and promote
27
28 112 chelation that enhance metal(loid)s solubility and leaching (Pardo et al. 2017).
29
30
31
32

33
34 113 Sequential extraction procedures (SEPs) were developed to assess metal(loid)s
35
36 114 partitioning into the different soil fractions. Despite the inherent weaknesses of these
37
38 115 procedures (i.e. limited selectivity of the extractants used, re-adsorption and
39
40 116 precipitation phenomena during extraction, poor reproducibility), SEPs are a useful
41
42 117 tool for the evaluation of metal(loid)s geochemical behavior in soils (Kalyvas et al.
43
44 118 2018a; Gasparatos et al. 2015; Drahota et al. 2014; Zimmerman and Weindorf, 2010).
45
46 119 BCR partitioning scheme is a widely adopted fractionation method developed and
47
48 120 standardized for metal cations by the Community Bureau of Reference, now
49
50 121 Measurements and Testing Programme (SM & T) (Rauret et al. 1999; Quevauviller
51
52 122 2002). Like BCR, most extraction procedures are based on the cationic nature of
53
54 123 heavy metals and thus are not compatible with the anionic nature of arsenic that exists
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

124 in the soil media as oxyanion (Van Herreweghe 2003). For that, Wenzel et al. (2001)
125 proposed a five-step sequential extraction procedure to fractionate As in soils, based
126 on the Zeien and Brümmer (1991) and the Chang and Jackson (1957) extraction
127 schemes.

128 Considering the fact that metal(loid)s in natural soil systems tend to transform
129 into more stable chemical forms over time becoming less soluble (Dousis et al. 2013),
130 this study aims a) to determine the effects of EDTA, Sodium Dithionite, OMW and
131 their combinations, on As, Pb, and Zn availability in a mine affected top soil from
132 Greece over time b) to investigate the redistribution of the studied elements in the soil
133 fractions as a result of the applied reducing and chelating agents by using two
134 sequential extraction protocols and c) to examine the role of Fe / Mn oxyhydroxides
135 on the solubility and partitioning of the studied elements.

137 **2 Materials and methods**

139 **2.1 Experimental Design and Procedure**

141 A two-factor (treatment x time) experiment in four replicates was carried out
142 on a heavily polluted soil, to test the effect of four amendments and incubation time
143 on As, Pb and Zn availability. The amendments used for the experiment were
144 Deionized water, Na₂-EDTA 0.1 M (referred as EDTA in the text), Sodium dithionite
145 0.1 M, and fresh Olive mill wastewater (OMW) diluted in deionized water at a 40%
146 v/v percentage. From these amendments eight treatments were produced: i) Deionized
147 water (DW) ii) EDTA (E) iii) Sodium dithionite (SD) iv) Olive mill wastewater
148 (OMW) v) E + SD vi) E + OMW vii) SD + OMW viii) E + SD + OMW. All

149 treatments were applied on 1 g of soil placed in 50-mL falcon bottles and in a volume
150 equal to the 80% of the soil water-holding capacity. The treated soil samples were
151 incubated at 20°C in a dark growth chamber for 1 day (1d), 3 days (3d), 7 days (7d),
152 15 days (15d), 30 days (30d h), 60 days (60d), and 90 days (90d), maintaining the
153 initial moisture constant. The experiment was run in duplicate and consisted by Batch
154 I for As and Batch II for Pb and Zn. At the end of each incubation period easily
155 mobilizable As and exchangeable Pb / Zn were extracted by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05 mol L⁻¹
156 and by Acetic acid 0.11 mol L⁻¹ from the treated soil samples of Batch I and Batch II
157 respectively. These two reagents are used in the first step of the Wenzel and BCR
158 methods respectively, and are considered to extract the most available forms of the
159 studied elements. Aiming to determine the treatment effect on the As, Pb and Zn
160 partitioning into the tested soil at the end of the 90 days incubation period, the Wenzel
161 (Wenzel et al. 2001) and the BCR (Rauret et al. 1999) sequential extraction protocols
162 (SEPs) were applied to Batch I for As and Batch II for Pb and Zn. Both SEPs were
163 also applied to the control soil (untreated). The experimental conditions of SEPs were
164 summarized in Table 1. Finally, to investigate the role of Fe / Mn oxyhydroxides on
165 As, Pb and Zn mobility, Fe and Mn concentrations were also determined in the acetic
166 acid extracts at the end of each incubation period and in all BCR extracts. The
167 experimental design is presented in Table 2.

168

169 2.2 Soil sampling and Soil Properties

170

171 The soil sample used in this study was collected from a mine affected area in
172 the outskirts of Lavrion, central Greece (X: 503825.35, Y: 4175571.92 / EGSA87).
173 Intensive mining activities and metallurgical processes that lasted for centuries in the

174 wider area of Lavrion, resulted to the enrichment of the surrounding soils with
175 metal(loid)s at levels raising severe environmental concerns that must be addressed
176 for the wealth of the local ecosystem and human health of the residents (Kalyvas et al.
177 2018b).

178 Top soil samples (0-15 cm) were collected from a 2 m² surface area and
179 thoroughly mixed to produce a composite sample. The soil sample was transferred to
180 the laboratory air-dried, crushed, and passed through a 2 mm mesh for further
181 analyses. For the two SEPs a portion of the soil sample was further grounded to pass
182 through a 0.5 mm mesh. Particles size was determined by the Bouyoucos hydrometer
183 method (Bouyoucos 1951), pH was measured in a 1:1 (w/v) soil / water slurry,
184 equivalent calcium carbonate (eq. CaCO₃) was estimated using the Bernard calcimeter
185 method (NF ISO 10693 1995), organic matter (OM) content was determined by the
186 Walkley–Black wet oxidation method (Nelson and Sommers 1982), and the cation
187 exchange capacity (CEC) was determined following the sodium acetate method
188 (Rhoades 1982). Since aqua regia digestion does not completely destroy silicates
189 (Gasparatos and Haidouti 2001), the digestion of the soil samples with aqua regia
190 provided the ‘pseudo-total’ metal concentrations, that in this study are referred as
191 ‘total’. Soil physicochemical characteristics are presented in Table 3.

192

193 2.3 Analytical determinations

194

195 Elements concentrations were determined by atomic absorption
196 spectrophotometry, using a Varian - spectra A300 system. For the determination of As
197 at low concentrations, the hydride generator Varian model VGA 77 was used as
198 previously described by Kalyvas et al. (2018a). A control sample was analyzed for

199 every 10 samples and the reproducibility was tested by reanalyzing 30% of the
200 samples. The analytical precision, estimated as the relative standard deviation of three
201 measurements, was less than 3% and 5% for AAS and HGAAS determinations. ERM-
202 CC141 European Reference Material (loam soil) was used to check the accuracy of
203 aqua regia procedure followed for the total elements extraction. The results showed
204 that mean As, Pb, Zn, Fe, and Mn recovery was 98, 95, 104, 102, and 98%,
205 respectively.

207 2.4 Statistical analysis

209 The effects of time and treatment on As, Pb, Zn, Fe and Mn availability as
210 well as the effect of treatment on elements partitioning were evaluated by analysis of
211 variance (ANOVA) followed by Tukey's honestly significant difference tests. The
212 statistical analysis was carried out by using STATISTICA (StatSoft, Inc., USA, 1984-
213 2011, Version 10) and IBM SPSS Statistics 20 software.

215 **3 Results**

217 3.1 Main effects

219 As presented in Table 4, incubation time and treatment significantly affected
220 As, Pb, and Zn available concentrations. A significant interaction between the two
221 factors was also observed for all the studied elements, and thus the main effects of
222 time and treatment upon As, Pb and Zn availability were discussed separately.

224 3.2 Effects of time and treatment on elements availability

225

226 Independently from incubation time, the treatment effect on the availability of
227 the studied elements was almost identical for Pb and Zn, while a slightly different
228 pattern was observed for As (Fig. 1a, c, e). The highest availability of As, up to 41 mg
229 kg⁻¹ on average, was observed for the EDTA treatment followed by E+OMW (mean
230 value 32 mg kg⁻¹) and E+SD+OMW (mean value 27 mg kg⁻¹). Treatments OMW,
231 E+SD, and SD+OMW resulted to the release of similar amounts of As up to 14-16 mg
232 kg⁻¹, while SD and DW exhibited the lowest available As concentrations (mean value
233 6 and 8 mg kg⁻¹, respectively). The significantly higher Pb and Zn available
234 concentrations obtained by the EDTA and E+OMW treatments (mean values up to
235 2532 mg kg⁻¹ and 1427 mg kg⁻¹ for Pb and Zn respectively) followed by the E+SD
236 (mean value 2259 and 1333 mg kg⁻¹ for Pb and Zn, respectively) and E+SD+OMW
237 (mean value 2388 and 1340 mg kg⁻¹ for Pb and Zn, respectively) treatments that
238 showed a similar impact on both metals. The other treatments resulted in much lower
239 Pb and Zn availability and showed similar strength to release Pb and Zn from the
240 tested soil.

241 Incubation time on As, Pb, and Zn availability had its highest effect at 7d, 3d,
242 and 90d, respectively (Fig. 1b, d, f). Three different patterns can be observed for the
243 studied elements. Arsenic available concentration increased from 1d to 7d and then
244 decreased to the initial levels at 30d, remaining approximately constant thereafter. It
245 seems that after 7 days of incubation, As started to gradually re-adsorb onto the soil
246 solid phases, indicating that As released by the applied treatments transcends to more
247 stable forms in relatively short period of time. The effect of incubation time on Pb
248 availability followed a different pattern. The observed highest Pb availability at 3d

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

249 was accompanied by a sharp decline at 7d, at a level significantly lower than that of
250 1d. This lowest Pb availability remained up to the 15d, increased again at 30d
251 reaching the initial concentration of 1d and then remained almost constant until 90d
252 without any significant variation. No significant alteration observed on Zn mobility
253 until 7d. Afterwards, this hysteresis was gradually withdrawn and available Zn
254 increased until 90d.

255 To better visualize the effects of treatment and time on As, Pb, and Zn
256 availability, three diagrams were produced showing the variation of W1 / B1 fraction
257 of the studied elements for each treatment and incubation interval (Fig. 2). It is
258 apparent that for all the incubation times, E, E+OMW, E+SD+OMW, and E+SD
259 treatments resulted to distinctly increased Pb and Zn solubility than the treatments
260 without EDTA (i.e. DW, SD, OMW, and SD+OMW) (Fig. 2b, c). This is more
261 pronounced for Pb, since for the treatments with EDTA available Pb concentrations
262 ranged between 2100 and 2772 mg kg⁻¹, markedly higher than for the non EDTA
263 treatments that ranged between 207 and 419 mg kg⁻¹. For As, the treatments with
264 EDTA were generally demonstrated higher extraction ability, significant only for E,
265 E+OMW and E+SD+OMW after 7 and 15 days of incubation (Fig. 2a).

266 267 3.3 Effect of treatment on elements partitioning

268
269 To investigate the effect of treatment on the distribution of As, Pb, and Zn in
270 the different soil phases, two sequential extraction procedures (SEPs) were applied to
271 the soil samples after the 90 days incubation period. The Wenzel SEP specifically
272 designed for As (Wenzel et al. 2001) and the well-established BCR SEP for cations

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

273 (Rauret et al. 1999). For each treatment the results are presented as the percentage of
274 each fraction to total (sum of all the fractions) (Fig. 3).

275 In the control and the treated soils, incubated for 90 days, As mean percentage
276 into the various soil fractions was in the order $W3>W4>WRF>W2>W1$ (Fig. 3a).
277 Compared to the control, As W1 fraction was significantly increased after 90 days of
278 incubation in all treatments containing EDTA, from 0.6% for control to 2.1, 2.5, 1.5,
279 and 1.6% for E, E+OMW, E+SD, and E+SD+OMW, respectively. EDTA and EDTA
280 combined with OMW (E and E+OMW treatments) showed the significantly higher
281 increase of As W1 fraction while no significant effect of DW, SD, and OMW
282 treatments was noticed.

283 Except the oxidisable fraction B3, the treatment effect on Pb and Zn
284 partitioning in the different soil fractions was similar (Fig. 3b, c). Treatments
285 containing EDTA significantly increased Pb and Zn percentages in exchangeable /
286 acid soluble fraction (B1) and that was accompanied by a significant decrease of the
287 metals percentages in the reducible fraction (B2). A different pattern was observed for
288 the oxidisable fraction (B3) of the two metals. For Pb, all treatments contained EDTA
289 resulted to small but significant decrease of the metal percentages associated with the
290 oxidisable fraction. Thus, the Pb released from B3 fraction may have contributed to
291 the increased concentrations of this metal in B1 fraction. Unlike Pb, treatments E and
292 OMW resulted to a significant increase of Zn oxidisable fraction i.e. from 19.8% in
293 the control sample to 21.8 and 22.9%, respectively.

294

295 **4 Discussion**

296

297 4.1 Effects of time and treatment on elements availability

298

299 Soil treatments with EDTA resulted to the highest available concentrations of
300 all the studied elements (Fig. 1a, c, e). Because of its strong complexing properties,
301 EDTA acts as a strong competitor to the soil reactive surfaces and thus is capable to
302 extract metal(loid)s from the different soil chemical fractions such as exchangeable,
303 carbonates, amorphous Fe - Mn oxides and organic matter (Manouchehri and
304 Bermond 2009). Many authors have demonstrated EDTA's effectiveness to mobilize
305 As, Pb, and Zn in metal polluted soils. Meers et al. (2005), studied Zn mobilization in
306 a metal-contaminated dredged sediment that amended with EDTA, and found that Zn
307 mobility was significantly increased. Similarly, increased As availability in an
308 industrially As-polluted soil after the addition of several EDTA concentrations was
309 observed by Abbas and Abdelhafez (2013). Mühlbachová (2011), found that addition
310 of EDTA in long-term contaminated arable and grassland soils led to increased
311 NH_4NO_3 -extractable amounts of Pb up to 600 and 122 times, respectively.

312 Sodium dithionite was used to produce strong reducing conditions that could
313 lead to the dissolution of Fe-oxides and to the subsequent release of the associated As,
314 Pb and Zn. Compared with deionized water however, dithionite did not have any
315 significant effect on the availability of the studied elements (Fig. 1a, c, e). This poor
316 As, Pb and Zn solubility during the experimental period, may be due to the partial
317 dissolution of Fe-oxides and the re-formation of new reactive phases that sequestered
318 the initially released studied elements. As it is supported by Kim et al. (2015), the
319 reductive dissolution of Fe^{3+} - oxides by reacting with high dithionite concentrations
320 can lead to the production of new Fe^{2+} -oxide forms that provide new reactive surfaces
321 for metal(loid)s retention, and thus the released metal(loid)s are becoming immobile
322 again. The same authors suggested the combined use of dithionite with oxalate that

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

323 complexes strongly with Fe to inhibit the formation of new oxides. The concentration
324 of 0.1M dithionite used in this study was probably high enough to trigger the
325 dissolution of Fe-oxides that in the absence of any substance that inhibits the
326 formation of new oxides have led to the re-immobilization of As, Pb, and Zn.
327 Furthermore, the observed lower Pb availability in 7d and 15d than in 1d may have
328 occurred due to the re-adsorption of Pb onto newly formed soil reactive phases.

