

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Julija HMELJAK

**BENTOŠKE PRETVORBE ŽIVEGA SREBRA V OKSIČNEM-ANOKSIČNEM
PREHODU V GRADEŠKI LAGUNI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BENTHIC TRANSFORMATIONS OF MERCURY AT THE OXIC-ANOXIC
TRANSITION IN THE GRADO LAGOON**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Kemične analize so bile opravljene na Odseku za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Jadrana Faganelija, za somentorico dr. Mileno Horvat in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Mentor: prof. dr. Jadran FAGANELI
Somentorica: dr. Milena HORVAT
Recenzentka: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Jadran FAGANELI
Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran

Članica: dr. Milena HORVAT
Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Julija Hmeljak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	504.04:574.5:546.49(043)=863
KG	ekologija/živo srebro/metilacija Hg/Jadransko morje/sedimenti/bentoške pretvorbe/Gradeška laguna
AV	HMELJAK, Julija
SA	FAGANELI, Jadran (mentor)/HORVAT, Milena (somentorica)/MANDIĆ MULEC, Ines (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	BENTOŠKE PRETVORBE ŽIVEGA SREBRA V OKSIČNEM-ANOKSIČNEM PREHODU V GRADEŠKI LAGUNI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 80 str., 3 pregl., 24 sl., 66 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Živo srebro (Hg) je zelo strupena težka kovina, njegovo kroženje v naravi je globalno. Toksični učinki na organizme so odvisni od koncentracije in oblike zaužitega Hg. Najbolj strupena oblika je metil živo srebro (MeHg), ki se kopiči v prehranjevalnih spletih. V Idriji je 500 let deloval drugi največji rudnik Hg na svetu. Zaradi posledic rudarjenja so močno onesnaženi Idrijska, Soča in Tržaški zaliv. V vplivno območje idrijskega rudnika sodi tudi Gradeška laguna, ki je za marikulturo zelo pomembno področje. Poznavanje pretvorb Hg v sedimentu lagune je pomembno za preprečevanje kontaminacij školjk in rib. Pripravili smo laboratorijski simulacijski poskus v temi z vzorcem sedimenta in morske vode iz lagune. V peiodično odvzetih vzorcih vode nad sedimentom smo izmerili vsebnost Hg_{tot} in MeHg in nekaterih drugih (za študij pretvorb Hg relevantnih) kemijskih zvrsti. Ugotovili smo, da na hitrost regeneracije Hg_{tot} na meji sediment-voda ne vpliva prehod iz oksičnih v anoksične pogoje, medtem ko redoks potencial močno vpliva na tok MeHg, ki je v anoksičnem približno 10-krat večji in zajema praktično celoten Hg_{tot} tok. Povečani bentoški tok MeHg je posledica povečane metilacije in redukcije (raztapljanja) Fe^{3+} v anoksičnem okolju, medtem ko je mobilnost Hg_{tot} posledica nastanka sulfidov in organskih kompleksov. Večina v oksičnih razmerah nastalega MeHg ostaja vezanega v trdni fazi sedimenta, v anoksičnih pa se ga skoraj 3/4 sprošča v vodo. Sproščanje MeHg iz sedimenta v vodo v oksičnih pogojih je odvisno od njegove porazdelitve med trdno fazo in porno vodo, pomemben pa je tudi vpliv bioturbacije. Sproščeno MeHg se vključuje v prehranjevalni splet in se kopiči v višjih trofičnih nivojih. Poznavanje bentoških pretvorb Hg in dejavnikov, ki nanje vplivajo, je pomembno za zaščito morskih organizmov pred zastrupitvami in za razvoj učinkovitih bioremediacijskih metod.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	504.04:574.5:546.49(043)=863
CX	ecology/mercury/Hg methylation/Adriatic sea/sediments/benthic transformations/Grado lagoon
AU	HMELJAK, Julija
AA	FAGANELI, Jadran (supervisor)/HORVAT, Milena (co-advisor)/ MANDIĆ MULEC Ines (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2006
TI	BENTHIC TRANSFORMATIONS OF MERCURY AT THE OXIC-ANOXIC TRANSITION IN THE GRADO LAGOON
DT	Graduation thesis (university studies)
NO	X, 80 p., 3 tab., 24 fig., 66 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Mercury (Hg) is a severe toxic heavy metal and its natural cycling is global. Its toxicity depends on concentrations and chemical speciation. The most toxic form is methyl mercury (MeHg) that can be highly biomagnified in the food chain. The Idrija Hg mine was mined continually for 500 years until recently. The mining operation severely contaminated rivers Idrijca and Soča and the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). The impacted area encompasses also the Grado lagoon, a mariculturally important area. The knowledge of benthic Hg cycling is important to prevent the contamination of edible marine organisms, especially fishes and shellfishes. Benthic fluxes of Hg_{tot} and MeHg, in parallel with other relevant chemical species, were measured in the laboratory (in an incubated dark flux chamber) in oxic and anoxic conditions. The data show that the regeneration of Hg_{tot} is not affected by the oxic-anoxic transition. Conversely, the regeneration of MeHg is up to ten-fold more extensive in sediments overlain by oxygen depleted waters and proceeds in parallel with Fe influx. This is the result of enhanced methylation, and Fe(III) reduction and subsequent Fe-sulphide precipitation due to sulphate reduction as the key benthic biogeochemical process. The benthic mobility of Hg_{tot} seems, on the other hand, more affected by the formation of polysulphides and organic complexes. In oxic conditions, the majority of MeHg is retained on sediment particles, while in anoxic conditions the MeHg regeneration reaches nearly 3/4 of Hg flux. The MeHg release to the overlying water is, hence, the consequence of its distribution between solid phase and pore water as well as bioturbation and bioirrigation. The released MeHg is quickly introduced and highly biomagnified in the marine food webs. The knowledge of benthic processes of Hg transformations is crucial to prevent contamination of marine organisms and development of bioremediation strategies.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
Slovarček	X
1 UVOD	1
1.1 RUDNIK ŽIVEGA SREBRA V IDRIJI	3
1.2 HIPOTEZE IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA	6
2 PREGLED OBJAV	7
2.1 LASTNOSTI ŽIVEGA SREBRA	7
2.2 BIOGEOKEMIJSKO KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA	12
2.2.1 Vloga bakterij	15
2.2.1.1 Vloga SRB	16
2.2.1.2 Mehanizmi metilacije Hg	17
2.2.1.3 Mehanizmi demetilacije MeHg	19
2.2.2 Odpornost na Hg stres	22
2.2.2.1 Odpornost in redukcija Hg(II) pri bakterijah, ki nimajo operona <i>mer</i>	22
2.2.2.2 Operon <i>mer</i> in bakterijska rezistenca na Hg stres	23
2.2.3 Uporaba bakterij, odpornih na Hg, za remediacijo kontaminiranih okolij	26
2.3 ŽIVO SREBRO V SISTEMU IDRIJCA-SOČA-TRŽAŠKI ZALIV	28
2.4 ŽIVO SREBRO V SEDIMENTIH TRŽAŠKEGA ZALIVA	33