329 In relation to deionized water and sodium dithionite, olive mill wastewater
330 resulted to significant higher available concentrations only for As (Fig. 1a). The
331 addition of fresh OMW in soils can promote metals solubility by two main
332 mechanisms: i) the reductive dissolution of metal-oxides as a result of the organic
333 matter mineralization from the microorganisms that consume free oxygen and the
334 oxidation of phenolic compounds and ii) the formation of organometallic complexes
335 of the soluble organic substances and phenols that inhibit metals sorption into the soil
336 solid phases (Madrid and Díaz-Barrientos 1998; de la Fuente et al. 2011). Following
337 this, increased availability should be expected for the three studied elements and not
338 only for As, as it was observed. It seems that OMW did not effectively dissolve
339 metal-oxides of the studied soil and did not promote the formation of organometallic
340 complexes subsequently. Nevertheless, this may be true for Pb and Zn but cannot
341 explain the increased As solubility with the OMW treatment. Unlike Pb and Zn,
342 arsenic exists in soils as oxyanion and therefore it competes with phosphates for
343 sorption sites (Violante and Pigna 2002). Considering that OMWs contain significant
344 amounts of phosphorous (160-310 mg kg⁻¹ on average, Pardo et al. 2017), it is highly
345 possible that the phosphates (PO₄³⁻) added in the soil via OMW replaced arsenates
346 (AsO₄³⁻) in the sorption sites of the soil colloids and thus As concentration in the soil
347 solution increased. Regarding the impact of OMW on metals mobility, research

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

348 findings are contradictory. De la Fuente et al. (2011), conducted a pot experiment
349 using a calcareous agricultural soil with increased concentrations of Pb and Zn, and
350 found that the addition of the water-soluble fraction of fresh solid olive husk had no
351 significant result on Pb / Zn solubility. Contrariwise, Romero et al. (2005), report that
352 the addition of OMW in a soil from mine tailings resulted to increased levels of
353 soluble Pb / Zn after 18 weeks.

354 As indicated in Fig. 1 (a, c, e), E+SD treatment resulted to significantly lower
355 As, Pb, and Zn available concentrations than EDTA, indicating that SD restricted the
356 chelating ability of EDTA. This is in line with the results obtained by Kim et al.
357 (2016) that showed lower extraction ability of EDTA for As in the presence of sodium
358 dithionite at concentrations > 0.05 M and in alkaline pH. Under strong reducing soil
359 conditions, as those of the present study, production of elemental and other reduced
360 chemical forms of sulfur may occur due to the self-decompose of dithionite that can
361 favor the re-precipitation of As with sulfide phases (Varadachari et al. 2006).
362 Contrary to E+SD treatment, the combination SD+OMW resulted to slightly higher
363 available concentrations of Pb and Zn than SD and OMW and of As than SD,
364 suggesting a synergistic effect between the two amendments. In this case, OMW
365 contributed positively to the SD reductive effect by offering soluble phenols and low
366 molecule organic substances with high chelating ability that complex Fe released by
367 the Fe-oxides dissolution, thus preventing the formation of new reactive phases and
368 the re-immobilization of As, Pb, and Zn. Finally, the combination of EDTA and
369 OMW (E+OMW) considerably reduced As available concentration when compared to
370 the single EDTA treatment. Considering that olive mill wastewater contains
371 significant amounts of soluble Ca^{+2} (200–640 mg L⁻¹ on average, Pardo et al. 2017)
372 and that $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was used in the first step of Wenzel sequential extraction protocol

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

373 to obtain the easily mobilizable As, it is highly possible that some of the SO_4^{2-} co-
374 precipitated with the Ca^{+2} as insoluble gypsum and led to suppressed extraction of
375 arsenates from the reactive soil solid surfaces.

376

377 4.2 Effect of treatment on elements partitioning

378

379 Compared to the control, As mean percentage in W2 fraction (readily
380 mobilizable, inner-sphere complexes) was significantly increased only with the
381 E+OMW treatment (from 9.9% in the control sample to 12.5%) indicating that OMW
382 enhanced EDTA's capability to extract As from the less labile W2 fraction. As
383 discussed earlier, E+OMW treatment also significantly increased As in W1 fraction
384 (Fig. 3a). The observed higher presence of As in W1 and W2 fractions after 90 days
385 of incubation was accompanied by a significant reduction of As concentration in W3
386 fraction. Indeed, for fraction W3 that corresponds to the extraction of As chemical
387 forms from amorphous oxides of Fe, Mn, and Al, the As percentages decreased
388 significantly from 50.5 % in the control sample to 44.1%, respectively. Most of As
389 released in this fraction under the effect of EDTA and OMW was found in the W1
390 and W2 fractions, pointing to a redistribution of As in soil fractions associated with
391 more labile forms of As. An almost identical distribution pattern of As between the
392 W1, W2 and W3 was observed for the EDTA treatment. Distribution of As in
393 fractions W4 and WRF showed minor differences between the treatments, indicating
394 that all amendments used neither effectively dissolved the crystallized oxides of Fe,
395 Mn, and Al, nor solubilized the residual soil phases. Sequential extraction results
396 clearly show that the increased concentrations of As in W1 and W2 fractions were
397 obtained because EDTA extracted As from the amorphous metal oxides and this was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

398 further enhanced by the presence of OMW. This is in line with Borggaard (1982),
399 who report that EDTA demonstrated selectivity in extracting As from artificial
400 mixtures of synthetic amorphous iron oxides and natural or synthetic crystalline iron
401 oxides.

402 Though the two sequential extraction protocols use different fractionation
403 schemes, a like As but much clearer distribution pattern among the chemically
404 defined soil fractions was observed for Pb and Zn. High amounts of Pb was found in
405 the B2 fraction (bound to Fe/Mn oxides) of the control soil. The addition of EDTA
406 and of amendments containing EDTA (E+SD, E+OMW, E+SD+OMW), exhibited
407 strong mobilizing effect on Pb and Zn in the soil. In the case of Pb, the B2 fraction
408 decreased and B1 fraction increased markedly, almost 40%. For Zn, the B1 fraction
409 also increased with EDTA treatments and the change trend of Zn exchangeable
410 fraction was opposite to that of the bound to Fe/Mn oxides, which is consistent with
411 Pb fractions distribution. These results clearly indicate that EDTA is a very efficient
412 agent in releasing heavy metals, particularly Pb from soils (Neugschwandtner et al.
413 2008). The decreased concentrations in the Fe/Mn oxide bound fraction of Pb and Zn
414 due to EDTA promoted dissolution of Fe oxides, contributed to a significant increase
415 of these metals concentrations in the mobile fraction (B1). However, in BCR
416 sequential extraction procedure, no step is included to differentiate between
417 amorphous and crystalline metal oxides. According to Rodriguez et al. (2003) and
418 more recently Kalyvas et al. (2018a), hydroxylamine hydrochloride - the reagent of
419 BCR second step - cannot effectively breakdown the well-crystallized phases and
420 mainly dissolves the amorphous Fe and Mn oxides. Hence, EDTA single or combined
421 with OMW increased the available concentrations of all studied elements that were
422 mainly originated from the amorphous Fe oxides. In a metal - contaminated

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

423 calcareous soil from a former Pb-Zn area in Spain, Clemente and Bernal (2006) found
424 that addition of humic acids isolated from a compost mixture (olive leaves and the
425 solid fraction of OMWs), increased Zn concentrations in the EDTA extractable
426 fraction confirming metal mobilization after a 28 weeks period of incubation.

427

428 4.3 The role of Fe / Mn oxides on As, Pb, and Zn mobility

429

430 Partitioning results clearly showed that the increased concentrations of As, Pb,
431 and Zn in the more mobile fractions (i.e. in W1 for As and B1 for Pb and Zn), were
432 mainly derived from the reducible soil chemical phases. Therefore, it was assumed
433 that is the product of EDTA (mainly) and of the other amendments to complex with
434 metal(loid)s bound to Fe / Mn oxides. To further elucidate the role of metal oxides on
435 As, Pb, and Zn mobility under the experimental conditions of this study, the results of
436 correlation and principal component analysis (PCA) analyses were evaluated.
437 Correlation analysis was performed to test for any relations between As, Pb, Zn, Fe,
438 and Mn mobile fraction concentrations (W1 or B1 depending on the element) for all
439 treatments and incubation intervals. Input data for the PCA were W1 / B1
440 concentrations of As, Pb, and Zn and B1, B2, B3 and BRF concentrations of Fe and
441 Mn after 90 days incubation.

442 According to the correlation coefficient matrix presented in Table 5, fractions
443 W1 / B1 of As, Pb, and Zn were strongly correlated with the B1 fraction of Fe
444 indicating a common source of all elements in the labile fraction that most probably
445 was originated from the partial dissolution of Fe oxides. Manganese concentration in
446 B1 fraction was significantly correlated with the corresponding Pb and Zn
447 concentrations and not with that of As. This however was rather an expected result,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

448 considering that As mainly adsorbs on Fe and Al oxides and not on Mn oxides
449 (Wenzel et al. 2001). PCA analysis showed that two main factors explained 70% of
450 the total variability. As it is presented in Fig. 4, AsW1, PbB1, ZnB1, and FeB1
451 fractions formed a group that is negatively associated with the reducible B2 fraction
452 of Fe, providing strong evidence that Fe-oxides were the main pool for the increased
453 available amounts of As, Pb, and Zn at the end of the incubation period. The other
454 significant negative association found, was between B1 and B2 fractions of Mn
455 pointing to that Mn oxides dissolution increased Mn availability but did not seriously
456 affect the availability of As, Pb, and Zn.

457

458 **5 Conclusions**

459

460 An incubation experiment was conducted using a mine affected soil in order to
461 investigate the effect of Na₂-EDTA, Sodium dithionite, Olive mill wastewater and
462 their combinations on the mobility of As, Pb, and Zn, over time. EDTA and its
463 combinations increased elements mobility while dithionite and olive mill wastewater
464 demonstrated poor results. Moreover, sodium dithionite when combined with EDTA
465 inhibited the chelating strength of EDTA. Olive mill wastewater, as both chelating
466 and reductive agent, increased As solubility. Combined with the other amendments
467 however, olive mill wastewater produced contradictory results in terms of As, Pb, and
468 Zn mobility, and functioned either by reinforcing or by suppressing the extracting
469 ability of dithionite and EDTA. The evaluation of the sequential extractions results
470 indicated that EDTA efficiently released As, Pb, and Zn from amorphous Fe and Mn
471 oxides mainly. Additionally, PCA results clearly demonstrated that As, Pb, and Zn

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

472 increased available concentrations in fractions W1 and B1 of the Wenzel and the BCR
473 SEPs respectively, were mainly originated from the partial dissolution of Fe oxides.

474

475 **References**

476

477 Abbas MHH, Abdelhafez Ahmed AA (2013) Role of EDTA in arsenic mobilization

478 and its uptake by maize grown on an As-polluted soil. *Chemosphere* 90:588–

479 594

480 Abumaizar RJ, Smith EH (1999) Heavy metal contaminants removal by soil washing.

481 *J Hazard Mater* B70:71-86

482 Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals—Concepts and

483 applications. *Chemosphere* 91:869–881

484 Azbar N, Bayram A, Filibeli A, Muezzinoglu A, Sengul, F, Ozer A (2004) A review

485 of waste management options in olive oil production. *Crit Rev Environ Sci*

486 *Technol* 34:209–247

487 Bolan N, Kunhikrishnan A, Thangarajan R, Kumpiene J, Park J, Makino T, Kirkham

488 MB, Scheckel K (2014) Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils –

489 To mobilize or to immobilize?. *J Hazard Mater* 266:141– 166

490 Borggaard OK (1982) Selective Extraction of Amorphous Iron Oxides by EDTA from

491 Selected Silicates and Mixtures of Amorphous and Crystalline Iron Oxides.

492 *Clay Miner* 17:365-368

493 Bouyoucos GH (1951) A recalibration of the hydrometer method for making

494 mechanical analysis of soils. *Agron J* 43:434–438

495 Chang SC, Jackson ML (1957) Fractionation of soil phosphorus. *Soil Sci* 84:133–144

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 496 Chen YH, Mao Y, He SB, Guo P, Xu K (2007) Heat stress increases the efficiency of
497 EDTA in phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* 67:1511-1517
- 498 Chuan MC, Shu GY, Liu JC (1996) Solubility of heavy metals in a contaminated soil:
499 effects of redox potential and pH. *Water Air Soil Pollut* 90:543-556
- 500 Clemente R, Bernal MP (2006) Fractionation of heavy metals and distribution of
501 organic carbon in two contaminated soils amended with humic acids.
502 *Chemosphere* 64:1264–1273
- 503 de la Fuente C, Clemente R, Martínez-Alcalá I, Tortosa G, Bernal MP (2011) Impact
504 of fresh and composted solid olive husk and their water-soluble fractions on soil
505 heavy metal fractionation, microbial biomass and plant uptake. *J Hazard Mater*
506 186:1283–1289
- 507 Dousis P, Anastopoulos I, Gasparatos D, Ehaliotis C, Massas I (2013) Effects of Time
508 and Glucose-C on the Fractionation of Zn and Cu in a Slightly Acidic Soil
509 *Commun Soil Sci Plant Anal* 44:722–732
- 510 Drahota P, Grösslová Z, Kindlová H (2014) Selectivity assessment of an arsenic
511 sequential extraction procedure for evaluating mobility in mine wastes. *Anal*
512 *Chim Acta* 839:34–43
- 513 FAOSTAT (2013) Food and Agriculture Organization database. Available from:
514 <http://faostat.fao.org>.
- 515 Garbisu C, Alkorta I (2001) Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology
516 for the removal of metals from the environment. *Bioresour Technol* 77:229-236
- 517 Gasparatos D (2012) Fe-Mn concretions and nodules to sequester heavy metals in
518 soils. In: Lichtfouse E, Schwarzbauer J, Robert D. (eds). *Environmental*
519 *chemistry for a sustainable world, Vol 2: remediation of air and water pollution*.
520 Springer Science + Business Media BV, Netherlands, pp 443–474