2.5	MINERALIZACIJA ORGANSKE SNOVI V SEDIMENTU TRŽAŠKEGA ZALIVA	34
3	MATERIALI IN METODE	36
3.1	ZNAČILNOSTI GRADEŠKE LAGUNE	36
3.2	VZORČENJE	40
3.3	PRIPRAVA VZORCEV	42
3.4	ANALIZE Hg _{tot} IN MeHg	43
3.4.1	Analize metiliranega Hg (MeHg)	44
3.4.2	Analize celokupnega Hg (Hg_{tot})	47
3.5	SPREMLJAJOČE ANALIZE	50
3.5.1	Analize kisika	50
3.5.2	Analize raztopljenega anorganskega ogljika (DIC)	51
3.5.3	Analize izotopske sestave ¹³C-DIC	51
3.5.4	Analize raztopljenega organskega ogljika (DOC)	51
3.5.5	Analize sulfida in nutrientov	51
3.5.6	Analize kovin	52
4	REZULTATI	52
4.1	MERITVE V INKUBACIJSKI POSODI	52
4.2	MERITVE V PORNIH VODAH	61
5	RAZPRAVA	62
5.1	TOKOVA Hg IN MeHg	62
5.2	MASNA BILANCA Hg V INKUBACIJSKEM POSKUSU	66
6	SKLEPI	68
7	POVZETEK	69
8	VIRI	71
	ZAHVALA	80

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1 Koncentracije Hg_{tot} in MeHg v vzorcih	53
Pregl. 2 Razmerja (deleži) MeHg glede na Hg_{tot}	54
Pregl. 3 Snovni tokovi analiziranih kemijskih zvrsti v času inkubacijskega poskusa*	60

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1 Kapljica samorodnega Hg, Antonijev rov, Idrija	6
Sl. 2 Železna krogla plava na elementnem Hg. To dokazuje, da ima živo srebro večjo specifično težo in je gostejše od železa. Antonijev rov (muzejska zbirka), Idrija	12
Sl. 3 Biogeokemijsko kroženje Hg (Barkay in sod., 2003 str. 357)	14
Sl. 4 Metilacija Hg(II) po poti acetil-CoA v bakteriji <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> LS (Barkay in Wagner-Döbler, 2005: 6)	19
Sl. 5 Model sistema odpornosti Hg pri Gram negativnih bakterijah (Barkay in sod., 2003: 360)	25
Sl. 6 Koncentracije Hg _{tot} v sedimentih Tržaškega zaliva (Covelli in sod., 2001: 546)	33
Sl. 7 Satelitski posnetek Gradeške lagune (Wikipedia, 2006: Grado)	36
Sl. 8 Pogled na Gradeško laguno (Laguna di Grado, 2004)	37
Sl. 9 Barbana, eden od številnih otočkov v laguni. Ob njegovi obali se nahaja vzorčevalna postaja BAR, kjer smo odvzeli vzorec sedimenta in morske vode za potrebe eksperimenta (Benvenuti a Grado, 2006)	38
Sl. 10 Lokacija vzorčevalne postaje BAR v Gradeški laguni (Covelli in sod., 2006, v pripravi)	38
Sl. 11 Vertikalni profili vsebnosti Hg _{tot} , MeHg, C _{org} , N _{tot} , S _{tot} in molskega razmerja C _{org} /N _{tot} v sredici sedimenta pri vzorčevalni postaji BAR	39
Sl. 12 Vertikalni profili vsebnosti Hg _{tot} , MeHg, DOC, NH ₄ ⁺ in PO ₄ ³⁻ v pornih vodah sedimenta pri vzorčevalni postaji BAR	40
Sl. 13 Potapljač se pripravlja na odvzem vzorca sedimenta	41
Sl. 14 Simulacijski poskus v laboratoriju – bentoška posoda z odvzetim sedimentom	42
Sl. 15 Filtracija vzorca pornih vod v anaerobni komori v Laboratoriju za morsko biologijo v Nabrežini pri Trstu	44
Sl. 16 Prepihanje etilacijske mešanice z N ₂	46
Sl. 17 Elucija s pasti, separacija s plinsko kromatografijo in detekcija MeHg	46
Sl. 18 Aparatura za separacijo in merjenje vsebnosti Hg _{tot}	48
Sl. 19 Spremembe koncentracij MeHg v vodnem stolpci v bentoški komori	54
Sl. 20 Spremembe koncentracij Hg _{tot} v vodnem stolpcu v bentoški komori	55
Sl. 21 Spremembe koncentracij O ₂ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , H ₂ S in Mn v bentoški komori	58
Sl. 22 Spremembe koncentracij DIC, δ ¹³ C-DIC, DOC, Ca, Mg in Fe v bent. komori	59
Sl. 23 Spremembe koncentracij SiO ₄ ⁴⁻ v bentoški komori	60
Sl. 24 Koncentracije Hg _{tot} , MeHg, NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , SiO ₄ ⁴⁻ , DIC, vrednosti δ ¹³ C-DIC, DOC, Fe, Mn, Ca in Mg v pornih vodah pred in po inkubacijskem poskusu v Gradeški laguni	62

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BAR: vzorčevalna postaja v bližini otoka Barbana v Gradeški laguni

Hg_{tot}: celokupno živo srebro

MeHg: metilirano živo srebro (CH₃Hg⁺)

SRB: angl. sulphate reducing bacteria; bakterije, ki reducirajo sulfat

SLOVARČEK

Bentoška masna bilanca:	hitrost izmenjave neke snovi med sedimentom in vodo oz. vodnim stolpcem
Bioakumulacija:	povišanje koncentracije neke snovi v tkivih živih organizmov v primerjavi s koncentracijami te snovi v okolju
Bioirigacija:	vnos vode iz vodnega stolpca v sediment kot posledica dejavnosti ali prisotnosti živih organizmov v sedimentu
Biokoncentracija:	poviševanje koncentracije neke snovi vzdolž trofičnih nivojev prehranske verige oz. spleta
Bioremediacija:	čiščenje ali razstrupljanje kontaminiranega geografskega območja z uporabo živih organizmov
Bioturbacija:	premešanje trdne faze sedimenta kot posledica dejavnosti ali prisotnosti živih organizmov v sedimentu
Demetilacija:	odstranjevanje (odcepljanje) metilne skupine z atoma ali molekule
Metilacija:	vezava metilne skupine na atom ali molekulo
Porna voda:	voda v porah sedimenta, glede na kemično sestavo se lahko zelo razlikuje od vodnega stolpca
Vodni stolpec:	voda, ki nadslojuje sediment – od gladine vodnega telesa do dna oz. meje sediment-voda

1 UVOD

Danes postaja zavest o pomenu neoporečnega bivalnega okolja za zdravje ljudi vse večja. S tem postaja pomen varovanja človekovega in naravnega okolja pred škodljivimi vplivi, ki so v prvi vrsti posledica onesnaževanja, izjemno relevanten na vseh področjih človekovega delovanja. Tako širša javnost kot tudi različne ustanove posvečajo ogromno pozornosti preventivnim in kurativnim ukrepom za zaščito okolja.

Predvsem pri preventivi igra pomembno vlogo raziskovalna dejavnost, ki nam omogoča spoznavanje vplivov onesnaževanja in spreminjanja okolja na naše zdravje, življenje in razvoj. Hkrati pa nam znanstvena spoznanja omogočajo razumevanje procesov v naravnih okoljih. Ravno to razumevanje omogoča oblikovanje preventivnih in razvoj kurativnih ukrepov za ohranjanje sprejemljive kakovosti zraka, vode, tal in hrane.

Med te ukrepe sodijo predvsem priprava okoljevarstvenih predpisov (zakonski in podzakonski akti, mednarodne konvencije ipd.) ter razvoj tehnologij za zmanjševanje onesnaževanja in čiščenje kontaminiranih področij.

Živo srebro (Hg) je globalni polutant in pomemben toksin, ki se kopiči v prehranjevalnih verigah oz. spletih. Zato je najnevarneši velikim plenilcem, ki se nahajajo na vrhu prehranjevalnih verig/spletov, mednje pa seveda sodi tudi človek. Čeprav so vse oblike živega srebra strupene in so škodljive že pri zelo nizkih koncentracijah, strokovna javnost in institucije največ pozornosti namenjajo alkiliranim oblikam živega srebra, predvsem metiliranemu živemu srebru (MeHg). Je namreč bolj strupeno od ostalih oblik Hg. To pomeni, da MeHg povzroča okvare že pri nižjih koncentracijah, kot je to značilno pri drugih oblikah živega srebra oz. njegovih spojin.

Najpogosteje se ljudje z MeHg zastrupijo z uživanjem kontaminiranih rib in drugih morskih organizmov. V teh se namreč živo srebro nahaja v metilirani obliki, koncentracije pa so

nevarno povišane ravno v užitnih dolgoživih ribah, ki se nahajajo pri vrhu morskega prehranjevalnega spleta (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

Razumevanje biogeokemijskih pretvorb živega srebra je danes pomembno in zelo aktualno zaradi naraščajoče splošne zaskrbljenosti strokovne in širše javnosti. Večina Hg je v okolju deponiranega v ionski obliki kot Hg^{2+} oz. Hg(II) , ki je neposredni substrat za metilacijo. Zaradi tega je temeljito poznavanje biogeokemijskega kroženja Hg zelo pomembno. Biotski in abiotski procesi, pri katerih se Hg(II) posredno ali neposredno metilira, MeHg pa razgrajuje, so pri tem ključni, njihovo preučevanje pa je temelj za preprečevanje, zmanjševanje oz. uravnavanje in kontrolo možnosti zastrupitev (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Globalno se ravni Hg v okolju povečujejo, posledično se večajo tudi koncentracije in možnost bioakumulacije zelo strupenega MeHg (Hines in sod., 2000)

Bakterije in arheje imajo pri biogeokemičnem kroženju živega srebra bistveno vlogo. Mikrobne pretvorbe obsegajo predvsem redukcijo Hg^{2+} , metilacijo Hg^0 in demetilacijo metilnega živega srebra (MeHg). Metilacijo in demetilacijo v največji meri vršijo anaerobi, predvsem sulfatni reducenti.

Mokrišča in vlažni sedimenti imajo visok potencial za metilacijo Hg. V takih okoljih se lahko sintetizira tudi do 30 ng MeHg na dan (Stamenkovic in sod., 2004).

V morskih okoljih so pomembna mesta mikrobnih pretvorb Hg v sedimentih tistih morskih bazenov, ki so pod vplivom industrijskega onesnaževanja z živim srebrom ali vnosov Hg s sladkovodnimi pritoki. Tak je tudi primer Tržaškega zaliva. Vanj se z naplavinami reke Soče že petsto let izlivajo vode, onesnažene s Hg iz idrijskega rudnika. Soča predstavlja največji dotok sladke vode v zaliv in vanj preko nje prihajajo velike količine trdih delcev in organskih snovi.

Dosedanje raziskave tega območja so pokazale, da Hg v zaliv vstopa večinoma v obliki delcev HgS , ki se hitro posedejo v bližini izliva Soče (Covelli in sod., 2001). Ti sedimentirani delci

postanejo substrat za mikrobne pretvorbe, predvsem za metilacijo v MeHg in demetilacijo MeHg v Hg. Novejše raziskave kažejo, da ta nasprotna procesa potekata enako hitro, torej sta oba tokova odvisna od koncentracije substrata (Hines in sod., 2000; Hines in sod., 2004). MeHg, ki nastaja v sedimentu, se iz pornih vod sprošča v vodni stolpec, kjer se lahko vključi v morske pelaške prehranjevalne spletke. Ker se bioakumulira oz. biokoncentrira vzdolž prehranjevalne verige, ima največji vpliv na višje trofične nivoje. Tako vpliva na marikulturo in na človeka (Faganeli in sod., 2003). Nevarnost kontaminacije morskih sadežev in rib z MeHg ima tako lahko poleg velikega vpliva na zdravje ljudi, ki živijo ob Tržaškem zalivu, tudi nezanemarljive ekonomske posledice.

Gradeška laguna je primer plitvega morskega okolja v Tržaškem zalivu, ki ga človek izkorišča za intenzivno marikulturo in kamor pritekajo z živim srebrom in organskimi snovmi bogati pritoki sladke vode - rokavi Soče in drugih rek, kanali in potoki. Danes so v tem »naravnem biogeokemijskem Hg reaktorju« bentoške mikrobne pretvorbe živega srebra predmet intenzivnega raziskovanja (Covelli in sod., 2006, v pripravi).

1.1 RUDNIK ŽIVEGA SREBRA V IDRJI

Po naključnem odkritju samorodnega živega srebra v Idriji leta 1490 se je v začetku 16. stoletja začela intenzivna rudarska dejavnost, ki je potekala do leta 1995. V petstoletni zgodovini rudnika so izkopali 12 milijonov ton živosrebrove rude, iz katere so pridobili 128.000 ton Hg oz. 1/8 svetovne proizvodnje te kovine. Idrijski rudnik je (bil) drugi največji rudnik živega srebra na svetu.

Hkrati z razvojem rudnika pod zemljo se je nad njim začel tudi razvoj mesta Idrije, ki je v 18. stol. ravno zaradi rudarstva postalo središče tehnološkega napredka Avstroogrske. O izjemnem pomenu rudnika priča tudi podatek, da je v 20. stoletju od rudarstva živelo kar 80 odstotkov prebivalcev Idrije.

Idrijsko rudišče je staro 220 milijonov let in leži v severozahodnem delu Slovenije, 50 km zahodno od Ljubljane, ob sotočju rek Idrijce in Nikove. Nahaja se v kotlini, ki je del idrijskega tektonskega preloma.

Zaradi tektonskih premikov in pestre geološke zgradbe je zelo kompleksno. Razprostira se približno 1500 m v smeri severozahod – jugovzhod. Široko je 300 do 600 m in sega 450 m v globino. Odkritih je bilo 156 rudnih teles, ki pa so zelo neenakomerno razporejena (Horvat in sod., 2002). Sam rudnik tvori 15 obzorij, prepreda pa ga več kot 800 km rogov.

Je edino nahajališče večjih in za izkopavanje primernih količin samorodnega elementnega živega srebra na svetu, živo srebro pa se nahaja še v številnih rudah, od katerih je največ cinabarita (HgS).

V Idriji so poleg kopanja rude ves čas obstoja rudnika izvajali tudi celoten metalurški postopek pridobivanja živega srebra. Postopkom pridobivanja kovine so vseskozi posvečali veliko pozornosti, da bi povečali izkoristek, zmanjšali izgube in omejili nevarnosti zastrupitve. Kljub temu pa so zrak, tla in voda v okolici Idrije še vedno zelo onesnaženi s Hg (mestni muzej Idrija, 2005).

Živo srebro so pridobivali s preprostim postopkom žganja rude, pri katerem so Hg ekstrahirali s pomočjo vročega zraka, temu je sledila kondenzacija par.