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 521 Gasparatos D (2013) Sequestration of heavy metals from soil with Fe- Mn
522 concretions and nodules. *Environ Chem Lett* 11:1–9
- 523 Gasparatos D, Haidouti C (2001) A comparison of wet oxidation methods for
524 determination of total phosphorus in soils. *J Plant Nutr Soil Sci* 164:435–439
- 525 Gasparatos D, Mavromati G, Kotsovilis P, Massas I (2015) Fractionation of heavy
526 metals and evaluation of the environmental risk for the alkaline soils of the
527 Thriassio plain: a residential, agricultural and industrial area in Greece. *Environ*
528 *Earth Sci* 74(2):1099–1108
- 529 Ghestem JP, Bermond A (1998) EDTA extractability of trace metals in polluted soils:
530 A chemical–physical study. *J Environ Technol* 19:409-416
- 531 Jelusic M, Lestan D (2014) Effect of EDTA washing of metal polluted garden soils.
532 Part I: Toxicity hazards and impact on soil properties. *Sci Total Environ*
533 475:132–141
- 534 Kalyvas G, Gasparatos D, Massas I (2018a) A critical assessment on arsenic
535 partitioning in mine-affected soils by using two sequential extraction protocols.
536 *Arch Agron Soil Sci*. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1443443>
- 537 Kalyvas G, Gasparatos D, Papassiopi N, Massas I (2018b) Topsoil pollution as
538 ecological footprint of historical mining activities in Greece. *Land Degrad Dev*
539 1–11. <https://doi.org/10.1002/ldr.2963>
- 540 Kim EJ, Baek K (2015) Enhanced reductive extraction of arsenic from contaminated
541 soils by a combination of dithionite and oxalate. *J Hazard Mater* 284:19-26
- 542 Kim EJ, Jeon EK, Baek K (2016) Role of reducing agent in extraction of arsenic and
543 heavy metals from soils by use of EDTA. *Chemosphere* 152:274-283
- 544 Madrid L, Diaz-Barrientos E (1994) Retention of heavy metals by soils in the
545 presence of a residue from olive-oil industry. *European J Soil Sci* 45:71–77

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 546 Manouchehri N, Bermond A (2009) EDTA in Soil Science: A Review of its
547 Application in Soil Trace Metal Studies. *Terr Aquat Environ Toxicol* 3(1):1-15
548 Massas I, Gasparatos D, Ioannou D, Kalivas D (2018) Signs for secondary buildup of
549 heavy metals in soils at the periphery of Athens international airport, Greece.
550 *Environ Sci Pollut Res* 25(1):658-671
551 Meers E, Ruttens A, Hopgood MJ, Samson D, Tack FMG (2005) Comparison of
552 EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of
553 heavy metals. *Chemosphere* 58:1011–1022
554 Mehra OP, Jackson ML (2013). Iron oxide removal from soils and clays by a
555 dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Proceedings of the*
556 *Seventh National Conference on Clays and Clay Minerals*, pp 317–327
557 Morillo JA, Antizar-Ladislao B, Monteoliva-Sánchez M, Ramos-Cormenzana A,
558 Russell NJ (2009) Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes.
559 *Appl Microbiol Biotechnol* 82:25–39
560 Mühlbachová G (2011) Soil microbial activities and heavy metal mobility in long-
561 term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. *Ecol Eng* 37:1064–
562 1071
563 Nelson DW, Sommers LE (1982) Total carbon, organic carbon and organic matter. In:
564 Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds) *Methods of soil analysis. Part 2:*
565 *chemical and microbiological properties*. ASA, SSSA, Madison, WI, USA
566 Neugschwandtner RW, Tlustos P, Komárek M, Száková J (2008) Phytoextraction of
567 Pb and Cd from a contaminated agricultural soil using different EDTA
568 application regimes: laboratory versus field scale measures of efficiency.
569 *Geoderma* 144:446–454

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

570 NF ISO 10693 (1995) Détermination de la teneur en carbonate – Méthode
571 volumétrique. Qualité des sols AFNOR, pp 177–186

572 Nowack B (2002) Environmental chemistry of aminopolycarboxylate chelating
573 agents. Environ Sci Technol 36:4049-4016

574 Padmavathiamma PK, Li LY (2007) Phytoremediation Technology: Hyper-
575 accumulation Metals in Plants. Water Air Soil Pollut 184:105–126

576 Pardo T, Bernal P, Clemente R (2017) The use of olive mill waste to promote
577 phytoremediation. Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable
578 Management, pp 183-204

579 Paul CJ, Khan FA, Puls RW (2003) Chapter 16 – In Situ Reduction of Chromium-
580 Contaminated Groundwater, Soils, and Sediments by Sodium Dithionite.
581 Applications to Radionuclides, Trace Metals, and Nutrients, pp 465–493

582 Quevauviller Ph (2002) Methodologies in Soil and Sediment Fractionation Studies.
583 Single and Sequential Extraction Procedures. R. S. C. 1-2:1-27

584 Rauret G, López-Sánchez JF, Sahuquillo A, Rubio R, Davidson C, Ure A,
585 Quevauviller Ph (1999) Improvement of the BCR three step sequential
586 extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference
587 materials. J Environ Monit 1:57–61

588 Rhoades JD (1982) Cation Exchange Capacity. In A.L. Page et al. (ed.) Methods of
589 soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties, 2nd edn, Agron
590 Monogr 9. ASA and SSSA, Madison, WI, pp 149-157

591 Rodriguez RR, Basta NT, Casteel SW, Armstrong FP, Ward DC (2003) Chemical
592 extraction methods to assess bioavailable arsenic in soil and solid media. J
593 Environ Qual 32:876–884

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 594 Romero E, Benítez E, Nogales R (2005) Suitability of Wastes from Olive-Oil
595 Industry for Initial Reclamation of a Pb/Zn Mine Tailing. *Water Air Soil Pollut*
596 165(1-4):153-165
- 597 Sarwar N, Imran M, Shaheen MR, Ishaque W, Kamran MA, Matloob A, Rehim A,
598 Hussain S (2017) Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy
599 metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere* 171:710-721
- 600 Udovic M, Lestan D (2012) EDTA and HCl leaching of calcareous and acidic soils
601 polluted with potentially toxic metals: Remediation efficiency and soil impact.
602 *Chemosphere* 88:718–724
- 603 Van Herreweghe S, Swennen R, Vandecasteele C, Cappuyns V (2003) Solid phase
604 speciation of arsenic by sequential extraction in standard reference materials
605 and industrially contaminated soil samples. *Environ Pollut* 122:323–342
- 606 Varadachari C, Goswami G, Chosh K (2006) Dissolution of iron oxides. *Clay Res*
607 25:1-19
- 608 Violante A, Pigna M (2002) Competitive sorption of arsenate and phosphate on
609 different clay minerals and soils. *Soil Sci Soc Am J* 66(6):1788–1796
- 610 Wenzel W, Kirchbaumer N, Prohaska T, Stingeder G, Lombi E, Adriano D (2001)
611 Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction
612 procedure. *Anal Chim Acta* 436(2):309–323
- 613 Yao Z, Li J, Xie H, Yu C (2012) Review on remediation technologies of soil
614 contaminated by heavy metals. *Procedia Environ Sci* 16:22–729
- 615 Zeien H, Brümmer G (1991) Ermittlung der Mobilität und Bindungsformen von
616 Schwermetallen in Böden mittels Sequentieller Extraktionen [Determination of
617 the mobility and the binding forms of heavy metals in soils using sequential
618 extractions]. *Mitt Dtsch Bodenk Ges* 66(I):439–442

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

619 Zimmerman AJ, Weindorf DC (2010) Heavy Metal and Trace Metal Analysis in Soil
620 by Sequential Extraction: A Review of Procedures. Int J Anal Chem Art ID:
621 387803
622

TABLES

Table 1 The BCR and Wenzel sequential extraction schemes

| Step | Fraction | Extractant | Extraction Conditions | Extractant volume for 1g of soil |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|
| BCR ^a | | | | |
| B1 | Exchangeable / acid soluble | Acetic acid 0.11 mol l ⁻¹ | 16h shaking at 22±5°C | 40ml |
| B2 | Bound to Fe/Mn oxides (reducible) | Hydroxylammonium chloride 0.5 mol l ⁻¹ | 16h shaking at 22±5°C | 40ml |
| B3 | Bound to organic matter (oxidisable) | Hydrogen peroxide 8.8 mol l ⁻¹ | 1h digestion at 85±2°C | 10+10ml |
| | | Ammonium acetate 1.0 mol l ⁻¹ , pH=2±0.1 | 16h shaking at 22±5°C | 50ml |
| BRF ^b | Residual | Aqua regia (HCl/HNO ₃) | 16h digestion | 25ml |
| WENZEL ^c | | | | |
| W1 | Non-specifically sorbed (easily mobilizable, outer-sphere complexes) | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 mol L ⁻¹ | 4h shaking at 20°C | 25ml |
| W2 | Specifically sorbed (readily mobilizable, inner-sphere complexes) | NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.05 mol L ⁻¹ | 16h shaking at 20°C | 25ml |
| W3 | Amorphous and poorly crystalline hydrous oxides of Fe and Al | NH ₄ ⁺ - oxalate buffer 0.2 mol L ⁻¹ , pH=3.25 | 4h shaking in the dark at 20°C | 25ml |
| W4 | Well-crystallized hydrous oxides of Fe and Al | NH ₄ ⁺ -oxalate buffer 0.2 mol L ⁻¹ + ascorbic acid 0.1 mol L ⁻¹ , pH=3.25 | 30min shaking in the light at 96°C | 25ml |
| WRF | Residual | Aqua regia (HCl/HNO ₃) ^d | 16h digestion ^d | 25ml |

^a Rauret et al. (1999)

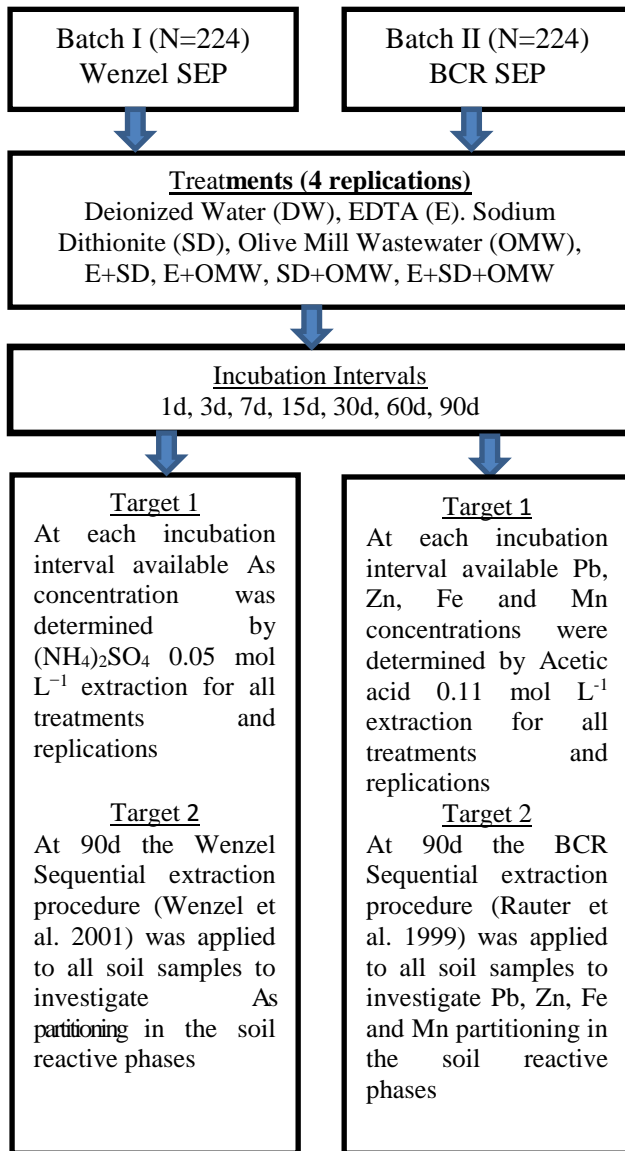
^b not included in the BCR specifications

^c Wenzel et al. (2001)

^d modification of the original method

633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668

Table 2 Experimental design



669 **Table 3** Soil physicochemical properties

670

| Clay g kg ⁻¹ | Silt g kg ⁻¹ | Sand g kg ⁻¹ | pH (1:1) | eq. CaCO ₃ g kg ⁻¹ | OM g kg ⁻¹ | CEC cmol _c kg ⁻¹ | Total* As mg kg ⁻¹ | Total* Pb mg kg ⁻¹ | Total* Zn mg kg ⁻¹ |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 219 | 274 | 507 | 7,64 | 74 | 47 | 19 | 727 | 5925 | 5575 |

671 *single digestion with Aqua regia

672

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

673 **Table 4** ANOVA results. Treatment and time effects on As, Pb and Zn mobility

674

| | SS ^a | DF ^b | MS ^c | F ^d | P ^e |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| As | | | | | |
| Time | 203E2 | 6 | 3376. | 109.7 | 0.000 |
| Treatment | 306E2 | 7 | 4374. | 142.2 | 0.000 |
| Time*Treatment | 228E2 | 42 | 542. | 17.6 | 0.000 |
| Pb | | | | | |
| Time | 961E3 | 6 | 160E3 | 42.0 | 0.000 |
| Treatment | 251E6 | 7 | 358E5 | 9314.0 | 0.000 |
| Time*Treatment | 811E3 | 42 | 193E2 | 5.0 | 0.000 |
| Zn | | | | | |
| Time | 618E3 | 6 | 103E3 | 16.6 | 0.000 |
| Treatment | 750E4 | 7 | 107E4 | 172.9 | 0.000 |
| Time*Treatment | 491E3 | 42 | 117E2 | 1.9 | 0.003 |

675 ^a sum of squares

676 ^b degrees of freedom

677 ^c means square

678 ^d F-statistic

679 ^e P-value

680

681 **Table 5** Correlation coefficient matrix of As, Pb, Zn, Fe, and Mn available fractions
 682 (W1 / B1) for all treatments and incubation times

683

| | AsW1 | PbB1 | ZnB1 | FeB1 | MnB1 |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|
| AsW1 | 1.000 | 0.473 | 0.407*** | 0.320*** | 0.047 |
| PbB1 | 0.473*** | 1.000 | 0.873*** | 0.858*** | 0.339*** |
| ZnB1 | 0.407*** | 0.873*** | 1.000 | 0.792*** | 0.319*** |
| FeB1 | 0.320*** | 0.858*** | 0.792*** | 1.000 | 0.611*** |
| MnB1 | 0.047 | 0.339*** | 0.319*** | 0.611*** | 1.000 |

684 ***P <0.001

685

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure Captions

686
1 687
2 688
3 689
4 690
5 691
6 692
7 693
8 694
9 695
10 696
11 697
12 698
13 699
14 700
15 701
16 702
17 703
18 704
19 705
20 706
21 707
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 1 Time and treatment effects on the available concentrations of As (a, b), Pb (c, d), and Zn (e, f). Comparisons were performed by Tukey's HSD test ($\alpha \leq 0.05$). The presence of common letter implies no significant difference

Fig. 2 Treatment effect on the available concentrations of As (a), Pb (b), and Zn (c) for all incubation intervals (mean plots with standard error bars). The error bars represent the least significant difference at the 95% confidence level

Fig. 3 Treatment effect on the percentage of As (a) in non-specifically sorbed (W1), specifically sorbed (W2), amorphous and poorly crystalline hydrous oxides of Fe and Al (W3), well-crystallized hydrous oxides of Fe and Al (W4), and residual fractions (WRF) and on the percentages of Pb (b) and Zn (c) in exchangeable / acid soluble (B1), reducible (B2), oxidizable (B3), and residual fractions (BRF). Comparisons between treatments for every fraction were performed by the Tukey's HSD test ($\alpha \leq 0.05$). The presence of common letter implies no significant difference