Sprva so rudo žgali na prostem v lesenih kopah, kasneje so tehnologijo izboljševali. Konec 19. stol. so žgalnico preselili na desni breg Idrijce in jo kasneje posodobili z uvedbo presipnih peči, ki so bile vrhunska metalurška inovacija in so delovale še po koncu II. svetovne vojne. Zadnje posodobitve je bila topilnica deležna v 60. letih 20. stol., ko so namestili tri rotacijske peči – največje tovrstne naprave za predelavo Hg rude na svetu. Jalovino in izkopano rudo najslabše kakovosti so odlagali ob bregove Idrijce in v neposredno okolico mesta. Za številna, predvsem starejša odlagališča, ni podatkov o natančni lokaciji in velikosti.

V sklopu žgalnice, ki je v času največjega razcveta rudnika proizvajala 700 – 800 ton Hg letno, so pridobivali tudi različne živosrebrove spojine, med katerimi je bil tržno najpomembnejši cinober.

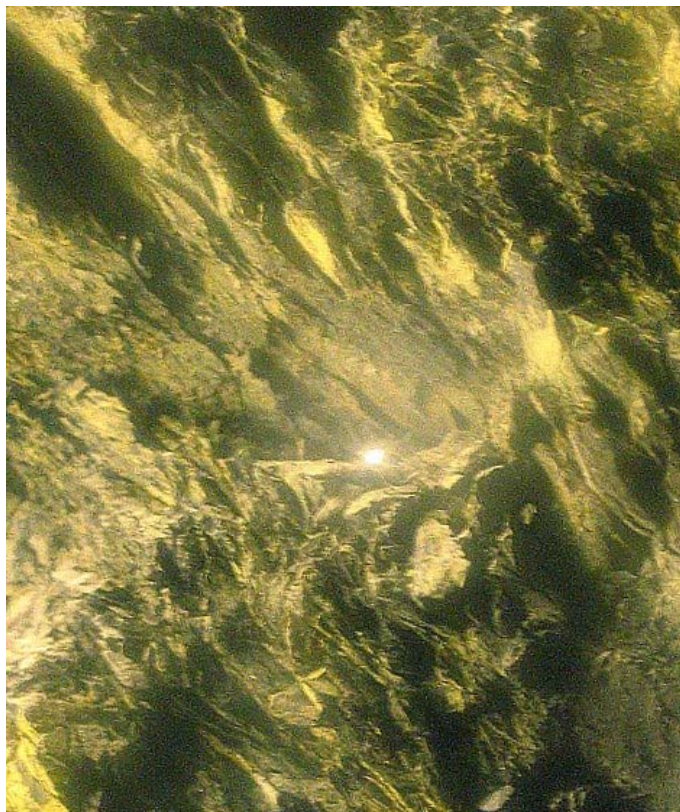
Pri samem postopku žganja je prihajalo do velikih izgub, predvsem preko izpuhov v ozračje. To živo srebro se je z dežjem izpiralo in onesnažilo tla. Povečane koncentracije Hg v zraku in tleh pa niso edina nevarnost za zdravje prebivalcev Idrije in rudarjev. Na več mestih po Idriji so izmerili povišane koncentracije radioaktivnega plina radona, veliko nekdanjih rudarjev trpi za silikozo (kopičenje silikatnega prahu v pljučih), številni so primeri kroničnih in akutnih zastrupitev s Hg.

Zaradi vse večje okoljske in zdravstvene ozaveščenosti v svetu se uporaba težkih kovin, tudi živega srebra, zmanjšuje. Iz istih razlogov so slovenske oblasti leta 1989 sprejele sklep o postopnem zaprtju rudnika živega srebra v Idriji. Z izkopavanjem rude so prenehali leta 1995, od takrat potekajo samo zapiralna dela, ki naj bi se zaključila do konca leta 2006.

Najgloblje nivoje so zalili z vodo, stare že zasute stranske odkope stabilizirajo z injektiranjem mešanice kamene moke, cementa in vode, ostale predele pa zasipavajo s pnevmatskim zasipom, to je brizganje mešanice peska in cementnega mleka na željeno mesto pod pritiskom (Mestni muzej Idrija, 2005).

Od skupno 12 milijonov ton izkopane rude je približno 1/4 nikoli ni bilo predelane in se je torej izgubila v okolje (Faganeli in sod., 2003). Ocenjujejo, da se je 37.000 ton Hg izgubilo v okolje preko izpustov v zrak, reko in tla (EUROCAT – European..., 2004), erozija s Hg kontaminiranega materiala iz Idrije in njene širše okolice pa še danes predstavlja kontinuirani vir onesnaženja za Idrijco, Sočo in Tržaški zaliv. Meritve tudi kažejo, da se 10 let po prenehanju rudarske dejavnosti koncentracije Hg vzdolž Soče in v sedimentu Tržaškega zaliva niso opazno zmanjšale (Horvat in sod., 2003).

Petstoletna rudarska dejavost je torej pustila hude posledice tako v neposredni bližini rudnika, kot tudi na območju vzdolž stokilometerskega toka Idrijce in Soče do Tržaškega zaliva. Koncentracije Hg so zelo visoke v zraku, vodah, sedimentih in ob rečnih bregovih, metilacija in demetilacija Hg pa poteka v številnih različnih habitatih v tem sistemu (Hines in sod., 2004).



Slika 1: Kapljica samorodnega Hg, Antonijev rov, Idrija

1.2 HIPOTEZE IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA

Cilj diplomskega dela je razvozlati bentoške mikrobne procese pretvorb Hg na meji sediment - voda v odsotnosti aktivnosti primarnih producentov, predvsem bentoških mikroalg, v Gradeški laguni na prehodu iz oksičnega v anoksično okolje. Vzporedno s tem pa s pomočjo kemijskih analiz spremljati procese mikrobne razgradnje sedimentirane organske snovi, ki vplivajo na pretvorbe Hg.

Zato smo izvedli poseben laboratorijski poskus z inkubacijo vzorca sedimenta v temi in pri pogojih *in situ*.

Vzorci v vodi nad sedimentom smo odvezemali v enakih časovnih intervalih in jim določili vsebnost različnih snovi (produktov), ki sodelujejo pri pretvorbah Hg in razgradnji organske snovi. Iz linearne regresije smo določili snovne tokove posameznih zvrsti na meji med vodo in sedimentom ter tako neposredno spremljali in ovrednotili posamezne procese, ki vplivajo na pretvorbe Hg in razgradnjo organske snovi. Dobljene rezultate smo nato vnesli v model, s katerim smo določili hitrost posameznih procesov.

Postavili smo ključno delovno hipotezo, da je v bentoškem sistemu hitrost metilacije Hg tem večja, čim manj je prostega kisika. To pomeni, da nižji kot je redoks potencial, več MeHg nastaja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LASTNOSTI ŽIVEGA SREBRA

Živo srebro je težka kovina srebrne barve z atomsko maso 200,59 g/mol. Tališče ima pri 38,8 °C in je pri standardnih pogojih v tekočem agregatnem stanju. Je dober električni prevodnik, zelo slabo pa prevaja toploto in ima veliko gostoto (13,5 g/cm³ pri standardnih pogojih). V vodi je slabo topno, je pa zelo hlapno. Živosrebrovi hlapi so brez barve, vonja in okusa.

Njegove nenavadne lastnosti so od nekdanj privlačile alkimiste. Po vsem svetu so ga uporabljali v metalurgiji in medicini ter kasneje tudi v industriji. Uporabljali so ga tudi pri izdelovanju klobukov. Ker je med tem procesom prihajalo do pogostih zastrupitev, katerih simptomi so vključevali tudi poslabšanje duševnega zdravja, se je v angleško govorečih deželah pojavil rek »Mad as a hatter« oz. nor kot klobučar. Lik Norega klobučarja iz romana Lewisa Carrola Alica v čudežni deželi se opira na to izročilo.

Z nekaterimi kovinami, zlasti zlatom, srebrom, bakrom in cinkom tvori amalgame, saj so te kovine topne v živem srebru. Zato so ga v preteklosti uporabljali za pridobivanje zlata in srebra iz rud z amalgamacijo, uporabljali pa so ga tudi za ohranjanje lesa, izdelovanje papirja, ogledal, manometrov in termometrov ter kot sestavino barv, premazov, herbicidov in fungicidov. Živosrebrove spojine so dodajali antiseptikom, antibiotikom, antidepresivom in laksativom. Med leti 1950 in 1975 se je uporaba Hg izjemno razširila, po letu 1975 pa je začela naglo upadati. Brambati (1996: 8) navaja, da med glavne razloge za upad sodijo ponavljajoče se večje zastrupitve s Hg in njegovimi spojinami, ki so zaradi izčrpnega medijskega poročanja postale kar senzacionalne, in pa splošna večja ozaveščenost ljudi o pomenu varovanja okolja. Zaradi strupenosti je danes raba živega srebra omejena, nadomeščajo ga z alternativnimi, okolju in zdravju prijaznejšimi tehnologijami.

Danes se živo srebro uporablja pri proizvodnji baterij, žarnic, stikal, katalizatorjev in elektrokemijskih celic za kemično industrijo ter insekticidov.

Živo srebro ima lahko v naravi dve oksidacijski stanji, 0 ali +2, v spojinah pa tudi +1. Ima veliko afiniteto za vezavo na partikulatni material (angl. particulate-reactive element) in organske molekule. Zmožnost vezave Hg na organske makromolekule v vodnih okoljih že dolgo velja za pomemben, a trenutno še slabo razumljen prispevek h kemični speciaciji. Bonzongo in Donkor (2003) še navajata, da novejša raziskave potrjujejo, da je velik delež t.i. raztopljenega Hg pravzaprav Hg, vezan na suspendirane organske koloide.

Vezava živosrebrovih ionov na te organske makromolekule je nekakšen mehanizem zaščite pred toksičnimi vplivi Hg v ekosistemih, ki so bogata z organskim materialom, saj se z vezavo pomembno zmanjša biodostopnost Hg(II) za metilacijo. V zadnjih letih se zaradi tanjšanja ozonske plasti povečuje količina UV žarkov, ki dosežejo površje Zemlje. Povečano obsevanje, zlasti žarkov UV-B, pa pospešuje razpad sicer stabilnih huminskih in fulvinskih kislin, kar lahko pomeni razpad kompleksov Hg – huminska/fulvinska kislina in sproščanje Hg(II). S tem pa se biološka dostopnost nevarnega Hg(II) povečuje (Bonzongo in Donkor, 2003).

Človeške dejavnosti predstavljajo kar 3/4 globalnega vnosa Hg v okolje. Analize sedimentov in ledu ter meritve Hg v ozračju kažejo na povečanje vnosa Hg v tla, vode in ozračje v zadnjih 200 letih. Gre za očitno posledico industrijalizacije (Barkay in sod., 2003). Z živim srebrom so onesnažena tudi vodna telesa, ki sicer niso pod neposrednim vplivom onesnaževanja s Hg (Horvat in sod., 1993). Hg ta vodna telesa doseže preko atmosfere z depozicijo trdnih delcev ali z dežjem. Raziskovalci menijo, da je 40 do 50% Hg v atmosferi antropogenega izvora. Glavni vir Hg v ozračju je razširjena uporaba fosilnih goriv, predvsem premoga. Zakisanje površinskih vodnih teles, ki je posledica kislega dežja, še dodatno povečuje biodostopnost Hg v onesnaženih vodnih telesih, kar spet pripelje do povečane metilacije in bioakumulacije MeHg v ribah (Horvat in sod., 1993).

Boening (2000) navaja, da živo srebro povzroča okvare bakterijskih celičnih komponent že pri koncentraciji 5 $\mu\text{g/L}$, organski derivati Hg pa imajo negativne učinke že pri desetkrat nižjih koncentracijah.

V celicah evkariontov Hg(II) deluje podobno kot reaktivne oblike kisika (ROS, angl. reactive oxygen species). Ker imajo evkarionti sisteme, ki ščitijo celične komponente pred škodljivimi kisikovimi radikali, verjetno obstaja povezava med temi sistemi in občutljivostjo celic na Hg(II) (Barkay in sod., 2003).

Pri ljudeh zastrupitve z elementnim živim srebrom povzročijo hude okvare jeter, ledvic in prebavil.

Metil živo srebro je nevrotoksin za večino vretenčarjev. Klaassen in sodelavci (1986, cit. po Boening, 2000) navajajo, da so vretenčarji občutljivi na MeHg, ker nimajo zaščitnih detoksifikacijskih mehanizmov, sam toksin pa lahko neovirano prehaja v organizem. Nevarno je, ker se zadržuje v telesu. Iz krvnega obtoka prehaja v jetra, od tu pa preko žolča v črevesje. Za razliko od mnogih drugih strupenih snovi se od tu ne izloči z blatom, ampak se, kot navajata Gordon in Skett (1986, cit. po Boening, 2000) resorbira in ponovno vključi v krvni obtok. Ta proces se imenuje enterohepatična recirkulacija in je osnoven princip večkrat omenjene

bioakumulacije. Zlahka prehaja iz krvi v tkiva, znotraj celic interagira s citoplazmatskimi in jedrnimi komponentami ter prestopa tudi krvno – možgansko bariero. Kopiči se zlasti v živčevju, pa tudi v mišičju in krvi (Boening, 2000). Posledice zastrupitve so številne – od rahle otopelosti okončin in motenj ravnotežja do slepote in smrti (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

V zadnjih štiridesetih letih je bilo dokumentiranih več primerov obsežnih zastrupitev prebivalstva z živim srebrom in metil živim srebrom, ki so povzročile trajne poškodbe in smrt. Med temi izstopajo trije obsežnejši primeri. Pri prvih dveh je šlo za kronične zastrupitve, kjer so ljudje skozi daljše časovno obdobje prejemali manjše odmerke strupene snovi, tretji opisani pa je primer akutne zastrupitve, pri kateri so v kratkem časovnem obdobju ljudje zaužili velike količine živega srebra. Zanimivo je, da so bile posledice zelo podobne (Brambati, 1996: 11).