Fig. 4 Principal component analysis results for As, Pb, and Zn available fractions (W1 / B1) and exchangeable / bound to carbonates (B1), reducible (B2), oxidizable (B3), and residual (BRF) fractions of Fe and Mn

Figure 1

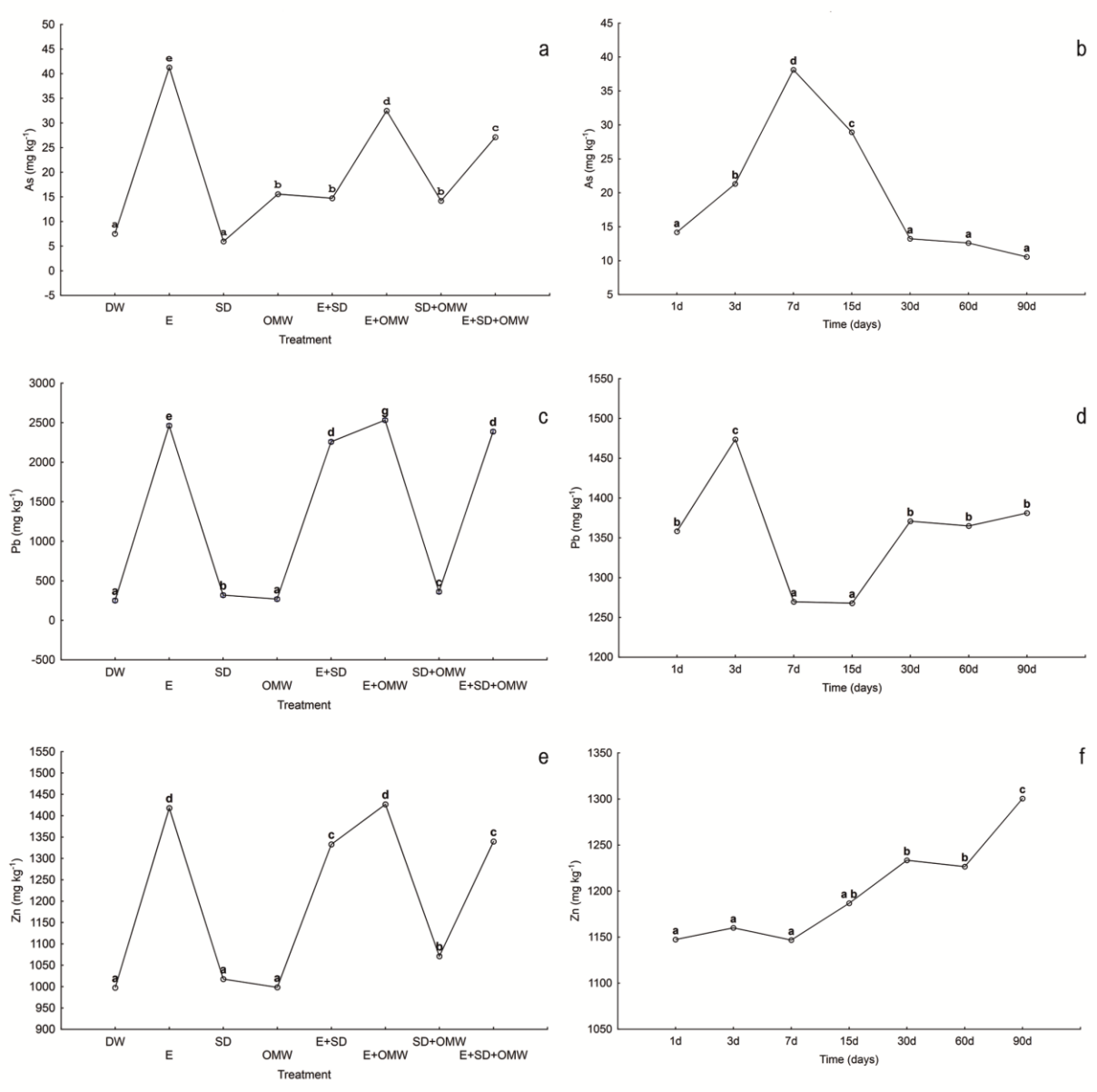


Figure 2

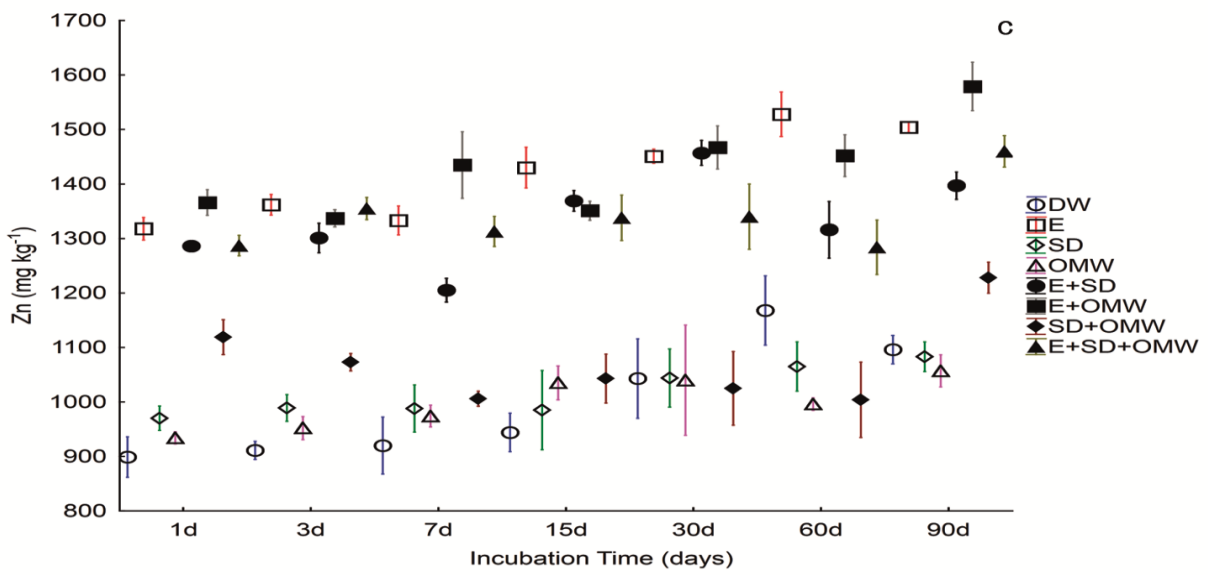
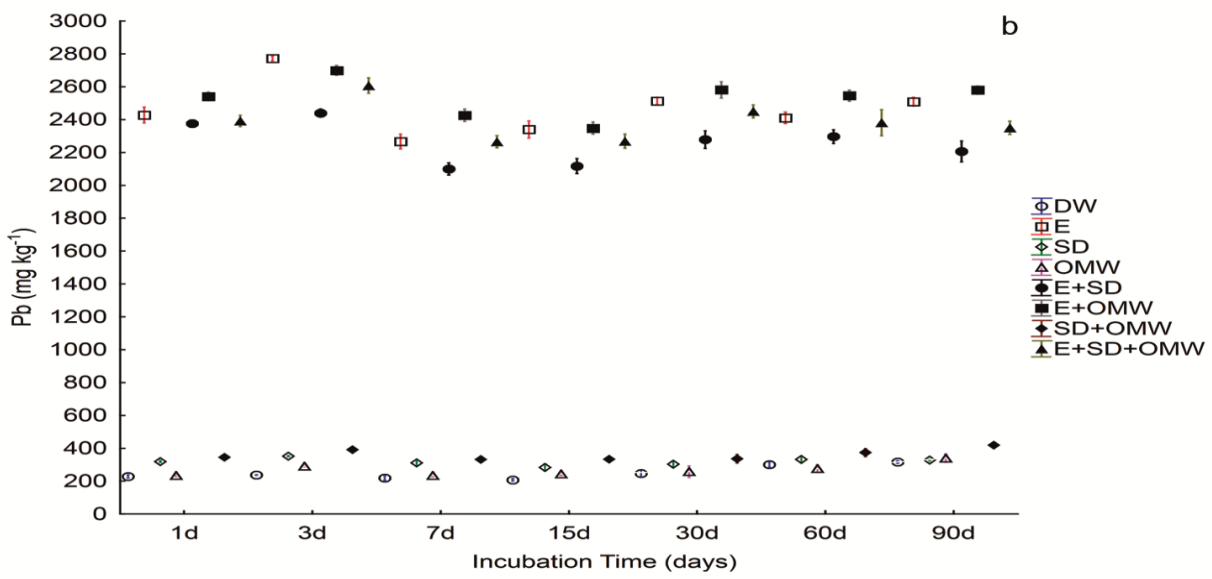
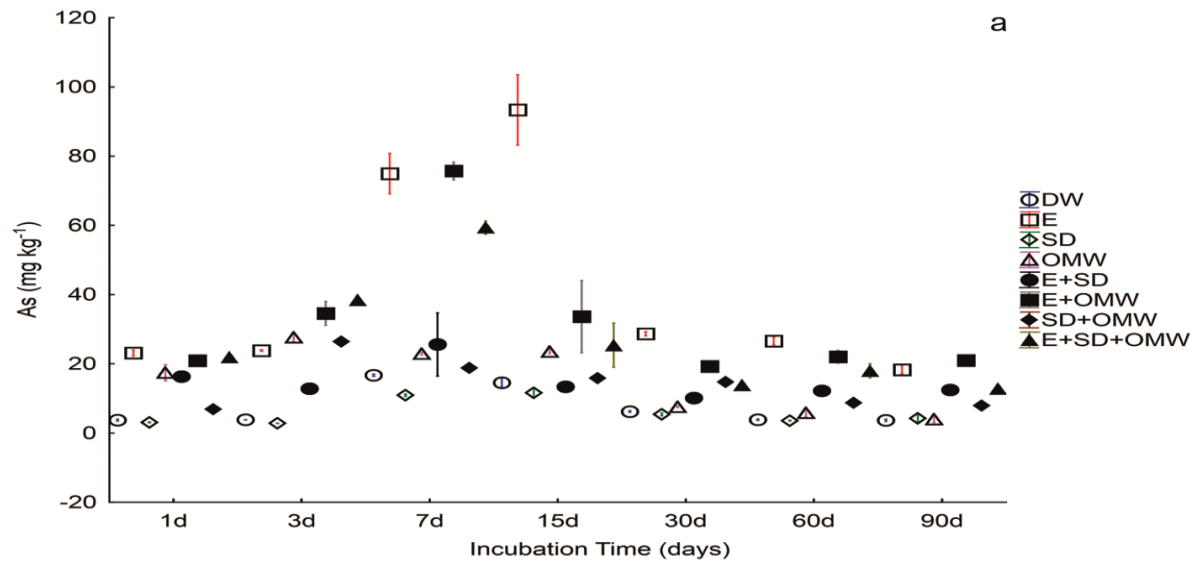