Najbolj poznan je primer iz Minamate na Japonskem, kjer so se v zaliv več let izlivale z živim srebrom močno onesnažene odpadne vode iz bližnjega kompleksa kemičnih tovarn. To živo srebro se je v sedimentu zaliva metiliralo, nastajajoči MeHg pa je vstopal v prehranjevalne spletke in se bioakumuliral v organizmih, predvsem v ribah. Posledice onesnaženja so bile zelo hude. Velika večina lokalnega prebivalstva se je namreč prehranjevala pretežno z morskoro hrano (ribami, raki, mehkužci in algami) iz zaliva. Sprva so opazili nenavadno vedenje in nepojasnjene pogine vodnih ptic in mačk, kasneje pa so se pojavili tudi simptomi pri ljudeh, med njimi motnje zaznavanja, ravnotežja in vedenja, poslabšanje delovanja jeter in ledvic ter hude prirojene okvare živčnega sistema pri novorojencih. Navedeni simptomi so značilni za sindrom kronične zastrupitve z metiliranim živim srebrom, ki se danes imenuje tudi bolezen Minamata. Brambati (1996: 11) navaja, da je v letu 1978 za posledicami zastrupitve z MeHg umrlo 200 ljudi, do leta 1993 pa so našli več kot 2000 primerov hujših nevroloških okvar.

Tudi drugi odmevnejši primer zastrupitve z MeHg se je zgodil na Japonskem, točneje v Niigati. Z MeHg kontaminirane odplake iz tovarne acetaldehida so se iztekale v reko Agano. Zastrupilo se je 6669 ljudi, smrtnih primerov je bilo 55. Zanimivo je, da ni bilo največ žrtev neposredno ob izvoru kontaminacije, ampak 60 km stran, ob ustju reke. To področje namreč

naseljujejo revnejši prebivalci, ki se preživljajo predvsem z ribolovom in njihova prehrana temelji skoraj izključno na lastnem ulovu.

Do množične akutne zastrupitve z živim srebrom pa je prišlo v Iraku pozimi med letoma 1971 in 1972, ko so večje količine semenske pšenice, ki je bila obdelana s fungicidom na osnovi Hg, zmleli v moko in uporabili za prehrano. V treh mesecih je umrlo 459 ljudi, več kot 1000 odraslih in novorojencev pa je utrpelo hujše trajne okvare živčevja. Skupno se je zastrupilo 6000 ljudi.

Kot že rečeno, se metil živo srebro bioakumulira vzdolž prehranjevalnih verig. V površinskih vodah je razmerje med celokupnim Hg in MeHg v povprečju $1 \text{ ng/L Hg}_{\text{tot}} : 0,05 \text{ ng/L MeHg}$, na vrhu prehranjevalne verige pa je lahko faktor biokoncentracije (bioakumulacije) 10^7 , kar pomeni, da koncentracija MeHg v ribah, ki naseljujejo take vode, lahko preseže s strani Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) določeno mejno vrednost $0,5 \text{ } \mu\text{g/g}$ ribjega mesa (Horvat in sod., 1993).



Slika 2: Železna krogla plava na elementnem Hg. To dokazuje, da ima živo srebro večjo specifično težo in je gostejše od železa. Antonijev rov (muzejska zbirka), Idrija

2.2 BIOGEOKEMIJSKO KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA

Danes je dobro znano, da kemijska oblika nekega elementa določa vlogo, transport, biodostopnost in toksičnost le – tega v ekosistemu. Kroženje oz. kemijska in fazna speciacija živega srebra je kompleksna, Gill pa navaja, da je zlasti v vodnih okoljih kroženje Hg izrazito kompleksno, saj je odvisno od številnih biotskih in abiotskih dejavnikov (Gill, 2001).

Globalno biogeokemijsko kroženje živega srebra je zelo pomembno. Hg sicer ni biogeni element, njegove fazne in kemijske pretvorbe pa vseeno vplivajo na žive organizme, saj gre za zelo strupen element. Biotski in abiotski procesi omogočajo kroženje živega srebra, tj. prehode različnih oblik Hg iz tal in vode v ozračje in nazaj.

V zemeljski skorji se živo srebro nahaja v elementni obliki in v številnih binarnih HgS mineralih, npr. cinabaritu, metacinabaritu in hipercinabaritu. Te oblike so sicer zelo slabo topne, vseeno pa naravni in antropogeni procesi omogočajo pretvorbe raztopljenega Hg med različnimi oksidacijskimi stanji (+2, +1, 0) in konverzijo v različne organske derivate (Barkay in sod., 2003). Na sliki 5 je prikazano globalno biogeokemijsko kroženje živega srebra. Glavni rezervoarji Hg so poleg litosfere še atmosfera, sedimenti in oceani.

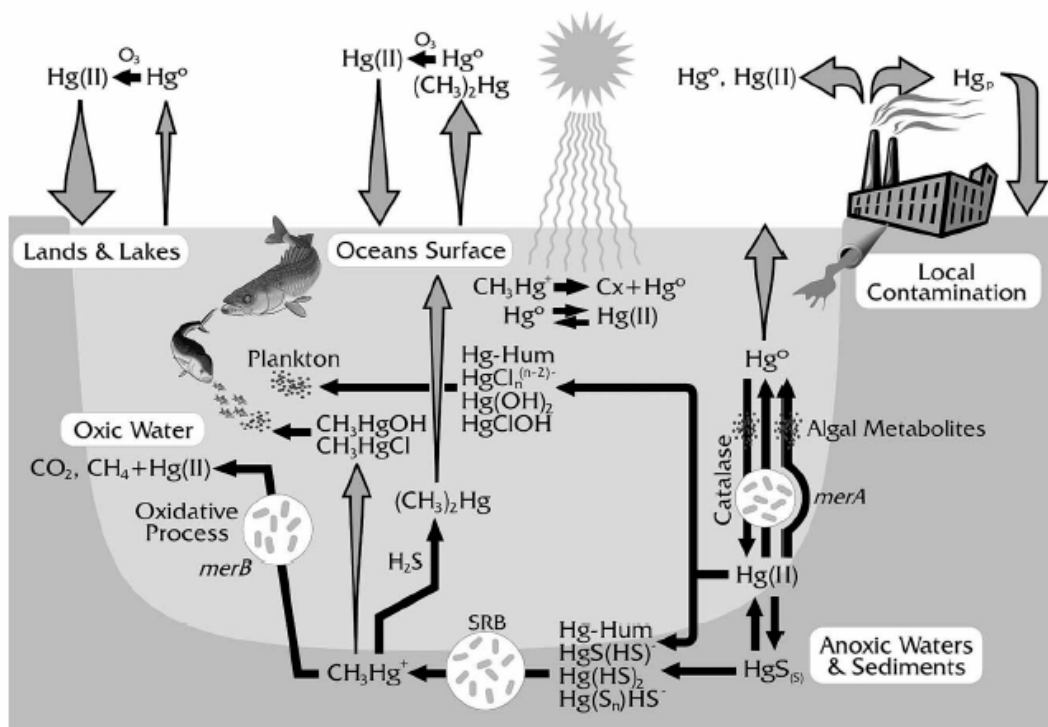
Živo srebro prehaja v ozračje z evaporacijo iz oceanov in tal ter z onesnaževanjem. V atmosferi se Hg(0) pod vplivom ozona in UV žarkov pretvarja v ionsko obliko Hg^{2+} oz. Hg(II). Veliko Hg(II) z dežjem prehaja iz atmosfere v oceane. Tu poteka fotoredukcija ali bakterijska redukcija v Hg(0). Tako nastalo elementno živo srebro hlapi nazaj v atmosfero.