Figure 3

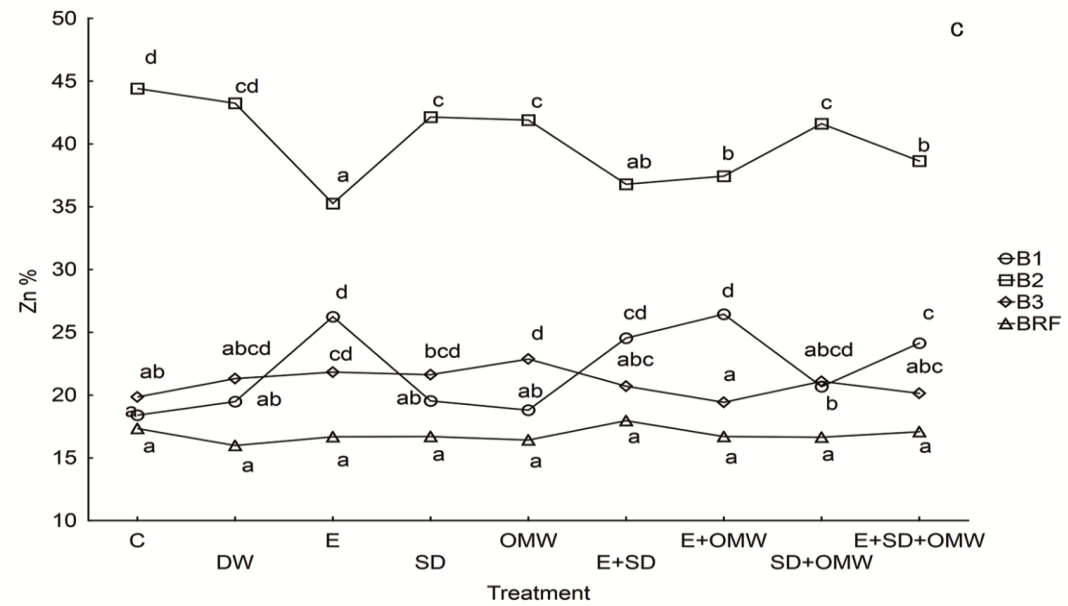
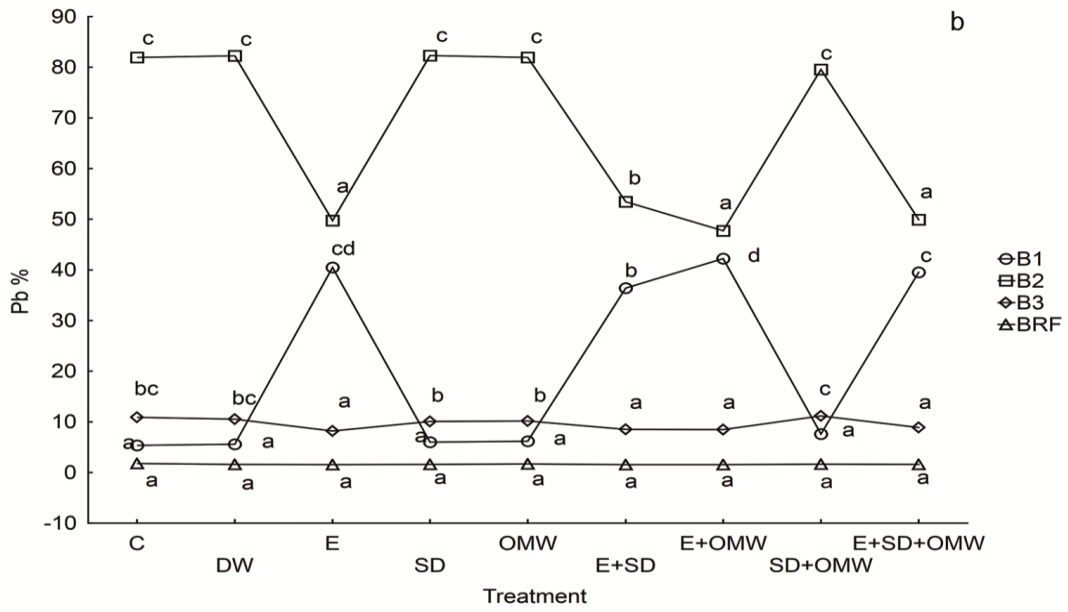
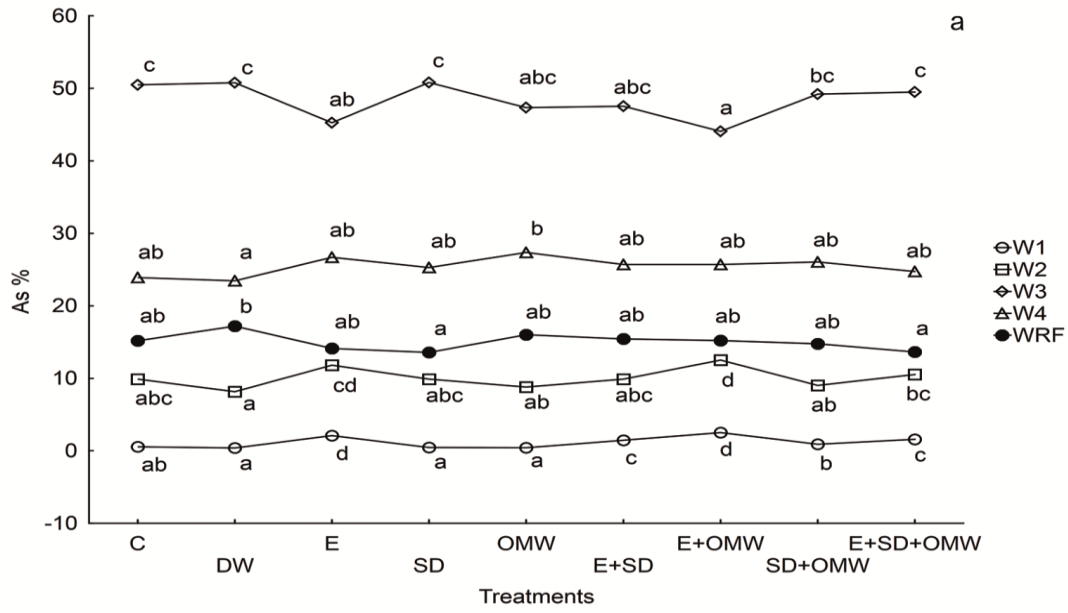
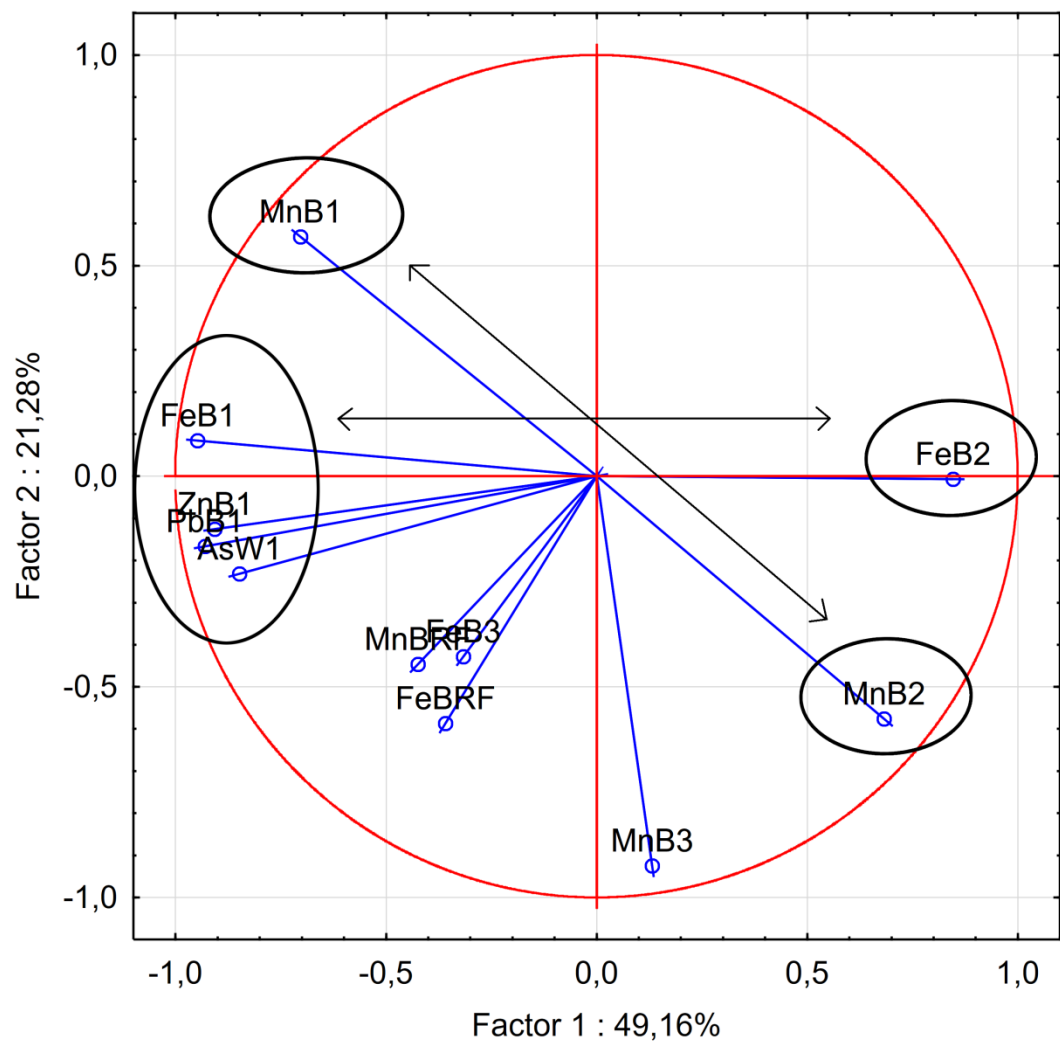


Figure 4



Article

Efficacy of EDTA and Olive Mill Wastewater to Enhance As, Pb, and Zn Phytoextraction by *Pteris vittata* L. from a Soil Heavily Polluted by Mining Activities

Georgios Kalyvas ¹, Gerasimos Tsitselis ¹, Dionisios Gasparatos ²  and Ioannis Massas ^{1,*}

¹ Soil Science Laboratory, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece; gekalyvas@aua.gr (G.K.); gerasimoststs@gmail.com (G.T.)

² Soil Science Laboratory, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece; gasparatos@agro.auth.gr

* Correspondence: massas@aua.gr; Tel.: +30-210-529-4098

Received: 8 May 2018; Accepted: 5 June 2018; Published: 12 June 2018



Abstract: A pot experiment was conducted to evaluate the effect of Na₂-EDTA 0.01 M (E) and olive mill wastewater 15% (OMW) on As, Pb, and Zn uptake by *Pteris vittata* L. grown in a soil highly contaminated by mining activities. A two-factor experimental design was followed; 3 treatments (E, OMW, and E + OMW) × 2 batches (single or double dose). Six weeks after the *P. vittata* transplanting, all pots received the selected dose of each treatment (Batch I). At 8 weeks, in half of the pots, a second dose of the same treatments was added (Batch II). Plants were harvested after 10 weeks and As, Pb, and Zn concentrations were determined in fronds and roots. Depending on the element, both treatment and batch effects were significant. In Batch II, EDTA application resulted in a 55% increase of As and 9- and 4-fold of Pb and Zn concentrations in the fronds, while OMW treatment substantially reinforced plant uptake when combined with EDTA. Roots to fronds translocation of the metal(loid)s highly increased in Batch II. After harvest, composite soil samples of all treatment–batch combinations were subjected to sequential extraction, but no significant differentiations of As, Pb, and Zn partitioning in soil phases were detected.

Keywords: enhanced phytoextraction; *Pteris vittata* L.; arsenic; lead; zinc; soil fractionation

1. Introduction

Human activities, such as metalliferous mining and metallurgical processes, could pose a severe threat to the local environment. The weathering impact of air and water on the produced metal-rich tailings and rock wastes results in a continuous release of heavy metals and metalloids in the surrounding soils. When metal(loid) concentrations in soils reach or exceed the corresponding threshold limits for humans, animals, or plants, cleanup measures must be implemented [1].

Various physical, chemical, and biological techniques have been used in order to remediate metal-polluted soils [2,3]. Because of the increased cost and the danger of irreversible changes in soil properties and biodiversity, conventional remediation methods (e.g., vitrification, landfilling, soil washing, electrokinetic systems, etc.) are not applicable for the decontamination of large field sites and, therefore, phytoremediation can be considered as an alternative, green, cost-efficient, and more sustainable remediation technology [4,5].

Phytoextraction is a phytoremediation method based on the use of plants that can hyperaccumulate metals in the aboveground biomass, which then can be harvested and removed [6]. Nevertheless, soil metal remediation with the phytoextraction technique is a relatively slow process due

to the low bioavailability of the metals in the soil system, as they are mostly occurring in less soluble chemical forms and therefore unavailable for plant uptake [7,8]. To enhance phytoextraction, several chelating and reducing agents have been used as soil amendments in order to increase metal solubility in soils. EDTA is amongst the most commonly used chelating agent, as it is capable of desorbing metals from the soil constituents, forming soluble metal complexes [9]. For the same purpose, organic materials originated from agricultural activities have been applied to soils for increasing their fertility and, at the same time, increasing or decreasing metals' availability, according to the soil remediation strategy [10]. Olive mill wastewaters (OMWs) (byproduct of the olive oil processing industry) have increased organic load, an acidic nature, and contain large amounts of soluble phenols. Due to these characteristics, implementation of OMWs in soils can influence the soil redox potential and promote metal chelation [11,12]. Although a large body of literature has demonstrated the high effectiveness of EDTA on metal mobilization and uptake by plants, the effect of EDTA on soil quality is a complex issue [13]. The low biodegradability of EDTA can pose an elevated risk of adverse effects on soil microorganisms and metal leaching. Moreover, the application of OMW as a soil amendment represents a controversial discussion. Recent studies found that the disposal of untreated OMW in soil causes serious environmental problems due to the acidic pH and the high content of potentially antimicrobial compounds, such as phenols [14].

To characterize a plant as a metal hyperaccumulator, it should demonstrate certain features, such as good adaptation, easy propagation, extensive root system, high aboveground biomass production, tolerance to metal toxicities, and efficient translocation factor for the targeted metals [15,16]. Chinese brake fern *Pteris vittata* L. is a hardy, versatile, and fast-growing plant that is well known for its efficiency in hyperaccumulating arsenic [17–20]. Ma et al. [21] first conducted a greenhouse experiment and observed that *P. vittata* had the ability to accumulate As in its fronds, up to 2.3% and 0.7% dry weight, after 6 weeks of growing in an artificially and a chromated copper arsenate contaminated soil, respectively. Nevertheless, according to the contamination sources, the soil types, and land uses, As distribution in the soil fractions differs, while mine-affected sites are usually co-polluted with other heavy metals. Thus, it is very important to investigate the efficiency of *P. vittata* to tolerate or even accumulate other metals simultaneously with As.

It has been reported that the potential use of OMW as a soil amendment, had positive effects on soil properties (total organic C, total N, available P, exchangeable K, and available trace elements) [10,22], while EDTA addition was found to be efficient in increasing the availability of As and heavy metals in soils [23,24].

The objectives of the present study were to (a) investigate the ability of *P. vittata* to extract As, Pb, and Zn from a soil polluted by mining activities; (b) assess the effect of EDTA, olive mill wastewaters, and their combination on As, Pb, and Zn uptake by *P. vittata*; (c) discuss the effect of the repeated application of these soil amendments on As, Pb, and Zn uptake by *P. vittata*; and (d) evaluate the effect of EDTA and OMW on the redistribution of As, Pb, and Zn between the soil reactive phases.

2. Materials and Methods

2.1. Soil Sampling and Soil Properties

An area of 10 × 10 m at a depth of 0.15 m was excavated from a mine-affected area in the outskirts of Lavrion, Central Greece (X: 503825.35, Y: 4175571.92/EGSA87) and the bulk soil obtained was transferred to the laboratory facilities. The soil is classified as Cambisol (according to FAO) and it is characterized as loam (L) with an alkaline pH (Table 1). From 3500 BC until 1989 AD, the wider area of Lavrion was intensively mined for silver, lead, and zinc. During this period, mining and metallurgical byproducts were scattered all over the Lavreotiki peninsula, polluting the surrounding soils with toxic elements [1].

Table 1. Main soil physicochemical properties.

| Clay g kg ⁻¹ | Silt g kg ⁻¹ | Sand g kg ⁻¹ | pH (1:1) | Total CaCO ₃ g kg ⁻¹ | OM ¹ g kg ⁻¹ | CEC ² cmol _c kg ⁻¹ | Total As mg kg ⁻¹ | Total Pb mg kg ⁻¹ | Total Zn mg kg ⁻¹ |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|--------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 198 | 301 | 501 | 7.72 | 69 | 45 | 18 | 822 | 5677 | 4428 |

¹ OM (organic matter); ² CEC (cation exchange capacity).

The obtained topsoil was passed through a 1 cm sieve and homogenized for the pot filling. A portion of the bulk soil was air-dried, crushed, and grounded to pass through a 2 mm and a 0.5 mm sieve for analysis. The Bouyoucos hydrometer method [25] was followed for the determination of the particle-size distribution, pH was estimated in a 1:1 (*w/v*) soil/water slurry, total calcium carbonate (CaCO₃) was measured according to the Bernard calcimeter method [26], organic matter (OM) content was estimated by the Walkley–Black procedure [27], and the sodium acetate method [28] was followed to determine the cation exchange capacity (CEC). Soil samples were digested with aqua regia and analyzed for total metal concentrations. Due to the incomplete destruction of silicates, aqua regia digestion provides the “pseudo-total” metal concentrations [29], termed for simplicity as “total” in this study. The soil physicochemical properties are summarized in Table 1.

2.2. Greenhouse Experiment

Ten-month old ferns with approximately 30 cm fronds in length were transplanted to 2 L plastic pots (1 fern per pot) filled with 2 kg of soil polluted by mining activities and transferred to a greenhouse. A total of 56 pots were placed in random order and the ferns were watered once or twice a week in order to keep soil moisture at ~60% of the water-holding capacity. After 3 weeks of cultivation, fertilization with 0.4 g N/kg as (NH₄)₂SO₄ was applied to enhance plant growth. Six weeks after transplant, additions of the treatments were performed. Each treatment was replicated eight times, including pots treated only with deionized water (DW) as control. The treatments applied were: (i) Na₂-EDTA 0.01 M (or 2.5 mmol kg⁻¹ of soil, referred in the text as EDTA) (ii) OMWs 15% (diluted in deionized water) with the following characteristics: total organic carbon (TOC): 26 ± 2.4 g L⁻¹, total N: 0.9 ± 0.1 g L⁻¹, P: 0.21 ± 0.02 g L⁻¹, K: 6.1 ± 0.2 g L⁻¹, total phenolics: 8.8 ± 0.3 mg mL⁻¹, chemical oxygen demand (COD): 48 ± 2.1 g L⁻¹, total suspended solids (TSSs): 42 ± 3.2 g L⁻¹ [30], and (iii) a combination of EDTA 0.01 M and OMWs 15%. All amendments were added in a volume equal to the ~60% (500 mL) of the soil water-holding capacity. After 8 weeks from transplant, the treated ferns were divided into two batches. Batch I contained ferns that no other treatments were performed on until harvest, and Batch II contained ferns to which a second dose of the exact same treatments was applied. After 10 weeks of cultivation, all ferns were harvested and four of the eight replicates were completely destroyed to obtain the roots. Three soil subsamples from the pots of each treatment and batch were used for the sequential extraction of the studied elements. During the experimental period, air temperature and relative humidity in the greenhouse ranged between 20 and 35 °C and 70% and 90%, respectively. The experimental design is presented in Figure 1.

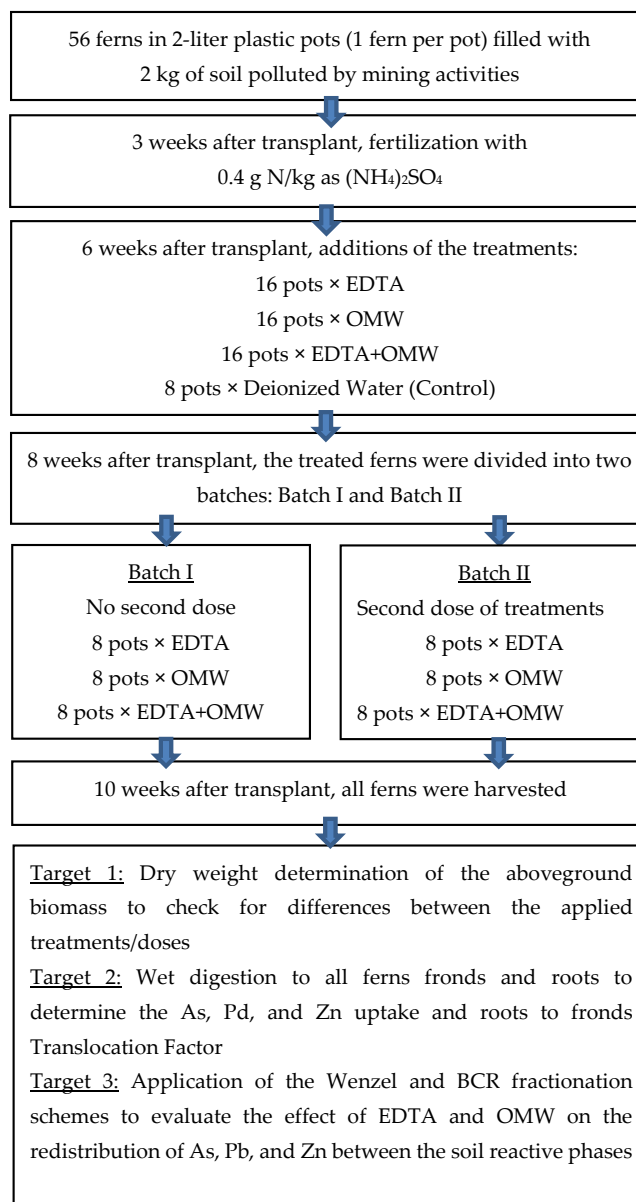


Figure 1. Experimental design.

2.3. Plant Analysis

Total metal(loid)s' concentrations in fronds and roots were determined following a wet digestion procedure that utilizes concentrated nitric acid (HNO_3) and 30% hydrogen peroxide (H_2O_2). Plant fronds and roots were thoroughly washed with deionized water to discard any impurities and oven dried at 60 °C for 2 days. Then, all samples were weighed and grounded using a mixer mill in order to produce a fine powder with a particle size less than 0.2 mm. In 0.5 g of pulverized tissue, 5 mL of 65% HNO_3 was added in conical flasks covered with watch glasses and left overnight. Plant samples were then digested over a heat plate for 1 h at 125 °C and, after cooling the samples, were mixed with 2 mL of 30% H_2O_2 and re-digested at 80 °C repeatedly until the digests became colorless. The digests were then filtered and diluted to a volume of 25 mL for analysis [31]. The translocation factor (TF) was calculated as the ratio of metal(loid) concentration in the fronds to those in the roots [32].

2.4. Sequential Extraction Procedures

To investigate the distribution of the studied elements into the different soil chemical phases, two sequential extraction procedures were performed. The well-established three-step sequential extraction procedure proposed by BCR (Community Bureau of Reference) [33] was used for the partitioning of Pb and Zn, and a specifically designed scheme was used for As forms, recommended by Wenzel et al. [34]. The operationally defined chemical fractions and working conditions for both partitioning schemes are analytically presented in Table 2.

Table 2. The BCR (Community Bureau of Reference) and Wenzel partitioning schemes after Kalyvas et al. [35].

| Step | Fraction | Extractant | Extraction Conditions | Extractant Volume (mL) for 1 g of Soil |
|---------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| BCR ^a | | | | |
| B1 | Exchangeable/acid soluble | Acetic acid 0.11 mol L ⁻¹ | 16 h shaking at 22 ± 5 °C | 40 |
| B2 | Bound to Fe/Mn oxides (reducible) | Hydroxylammonium chloride 0.5 mol L ⁻¹ pH = 1.5 | 16 h shaking at 22 ± 5 °C | 40 |
| B3 | Bound to organic matter (oxidizable) | Hydrogen peroxide 8.8 mol L ⁻¹ Ammonium acetate 1.0 mol L ⁻¹ , Ph = 2 ± 0.1 | 1 h digestion at 85 ± 2 °C 16 h shaking at 22 ± 5 °C | 10 + 10 50 |
| BRF ^b | Residual | Aqua regia (HCl/HNO ₃) | 16 h digestion | 25 |
| WENZEL ^c | | | | |
| W1 | Non-specifically sorbed | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 mol L ⁻¹ | 4 h shaking at 20 °C | 25 |
| W2 | Specifically sorbed | NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.05 mol L ⁻¹ | 16 h shaking at 20 °C | 25 |
| W3 | Amorphous and poorly crystalline hydrous oxides of Fe and Al | NH ₄ ⁺ -oxalate buffer 0.2 mol L ⁻¹ , pH = 3.25 | 4 h shaking in the dark at 20 °C | 25 |
| W4 | Well-crystallized hydrous oxides of Fe and Al | NH ₄ ⁺ -oxalate buffer 0.2 mol L ⁻¹ + ascorbic acid 0.1 mol L ⁻¹ , pH = 3.25 | 30 min shaking in the light at 96 °C | 25 |
| WRF | Residual | Aqua regia (HCl/HNO ₃) ^d | 16 h digestion ^d | 25 |

^a Rauret et al. [33]; ^b not included in the BCR specifications; ^c Wenzel et al. [34]; ^d modification of the original method.

2.5. Analytical Determinations

Arsenic, Pb, and Zn concentrations were determined by flame atomic absorption spectrophotometry (F-AAS) using a Varian SpectrAA-300 system. For the determination of As at low concentrations, the spectrophotometer was equipped with a hydride generator Varian model VGA 77 (HG-AAS), with working conditions previously reported by Kalyvas et al. [35]. A control sample was analyzed for every 10 samples and reproducibility was tested by reanalyzing 30% of the samples. The analytical precision, estimated as relative standard deviation, was less than 5%. To verify the accuracy of aqua regia procedure that followed for total element determination, ERM-CC141 European Reference Material (loam soil) was used. The results showed that mean As, Pb, and Zn recovery was 98, 95, and 104%, respectively. At all stages of the sample preparation and analysis, stringent precautions were taken to minimize contamination through air, glassware, and reagents. All reagents used in this study were of analytical grade and supplied from Merck Millipore (Darmstadt, Germany).

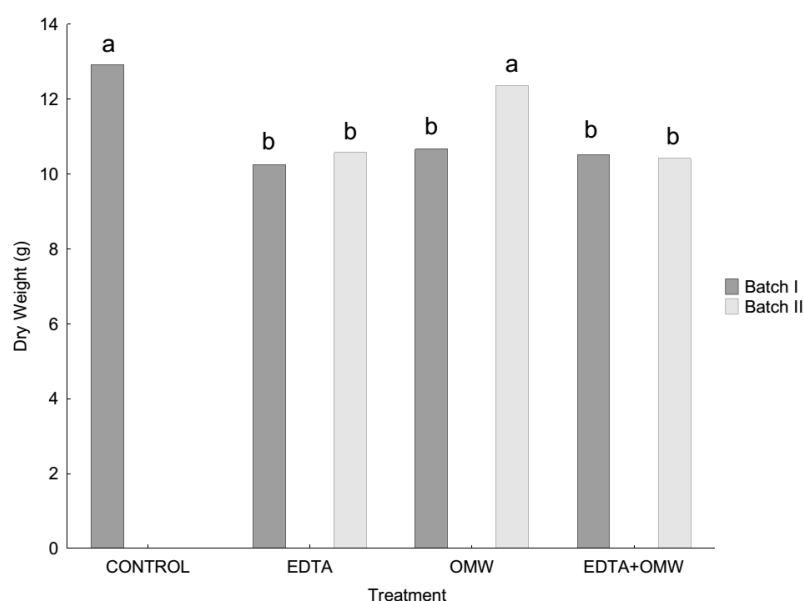
2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out by using STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 1984–2011, version 10) and IBM SPSS Statistics 20 software (IBM, Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Plant Growth

As indicated by the ANOVA results, treatment effect on *P. vittata* growth was significant, while batch effect was not. No interaction between the two factors was observed (Figure 2). Compared to control, both EDTA and OMW addition significantly reduced plant growth, leading to up to 20% lower aboveground biomass production in the case of EDTA first addition (Figure 2). However, no visual toxicity or nutrient deficiency symptoms were observed. The second addition of OMW alleviated this phenomenon, suggesting reduced plant stress. It is well known that OMW addition in soils may result in anaerobic soil conditions and toxicity stress to plants and the soil microcosms due to its high phenolic content [36]. On the other hand, OMWs contain substantial nutrient concentrations that can promote plant growth. It seems that adverse effects appeared after the first addition of OMW, while, afterward, nutrient load of OMW assisted the healthier growth of the plants and balanced the initially negative impact of OMW. Moreover, the observed increased biomass production with the second OMW application suggests a rapid adaptation of both soil microbial communities and plants to the adverse OMW effect on the soil ecosystem [37]. EDTA alone or combined with OMW disturbed the rhizosphere soil environment and stressed plants, possibly due to the release of high amounts of toxic elements, for example, Pb. *Pteris vittata* is a well-known As hyperaccumulator plant that can tolerate high As soil concentrations, but it is probably less tolerant in the case of abrupt increase of available concentrations of other toxic elements in the soil solution [38]. Additionally, EDTA may have influenced several plant physiological functions responsible for nutrient uptake and thus immobilization–mobilization nutrient balance that could have led to the lower *P. vittata* growth [39].

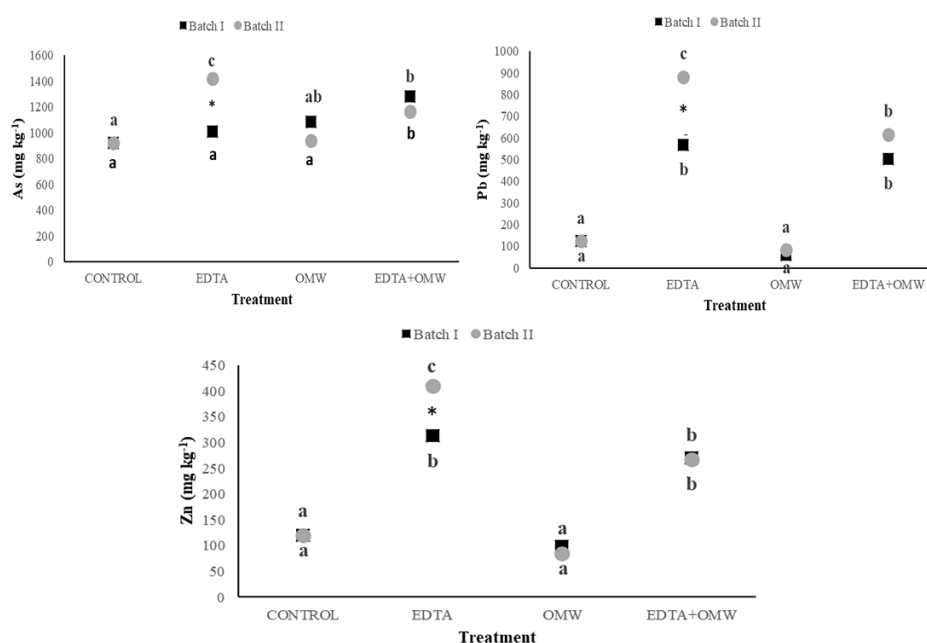


| ANOVA RESULTS | | | | | |
|-------------------|-------|----|-------|-------|----------|
| Effect | SS | DF | MS | F | <i>p</i> |
| Treatment | 66.35 | 3 | 22.12 | 11.96 | 0.000 * |
| Batch | 3.72 | 1 | 3.72 | 2.01 | 0.162 |
| Treatment × Batch | 8.31 | 3 | 2.77 | 1.5 | 0.225 |

Figure 2. Aboveground biomass (dry weight) of *P. vittata*. Data shown are the mean values of eight replicates. Comparisons were performed by Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$) and are demonstrated with lowercase letters. The presence of a common letter implies no significant difference. ANOVA results presenting the treatment and batch effects on dry weight of *P. vittata* are also included (*, $p < 0.05$).