V vodnem stolpcu se živosrebrevi ioni lahko vežejo v komplekse z organskimi makromolekulami, zlasti huminskimi, fulvinskimi in karboksilnimi kislinami. Ti kompleksi se nato posedajo na dno ali pa se neposredno vključijo v pelaške prehranjevalne spletke. Fulvinske in huminske kisline omogočajo abiotsko metilacijo Hg(II) tako v vodnem stolpcu kot v sedimentu. Ob prisotnosti S^{2-} nastaja netopni HgS, ki precipitira na dno.

V sedimentih poteka bakterijska metilacija Hg(II). Nastali MeHg se vključuje v bentoške in pelaške prehranjevalne spletke ter se bioakumulira na višjih trofičnih nivojih. Deloma pa se biotsko ali abiotsko demetilira. Pri tem se sproščajo živosrebrevi ioni, ki se spet lahko vključujejo v zgoraj opisane procese (vezava na organske molekule, metilacija, fotoredukcija, bakterijska redukcija). Monometil živo srebro lahko v sedimentu reagira s HgS. Nastalo dimetil živo srebro je zelo hlapno in prehaja v atmosfero. Globalno so koncentracije MeHg v glavnem odvisne od razmerja med metilacijo in demetilacijo (Boening, 2000).

Tudi v tla in celinske vode lahko Hg prehaja na več načinov. Glavni viri so preperevanje s Hg bogatih matičnih kamnin, erozija kontaminiranih tal, padavine in človeške dejavnosti. Med te sodijo zlasti odlaganje kontaminiranih odpadkov (industrijski in rudarski odpadki, biomasa iz čistilnih naprav ipd.) in uporaba biocidov na osnovi živega srebra. Kontaminirane reke so vir

Hg(II) za morja in oceane, metilacija in demetilacija potekata tudi v rečnih in jezerskih sedimentih in sladkovodnih mokriščih.



Slika 3: Biogeokemijsko kroženje Hg (Barkay in sod., 2003 str. 357). Puščice predstavljajo glavne tokove Hg med rezervoarji. Velikost in debelina puščic je približno sorazmerna z intenzivnostjo oz. pomembnostjo posameznih tokov.

Zaradi človeškega vpliva se Hg sprošča v okolje na različne načine. Eden glavnih je izpust v ozračje ob izgorevanju fosilnih goriv, pomembni viri pa so tudi odlaganje oz. uničevanje odpadkov, ki vsebujejo velike količine Hg. Med te sodijo biomasa iz čistilnih naprav, industrijski odpadki, fluorescentne žarnice, baterije, zobni implantati in elektrode. Mason in Fitzgerald navajata, da v svetovnem merilu antropogeni izvori predstavljajo kar 75% globalnega vnosa živega srebra v okolje (Mason in Fitzgerald, 1996, cit. po Barkay in sod., 2003). Boening (2000) navaja, da se je od začetka industrijske revolucije vsebnost Hg v atmosferi povečala 2 do 5 krat.

2.2.1 Vloga bakterij

Po množični zastrupitvi prebivalstva v zalivu Minamata na Japonskem v šestdesetih letih 20. stoletja, se je zanimanje za metilacijo Hg izredno povečalo (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

Jensen in Jernelöv sta v študiji iz leta 1969 dokazala biogeno metilacijo Hg(II) (Barkay in Wagner-Döbler, 2005, cit. po Jensen in Jernelöv, 1969). V anoksičnih akvarijskih in jezerskih sedimentih sta opazila in izmerila nastajanje MeHg, po sterilizaciji vzorcev pa metilacija ni več potekala. Leta 1985 sta Compeau in Bartha dokazala, da so sulfatni reducenti poglavitni vršilci metilacije živega srebra (Barkay in Wagner-Döbler, 2005, cit. po Compeau in Bartha, 1985). Poglobljene mehanistične in taksonomske raziskave so razkrile, da je sposobnost metilacije Hg zelo razpršena po filogenetskem drevesu sulfatnih reducentov, npr. med pripadniki družine *Desulfobacteraceae* je več metilatorjev kot v družini *Desulfovibrionaceae*.

Barkay in Wagner-Döbler (2005) tudi navajata, da si raziskovalci niso edini, če je sama redukcija sulfata nujna za potek metilacije Hg ali ne, saj obstajajo dokazi tako za kot tudi proti tej domnevi. Poleg tega metilacija poteka tudi v nekaterih ekstremnih okoljih, npr. sedimentih arktičnih mokrišč. To so okolja, kjer poglavitno poteka metanogeneza in je glavni terminalni akceptor CO₂ in ne SO₄²⁻. V teh primerih gre verjetno za sintrofičen odnos, vendar so dodatne raziskave nujne za potrditev te domneve (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

2.2.1.1 Vloga SRB

Bakterijska redukcija sulfata ima zelo pomembno vlogo pri biogeokemijskih kroženjih ogljika in žvepla, saj je v anoksičnih, s sulfatom bogatih sedimentih, glavni biokemijski proces mineralizacije organskega materiala. Redukcija sulfata je v takih okoljih še pomembnejša od metanogeneze, saj so sulfatni reducenti uspešnejši pri tekmovanju za substrat (Devereux in sod., 1996).

Bakterije, ki vršijo ta proces, so sulfatni reducenti. Sodiijo med Delta proteobakterije in so razvrščene v razrede Desulfobacterales, Desulfovibrionales, Desulfurellales in Desulfuromonadales (Garrity in sod., 2001: 14). Vse vršijo disimilatorno redukcijo SO_4^{2-} do H_2S oz. S^{2-} . Razlikujejo pa se po donorjih elektronov. Ti so lahko vodik, laktat, acetat, propionat, dolgoveržne maščobne kisline, alifatski ogljikovodiki in enostavne aromatske spojine (benzoat, fenol, toluen). Poleg tega SRB vršijo še številne procese, ki so pomembni pri biogeokemijskih kroženjih mnogih elementov. Med te sodijo skloptev oksidacije vodika in organskih substratov z redukcijo nitrata, železa in kisika, disproporcionacija tiosulfata, tiosulfita in elementnega žvepla, oksidacija elementnega S, pri kateri je Mn(IV) terminalni akceptor elektronov, in redukcija urana (Devereux in sod., 1996).

Kot že rečeno, so poglavitni metilatorji Hg(II) sulfatni reducenti. Sulfidni ion, ki je končni produkt redukcije sulfata, ima pri tem zelo pomembno vlogo. Omejuje metilacijo, saj s Hg^{2+} tvori netopni živosrebrov sulfid. Benoit je s sodelavci leta 2003 ugotovil, da sta glavna substrata za metilacijo topna HgS^0 in $\text{Hg}[\text{HS}]_2^0$ (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Do podobnega zaključka o vlogi topnih nenabitih kompleksov Hg in S pri metilaciji Hg je prišel tudi King s sodelavci v študiji iz leta 2001, ki je obravnavala odstranjevanje Hg in sintezo MeHg v modelu mokrišča (King in sod., 2002).

V svoji študiji iz leta 1996 so Devereux in sodelavci (1996) z molekularnimi analizami (16s rRNA hibridizacija) ugotavljali številčnost populacije SRB v globinskem profilu estuarskega sedimenta. Podatke so primerjali z izmerjenimi nivoji metilacije Hg(II) v istih vzorcih.

Dobljeni rezultati so pokazali visoko korelacijo med številom SRB in metilacijo. Ugotovili so tudi, da je 16s rRNA hibridizacija primerna metoda za določanje distribucije SRB v sedimentih.