3.2. Elements Concentrations and Translocation in *P. vittata*

The effects of treatment and batch on metal(loid) concentrations in the aboveground biomass of *P. vittata* are presented in Figure 3 and the accompanying ANOVA results table. While for all elements the treatment effect was significant, batch effect was significant only for Pb plant uptake. Since, for all elements, interaction between the two factors was observed, post hoc comparisons between treatments are valid within each batch, and differences for the same treatment between the two batches were evaluated by *t*-test. Regarding As, in Batch I, only the combined application of EDTA and OMW exhibited a significant As concentration increase compared to control, while in Batch II, both EDTA and EDTA + OMW applications promoted As uptake by *P. vittata*. Moreover, the second application of EDTA significantly increased As concentration in plant fronds compared to the first EDTA application.



| ANOVA RESULTS | | | | | |
|--------------------------|-------------------|----|-------------------|-------|----------|
| Effect | SS | DF | MS | F | <i>p</i> |
| As | | | | | |
| Treatment | 108×10^4 | 3 | 359×10^3 | 10.71 | 0.000 * |
| Batch | 231×10^2 | 1 | 231×10^2 | 0.69 | 0.410 |
| Treatment \times Batch | 788×10^3 | 3 | 263×10^3 | 7.84 | 0.000 * |
| Pb | | | | | |
| Treatment | 499×10^4 | 3 | 166×10^4 | 63.80 | 0.000 * |
| Batch | 202×10^3 | 1 | 202×10^3 | 7.73 | 0.007 * |
| Treatment \times Batch | 245×10^3 | 3 | 817×10^2 | 3.13 | 0.033 * |
| Zn | | | | | |
| Treatment | 779×10^3 | 3 | 260×10^3 | 135.7 | 0.000 * |
| Batch | 6381 | 1 | 6381 | 3.3 | 0.073 |
| Treatment \times Batch | 317×10^2 | 3 | 106×10^2 | 5.5 | 0.002 * |

Figure 3. Treatment effect on As, Pb, and Zn accumulation in the fronds of *P. vittata*. Data shown are the mean values of eight replicates. Comparisons between treatments within Batch I and II were performed by Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$) and are demonstrated with lowercase letters, while the differences between the same treatments that belong to different batches were checked by *t*-test ($* p \leq 0.05$) and are presented by *. The presence of a common letter implies no significant difference. ANOVA results presenting the treatment and batch effects on As, Pb, and Zn uptake by *P. vittata* are also presented ($*, p < 0.05$).

Considering the treatment effects on Pb and Zn, it is apparent that only EDTA application similarly enhanced plant uptake of both metals. Additionally, the second application of EDTA further significantly increased Pb and Zn concentrations in *P. vittata* fronds.

Both EDTA and OMW treatments and their combination significantly affected root to fronds translocation (TF) of Pb and Zn but did not influence the TF of As. Batch effect was significant for As and Zn TFs, while no interaction between the two factors was noticed (Table 3). Compared to control, the second application of EDTA significantly increased Pb and Zn TFs (Table 4). A similar but not significant pattern was also observed for As TF. Arsenic TFs were higher than those of the other elements and several times above unity, verifying the well-known ability of *P. vittata* to behave as an As hyper-accumulating plant [40].

Table 3. ANOVA results presenting the treatment and batch effects on As, Pb, and Zn TFs (*, $p \leq 0.05$).

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|-------------------|-------|----|-------|-------|----------|
| Effect | SS | DF | MS | F | <i>p</i> |
| As | | | | | |
| Treatment | 61.1 | 3 | 20.4 | 0.662 | 0.583 |
| Batch | 138.7 | 1 | 138.7 | 4.511 | 0.044 * |
| Treatment × Batch | 70.9 | 3 | 23.6 | 0.769 | 0.523 |
| Pb | | | | | |
| Treatment | 0.110 | 3 | 0.037 | 6.705 | 0.002 * |
| Batch | 0.014 | 1 | 0.014 | 2.633 | 0.118 |
| Treatment × Batch | 0.013 | 3 | 0.004 | 0.794 | 0.509 |
| Zn | | | | | |
| Treatment | 0.296 | 3 | 0.099 | 4.234 | 0.015 * |
| Batch | 0.130 | 1 | 0.130 | 5.584 | 0.027 * |
| Treatment × Batch | 0.157 | 3 | 0.052 | 2.251 | 0.108 |

Table 4. Translocation factor values of As, Pb, and Zn in *Pteris vittata* L. among the different treatments in Batch I and II. Data shown are the mean values of four replicates. Comparisons of TFs performed by Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$) are demonstrated with lowercase letters and are valid within each element. The presence of a common letter implies no significant difference.

| | TRANSLOCATION FACTOR (TF) | | | | | | | |
|----|---------------------------|----------|--------|------------|----------|---------|---------|------------|
| | BATCH I | | | | BATCH II | | | |
| | CONTROL | EDTA | OMW | EDTA + OMW | CONTROL | EDTA | OMW | EDTA + OMW |
| As | 6.91 a | 6.30 a | 7.99 a | 5.11 a | 6.91 a | 14.45 a | 11.18 a | 10.44 a |
| Pb | 0.08 abc | 0.14 abc | 0.04 b | 0.14 abc | 0.08 abc | 0.25 c | 0.06 b | 0.18 abc |
| Zn | 0.16 a | 0.20 a | 0.12 a | 0.19 a | 0.16 a | 0.57 b | 0.16 a | 0.29 ab |

3.3. Distribution of Arsenic and Metals in Soil Fractions

Mean percentages and concentrations of As, Pb, and Zn into the different soil fractions after the plant harvest are presented in Figure 4 and the accompanying tables. The mean percentages of As, Pb, and Zn into the various soil fractions were in the order $W1 < W2 < WRF \leq W4 < W3$, $B1 < B3 < BRF < B2$, and $B3 < B1 < BRF < B2$, respectively. The metal(loid) distribution was not affected either by the first or by the second application of the treatments. The only exception was observed in treatment EDTA/Batch II, where the As residual fraction (WRF) was higher than the reducible fraction (W4). Arsenic was found to be mostly adsorbed in the amorphous and crystalline Fe oxides [35]. Addition of EDTA and OMW and their combination, single or double dose, had no significant result in increasing the most available fractions of As, i.e., non-specifically (W1) and specifically sorbed (W2). The BCR partitioning scheme demonstrated the affinity of Pb and Zn for Fe oxides, exhibiting an average percent value of 64.9% and 41.5%, respectively, in the reducible fraction (B2) [2].

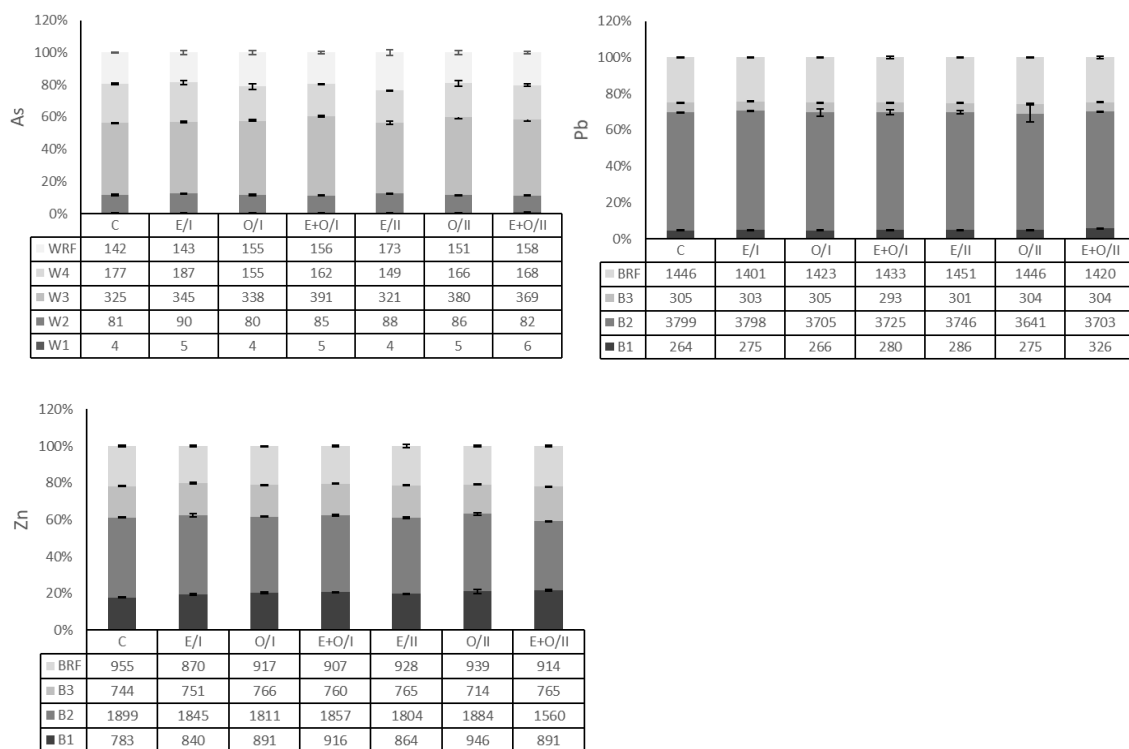


Figure 4. Mean percentages and values of As, Pb, and Zn, into the different soil fractions (numbers in tables are in mg kg^{-1}). The error bars represent the standard error of the mean at the 95% of confidence level ($p \leq 0.05$) ($n = 3$). I (Batch I), II (Batch II), C (control), O (olive mill wastewater), E (EDTA), W1 (non-specifically sorbed), W2 (specifically sorbed), W3 (amorphous hydrous oxide-bound), W4 (crystalline hydrous oxide-bound), WRF (residual fraction), B1 (exchangeable/weak acid soluble), B2 (reducible), B3 (oxidizable), BRF (residual fraction).

4. Discussion

4.1. Effect of Added Amendments on As and Metal Accumulation in *P. vittata* Fronds

Regarding As and metal uptake by *P. vittata*, three different patterns can be distinguished. Arsenic concentration in the aboveground biomass was increased by the second application of EDTA (Batch II), while the first application of OMW enhanced the extracting ability of EDTA (Batch I). Pb and Zn concentrations increased only by the EDTA application. As indicated by the effect of combined EDTA + OMW addition (Figure 3), OMW reduced the uptake of both Pb and Zn.

The observed higher As, Pb, and Zn concentrations in the fronds of *P. vittata* due to EDTA application in the heavily polluted soil used in this study can be attributed to the increased availability of these elements in the soil environment. Indeed, because of its strong complexing properties, EDTA acts as a strong competitor to the soil reactive surfaces and thus is capable to extract metal(loid)s from the different soil chemical fractions, such as exchangeable carbonates, Fe/Mn amorphous oxides, and organic matter [9]. Many authors have demonstrated EDTA's effectiveness to mobilize As, Pb, and Zn in metal-polluted soils. Meers et al. [41] studied Zn mobilization in a metal-contaminated dredged sediment that was amended with EDTA, and they found that Zn mobility was significantly increased. Similarly, increased As availability in an industrially As-polluted soil after the addition of several EDTA concentrations was observed by Abbas and Abdelhafez [42]. Mühlbachová [43] found that addition of EDTA in long-term contaminated arable and grassland soils led to increased NH_4NO_3 -extractable amounts of Pb up to 600 and 122 times, respectively.

However, while for Pb and Zn this EDTA effect is clearly demonstrated from the first dose (Batch I), for As, the second dose (Batch II) was necessary to trigger the above-explained mechanism.

It seems that the rather low dosage of 2.5 mmol EDTA kg⁻¹ of soil was not enough to liberate As bound to different soil phases (primarily from amorphous oxides and inner-sphere complexes where As was strongly retained), whereas the doubling of the EDTA dose succeeded in increasing As solubility and, correspondingly, significantly enhancing As plant uptake. Compared to Batch I, the application of a second dose of EDTA also significantly increased Pb and Zn concentrations in *P. vittata* fronds. Surprisingly, Pb and Zn concentration in *P. vittata* fronds increased up to 9 and 4 times, respectively, when compared to control, suggesting that, under EDTA application, *P. vittata* can function as a Pb hyperaccumulator for the decontamination of soils heavily polluted with As and Pb [44]. On the contrary, the relatively smaller effect of all amendments on As uptake can be directly attributed to the ability of *P. vittata* to absorb high amounts of As under common soil conditions. Though the EDTA concentration used in this study is considered as environmental and plant-safe according to Vamerali et al. [45] (<3 mmol EDTA kg⁻¹ of soil), and no leaching from the pots was observed, the possible negative effects of EDTA on soil ecosystem and on metal leaching should always be evaluated.

The addition of fresh OMW in soils can enhance plant uptake of metals by promoting metal solubility in soils due to (i) the reductive dissolution of metal oxides as a result of the organic matter mineralization from the microorganisms that consume free oxygen, and the oxidation of phenolic compounds, and (ii) the formation of organometallic complexes of the soluble organic substances and phenols that inhibit metal sorption into the soil solid phases [46,47]. Following this, increased availability and higher plant uptake should be expected for all elements. Depending on the element, OMW application produced different plant uptake patterns. In relation to control, OMW resulted in significantly higher concentrations of As, Pb, and Zn in *P. vittata* fronds only when combined with EDTA (Figure 3). Excluding As, this can be attributed to the properties of EDTA and not to those of OMW, since the EDTA + OMW treatment resulted in lower Pb and Zn concentrations in plant fronds than EDTA alone. It seems that OMW did not effectively dissolve metal oxides of the studied soil and did not promote the formation of organometallic complexes subsequently. This is in line with De la Fuente et al. [47], who conducted a pot experiment using a calcareous agricultural soil with increased concentrations of Pb and Zn, and found that the addition of the water-soluble fraction of fresh solid olive husk had no significant result on Pb/Zn solubility. Although this may be true for Pb and Zn, it cannot explain the increased As concentration in the aboveground biomass with the OMW treatment. Though this increase is not statistically significant, a clear increasing trend was apparent when OMW and OMW + EDTA applications are compared to control. Unlike Pb and Zn, As exists in soils as an oxyanion and, therefore, it competes with phosphates for sorption sites [48]. Considering that OMWs contain significant amounts of phosphorous, it is highly possible that the phosphates PO₄³⁻ added in the soil via OMW replaced arsenates AsO₄³⁻ in the sorption sites of the soil colloids and, thus, As concentration in the soil solution increased, as well as plant uptake [49].

4.2. Arsenic, Lead, and Zinc Extraction per Pot

Another way to express the results of the study is by considering the biomass production per pot in order to determine the actual amounts of As, Pb, and Zn extracted by *P. vittata*. Table 5 summarizes the corresponding mg pot⁻¹ values. Since EDTA and OMW addition reduced *P. vittata* growth (Figure 2), the use of the extracted amounts of As, Pb, and Zn may better portrait the dynamics of the tested systems and can provide reliable information to be used for the reduction of As, Pb, and Zn load in contaminated soils. According to the ANOVA results in Table 6, treatment effect is significant for all elements, batch effect is significant only for Pb, and interaction between the two factors was noticed only for As. Arsenic extracted by the second addition of EDTA almost doubled when compared to control, reinforcing the hyperaccumulating effectiveness of *P. vittata*. Considering that each pot contained 2 kg of soil and that 135.24 mg of As was extracted, a promising prospective for site decontamination is emerged by the *P. vittata*-EDTA system. Nevertheless, a similar value that was significantly higher than the control was obtained by the first application of EDTA + OMW, pointing to

synergistic action of EDTA and OMW to extract As from the soil constituents. For Pb and Zn, though EDTA dramatically increased the extracting ability of *P. vittata*, especially the second dose, the 83.43 and 39.02 mg of Pb and Zn extracted from the soil cannot be evaluated as adequate for successful site remediation when soil concentration of Zn especially is extremely high. However, these results indicate that in soils with high and particularly high As, Pb, and Zn concentrations, the *P. vittata*–EDTA system can serve for the drastic reduction of As load and for a considerable Pb decrease.

Table 5. Total extraction of As, Pb, and Zn expressed as mg pot^{−1}. Data shown are the mean values of eight replicates. For Pb and Zn, post hoc comparisons performed by Tukey’s HSD test ($p \leq 0.05$) are demonstrated with lowercase letters and are valid within each element. For As, comparisons between treatments within Batch I and II were performed by Tukey’s HSD test ($p \leq 0.05$) and are demonstrated with lowercase letters, while the differences between the same treatments that belong to different batches were checked by *t*-test ($p \leq 0.05$) and are demonstrated by capital letters. The presence of a common letter implies no significant difference.

| | mg pot ^{−1} | | | | | | | |
|----|----------------------|-----------|-------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| | BATCH I | | | | BATCH II | | | |
| | CONTROL | EDTA | OMW | EDTA + OMW | CONTROL | EDTA | OMW | EDTA + OMW |
| As | 73.29 a/A | 102.45 ab | 106.08 ab/A | 123.11 b/A | 73.29 a/A | 135.24 b/A | 76.87 a/B | 114.17 b/A |
| Pb | 9.87 a | 56.95 bc | 5.90 a | 48.73 b | 9.87 a | 83.43 c | 6.74 a | 62.17 bc |
| Zn | 9.48 a | 31.62 bc | 9.60 a | 26.11 b | 9.48 a | 39.02 c | 6.91 a | 26.65 b |

Table 6. ANOVA results, presenting the treatment and batch effects on As, Pb, and Zn mg pot^{−1} (*, $p \leq 0.05$).

| ANOVA RESULTS | | | | | | |
|-------------------|-----------------------|----|-----------------------|-------|----------|--|
| Effect | SS | DF | MS | F | <i>p</i> | |
| As | | | | | | |
| Treatment | 238 × 10 ² | 3 | 7932 | 11.89 | 0.000 * | |
| Batch | 29 | 1 | 29 | 0.04 | 0.836 | |
| Treatment × Batch | 8004 | 3 | 2668 | 4.00 | 0.012 * | |
| Pb | | | | | | |
| Treatment | 498 × 10 ² | 3 | 166 × 10 ² | 53.52 | 0.000 * | |
| Batch | 1662 | 1 | 1662 | 5.36 | 0.024 * | |
| Treatment × Batch | 1869 | 3 | 623 | 2.01 | 0.123 | |
| Zn | | | | | | |
| Treatment | 8382 | 3 | 2794 | 80.92 | 0.000 * | |
| Batch | 27 | 1 | 27 | 0.80 | 0.376 | |
| Treatment × Batch | 222 | 3 | 74 | 2.14 | 0.105 | |

4.3. Element Partitioning

The increased concentrations of As, Pb, and Zn in the fronds of *P. vittata* strongly suggest that the applied treatments increased the mobility of these elements in the soil environment. However, this was not demonstrated by the results of both Wenzel and BCR sequential extraction protocols, since no significant effect of the applied treatments on element partitioning in the reactive soil phases was observed. Single harvest of *P. vittata* fronds resulted in the extraction of small amounts of As, Pb, and Zn in relation to the total concentrations of these elements in the tested soil. Thus, it is assumed that EDTA and OMW applications resulted in little redistribution of the studied elements between the soil phases that did not allow for the detection of sensitive significant alterations in element partitioning that could be related to plant uptake of the As, Pb, and Zn.

5. Conclusions

The results of the present study clearly demonstrated that Na₂-EDTA 0.01 M application to a soil heavily polluted with As, Pb, and Zn enhanced plant uptake of these elements by *P. vittata* and significantly promoted the translocation of Pb and Zn from the roots to the above ground biomass. Compared to control, *P. vittata* extracted almost double the amount of As from the soil with the double EDTA dose, suggesting enhanced phytoextraction that may lead to relatively time-effective soil decontamination. The same amendment greatly assisted plant uptake of both Pb and Zn. According to the extracted amounts of Pb and Zn, the EDTA–*P. vittata* system can efficiently reduce the load of these elements in soils, especially that of Pb. Though the EDTA concentration used in this study is rather low (single EDTA application failed to mobilize As) and no leaching from the pots was observed, the possible negative effects of EDTA on soil ecosystem and on metal leaching should always be evaluated. Single diluted OMW application alone or combined with EDTA highly increased As extraction by *P. vittata* (106 and 123 mg pot^{−1}, respectively). Considering that Pb and Zn were not mobilized by OMW application and that high quantities of OMWs are produced in olive oil-producing countries, further detailed study is needed to assess the potential of this agroindustry byproduct to enhance As uptake by *P. vittata*, and to be used subsequently for the decontamination of As-polluted soils.

Author Contributions: Conceptualization, I.M.; Data curation, G.T. and D.G.; Formal analysis, G.K.; Investigation, G.K. and G.T.; Methodology, D.G. and I.M.; Supervision, I.M.; Writing—original draft, G.K.; Writing—review & editing, I.M. & D.G.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kalyvas, G.; Gasparatos, D.; Papassiopi, N.; Massas, I. Topsoil pollution as ecological footprint of historical mining activities in Greece. *Land Degrad. Dev.* **2018**, *1*–11. [[CrossRef](#)]
2. Gasparatos, D. Fe-Mn concretions and nodules to sequester heavy metals in soils. In *Environmental Chemistry for a Sustainable World, Vol 2: Remediation of Air and Water Pollution*; Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Robert, D., Eds.; Springer Science + Business Media B.V: Dordrecht, The Netherlands, 2012; pp. 443–474.
3. Yao, Z.; Li, J.; Xie, H.; Yu, C. Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. *Procedia Environ. Sci.* **2012**, *16*, 722–729. [[CrossRef](#)]
4. Willscher, S.; Jablonski, L.; Fona, Z.; Rahmi, R.; Wittig, J. Phytoremediation experiments with *Helianthus tuberosus* under different pH and heavy metal soil concentrations. *Hydrometallurgy* **2017**, *168*, 153–158. [[CrossRef](#)]
5. Ali, H.; Khan, E.; Sajad, M.A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* **2013**, *91*, 869–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kidd, P.; Barceló, J.; Bernal, M.P.; Navari-Izzo, F.; Poschenrieder, C.; Shilev, S.; Clemente, R.; Monterroso, C. Trace element behavior at the root–soil interface: Implications in phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.* **2009**, *67*, 243–259. [[CrossRef](#)]
7. Sheoran, V.; Sheoran, A.; Poonia, P. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2011**, *41*, 168–214. [[CrossRef](#)]
8. McGrath, S.P.; Zhao, J.; Lombi, E. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Adv. Agron.* **2002**, *75*, 1–56. [[CrossRef](#)]
9. Manouchehri, N.; Bermond, A. EDTA in Soil Science: A Review of its Application in Soil Trace Metal Studies. *Terr. Aquat. Environ. Toxicol.* **2009**, *3*, 1–15. [[CrossRef](#)]
10. Pardo, T.; Bernal, P.; Clemente, R. The use of olive mill waste to promote phytoremediation. In *Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 183–204.
11. Morillo, J.A.; Antizar-Ladislao, B.; Monteoliva-Sánchez, M.; Ramos-Cormenzana, A.; Russell, N.J. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 25–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. McBride, M. Adsorption and oxidation of phenolic compounds by iron and manganese oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1987**, *51*, 1466–1472. [[CrossRef](#)]
13. Lestan, D.; Luo, C.L.; Li, X.D. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environ. Pollut.* **2008**, *153*, 3–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mekki, A.; Dhoub, A.; Sayadi, S. Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* **2013**, *2*, 1–7. [[CrossRef](#)]
15. Mahar, A.; Wang, P.; Ali, A.; Awasthi, M.K.; Lahori, A.H.; Wang, Q.; Li, R.; Zhang, Z. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, *126*, 111–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Evangelou, M.W.H.; Ebel, M.; Schaeffer, A. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* **2007**, *68*, 989–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Zhang, Y.; Wan, X.; Lei, M. Application of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. to contaminated soil in Northern China. *J. Geochem. Explor.* **2017**, *182*, 132–137. [[CrossRef](#)]
18. Lessl, J.T.; Luo, J.; Ma, L.Q. *Pteris vittata* continuously removed arsenic from non-labile fraction in three contaminated-soils during 3.5-year of phytoextraction. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *279*, 485–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Xiao, X.; Chen, T.; An, Z.; Lei, M.; Huang, Z.; Liao, X.; Liu, Y. Potential of *Pteris vittata* L. for phytoremediation of sites co-contaminated with cadmium and arsenic: The tolerance and accumulation. *J. Environ. Sci.* **2008**, *20*, 62–67. [[CrossRef](#)]
20. Chen, T.B.; Wei, C.Y.; Huang, Z.C.; Huang, Q.F.; Lu, Q.G.; Fan, Z.L. Arsenic hyperaccumulator *Pteris Vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chin. Sci. Bull.* **2002**, *47*, 902–905. [[CrossRef](#)]
21. Ma, L.Q.; Komar, K.M.; Tu, C.; Zhang, W.; Cai, Y.; Kennelley, E.D. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* **2001**, *409*, 579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chartzoulakis, K.; Psarras, G.; Moutsopoulou, M.; Stefanoudaki, E. Application of olive mill wastewater to a Cretan olive orchard: Effects on soil properties, plant performance and the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2010**, *138*, 293–298. [[CrossRef](#)]
23. Neugschwandtner, R.W.; Tlustoš, P.; Komárek, M.; Száková, J. Phytoextraction of Pb and Cd from a contaminated agricultural soil using different EDTA application regimes: Laboratory versus field scale measures of efficiency. *Geoderma* **2008**, *144*, 446–454. [[CrossRef](#)]
24. Vaxevanidou, K.; Papassiopi, N.; Paspaliaris, I. Removal of heavy metals and arsenic from contaminated soils using bioremediation and chelant extraction techniques. *Chemosphere* **2008**, *70*, 1329–1337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bouyoucos, G.H. A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soils. *Agron. J.* **1951**, *43*, 434–438. [[CrossRef](#)]
26. NF ISO 10693. *Détermination de la Teneur en Carbonate—Méthode Volumétrique*; Qualité des sols AFNOR: Paris, France, 1995; pp. 177–186.
27. Nelson, D.W.; Sommers, L.E. Total carbon, organic carbon and organic matter. In *Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties*; Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., Eds.; ASA SSSA: Madison, WI, USA, 1982.
28. Rhoades, J.D. Cation Exchange Capacity. In *Methods of soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*, 2nd ed.; Agron. Monogr. 9; Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., Eds.; ASA and SSSA: Madison, WI, USA, 1982; pp. 149–157.
29. Gasparatos, D.; Haidouti, C. A comparison of wet oxidation methods for determination of total phosphorus in soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2001**, *164*, 435–439. [[CrossRef](#)]
30. Karpouzas, D.; Ntougias, S.; Iskidou, E.; Rousidou, C.; Papadopoulou, K.; Zervakis, G.; Ehaliotis, C. Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities. *Appl. Soil Ecol.* **2010**, *45*, 101–111. [[CrossRef](#)]
31. Jones, J.B., Jr.; Case, V.W. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. In *Soil Testing and Plant Analysis*; Westerman, R.L., Ed.; SSSA, Inc.: Madison, WI, USA, 1990; pp. 389–427.
32. Ma, J.; Lei, E.; Lei, M.; Liu, Y.; Chen, T. Remediation of Arsenic contaminated soil using malposed intercropping of *Pteris vittata* L. and maize. *Chemosphere* **2018**, *194*, 737–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Rauret, G.; López-Sánchez, J.F.; Sahuquillo, A.; Rubio, R.; Davidson, C.; Ure, A.; Quevauviller, P. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *J. Environ. Monit.* **1999**, *1*, 57–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Wenzel, W.; Kirchbaumer, N.; Prohaska, T.; Stingeder, G.; Lombi, E.; Adriano, D. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *436*, 309–323. [[CrossRef](#)]
35. Kalyvas, G.; Gasparatos, D.; Massas, I. A critical assessment of arsenic partitioning in mine-affected soils by using two sequential extraction protocols. *Arch. Agron. Soil Sci.* **2018**. [[CrossRef](#)]
36. Fiorentino, A.; Gentili, A.; Isidori, M.; Monaco, P.; Nardelli, A.; Parrella, A.; Temussi, F. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1005–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Karpouzas, D.G.; Rousidou, C.; Papadopoulou, K.K.; Bekris, F.; Zervakis, G.; Singh, B.K.; Ehaliotis, C. Effect of continuous olive mill wastewater applications, in the presence and absence of N fertilization, on the structure of rhizosphere soil fungal communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *70*, 56–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. An, Z.Z.; Huang, Z.C.; Lei, M.; Liao, X.Y.; Zheng, Y.M.; Chen, T.B. Zinc tolerance and accumulation in *Pteris vittata* L. and its potential for phytoremediation of Zn- and As-contaminated soil. *Chemosphere* **2006**, *62*, 796–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. January, M.C.; Cutright, T.J.; Van Keulen, H.; Wei, R. Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals? *Chemosphere* **2008**, *70*, 531–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Gonzaga, M.I.S.; Santos, J.A.G.; Ma, L.Q. Phytoextraction by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. from six arsenic-contaminated soils: Repeated harvests and arsenic redistribution. *Environ. Pollut.* **2008**, *154*, 212–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Meers, E.; Ruttens, A.; Hopgood, M.J.; Samson, D.; Tack, F.M.G. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* **2005**, *58*, 1011–1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Abbas, M.H.H.; Abdelhafez Ahmed, A.A. Role of EDTA in arsenic mobilization and its uptake by maize grown on an As-polluted soil. *Chemosphere* **2013**, *90*, 588–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mühlbachová, G. Soil microbial activities and heavy metal mobility in long-term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. *Ecol. Eng.* **2011**, *37*, 1064–1071. [[CrossRef](#)]
44. Wan, X.M.; Lei, M.; Chen, T.B.; Zhou, G.D.; Yang, J.; Zhou, X.Y.; Zhang, X.; Xu, R.X. Phytoremediation potential of *Pteris vittata* L. Under the combined contamination of As and Pb: Beneficial interaction between As and Pb. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21*, 325–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Vamerali, T.; Bandiera, M.; Mosca, G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. *Environ. Chem. Lett.* **2010**, *8*, 1–17. [[CrossRef](#)]
46. Madrid, L.; Diaz-Barrientos, E. Retention of heavy metals by soils in the presence of a residue from olive-oil industry. *Eur. J. Soil Sci.* **1994**, *45*, 71–77. [[CrossRef](#)]
47. De la Fuente, C.; Clemente, R.; Martínez-Alcalá, I.; Tortosa, G.; Bernal, M.P. Impact of fresh and composted solid olive husk and their water-soluble fractions on soil heavy metal fractionation, microbial biomass and plant uptake. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *186*, 1283–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Violante, A.; Pigna, M. Competitive sorption of arsenate and phosphate on different clay minerals and soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2002**, *66*, 1788–1796. [[CrossRef](#)]
49. Fayiga, A.O.; Saha, U.K. Arsenic hyperaccumulating fern: Implications for remediation of arsenic contaminated soils. *Geoderma* **2016**, *284*, 132–143. [[CrossRef](#)]