2.2.1.2 Mehanizmi metilacije Hg

Čeprav je v naravi večina živega srebra v elementarni obliki (Hg^0), številni biotski in abiotski procesi vodijo k nastajanju MeHg. Ta se lahko bodisi bioakumulira ali pa se preko obratnih (tudi biotskih ali abiotskih) procesov demetilira.

Splošno sprejeto je, da je najpogostejši način kontaminacije vodnih okolij z MeHg *in situ* metilacija živega srebra, ki jo vršijo sulfatni reducenti (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Na hitrost nastajanja in kopičenje metiliranega živega srebra pa vplivajo številni dejavniki. Najočitnejši, ne pa tudi edini odločilni, je koncentracija razpoložljivega substrata, torej Hg^{2+} . Gill navaja, da med te dejavnike, poleg koncentracije substrata, sodijo še koncentracija celokupnega Hg, razmerja med različnimi kemijskimi oblikami Hg, temperatura, koncentracija in dostopnost organskih spojin za sulfatne reducente, redoks potencial okolja ter hitrost bakterijske in fotokemične demetilacije (Gill, 2001). Kateri koli od naštetih dejavnikov je lahko omejujoč. Zaradi naravne nehomogenosti vodnih ekosistemov so ti dejavniki časovno in prostorsko zelo variabilni. Zato lahko znotraj istega ekosistema nastanejo številna mikrookolja, od katerih niso vsa enako ugodna za metilacijo.

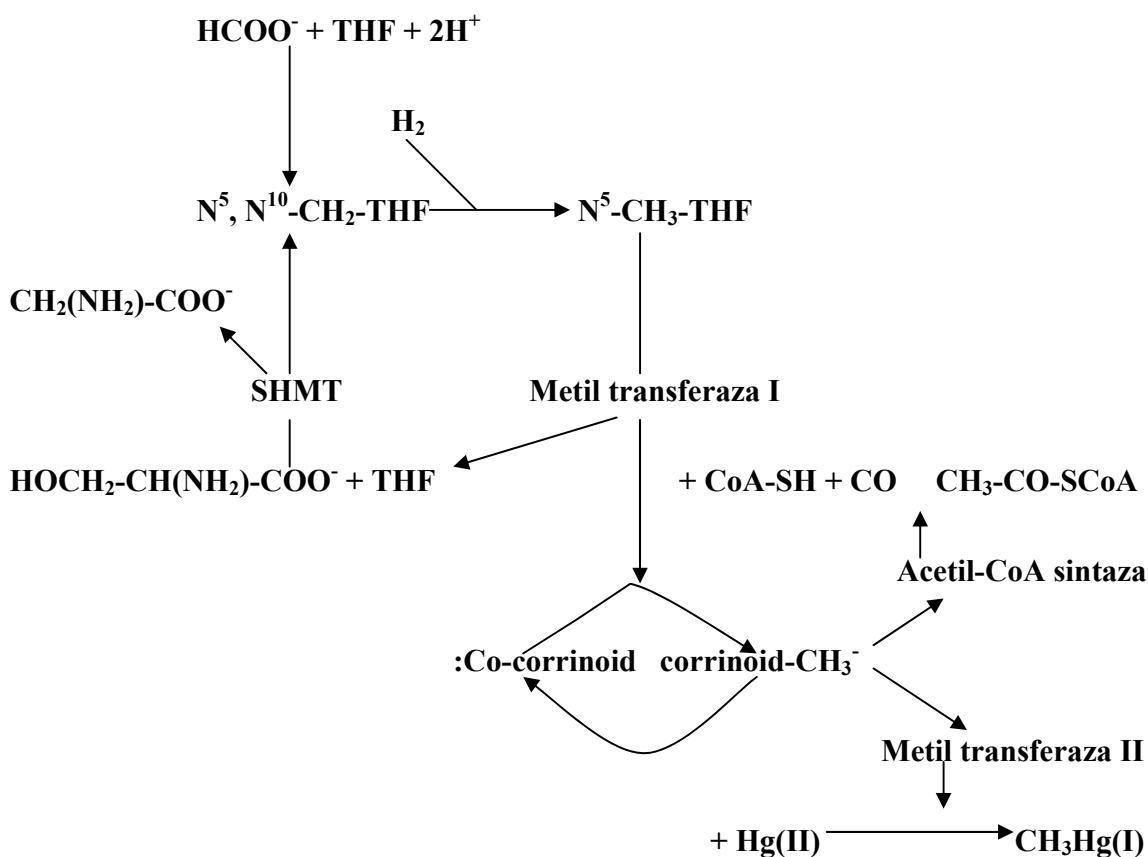
Hitrost metilacije Hg je pozitivno korelirana s hitrostjo redukcije sulfata, pada pa z naraščanjem koncentracije reduciranega žvepla. Koncentracije sulfida (S^{2-}), ki presegajo 10 μM , inhibirajo metilacijo. V takih sedimentih namreč prihaja do precipitacije netopnega HgS . Metilacijo inhibirajo tudi organske molekule, predvsem huminske in fulvinske kisline, ki delujejo kot kelatorji in vežejo živosrebrove ione (Stamenkovic in sod., 2004). Ti kompleksi so kemično zelo stabilni (Bonzongo in Donkor, 2003). Zaradi tega prisotnost velikih organskih molekul zmanjšuje biodostopnost glavnega substrata za metilacijo. Tudi višja vsebnost

železovih ionov lahko negativno vpliva na hitrost metilacije. Bakterije, ki reducirajo železo Fe^{3+} , namreč s sulfatnimi reducenti tekmujejo za vir ogljika (Stamenkovic in sod., 2004).

Metilacijo Hg v čisti kulturi vršijo številne anaerobne bakterije in arheje, v naravnih anaerobnih ekosistemih, od katerih so podrobno raziskani predvsem sedimenti, pa v glavnem sulfatni reducenti (Barkay in sod., 2003). Kljub temu, da je bakterijska metilacija Hg poznana že dolgo, danes mehanizmi le-te še niso popolnoma raziskani (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

Kot že omenjeno, je substrat za metilacijo topni HgS. Barkay in Wagner-Döbler ugotavljata, da pa lahko metilna skupina izvira iz serinskega C3 ali iz formata, ki se prenese preko acetil-CoA in metil tetrahidrofolata, čemur sledi metilacija Hg iona z encimom metil transferazo (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

Sulfatni reducenti, ki organske substrate popolnoma oksidirajo (do CO_2), vršijo metilacijo Hg po drugačni poti kot nepopolni oksidatorji (organske snovi oksidirajo do kratkoverižnih maščobnih kislin, npr. piruvata ali laktata). Pri prvih je tvorba MeHg povezana z oksidacijo acetata po poti acetil-CoA, vendar so za podrobnejše razumevanje potrebne dodatne raziskave (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).



Slika 4: Metilacija Hg(II) po poti acetil-CoA v bakteriji *Desulfovibrio desulfuricans* LS (Barkay in Wagner-Döbler, 2005, str. 6)

Abiotska sinteza MeHg še ni natančno raziskana. Poteka v okoljih, ki so bogata z organskim materialom. Domnevajo, da pri metilaciji Hg sodelujejo huminske, fulvinske in karboksilne kisline ter alkilirani kositrovi derivati, ki se med drugim uporabljajo v poljedelstvu kot fungicidi (Barkay in sod., 2003).

2.2.1.3 Mehanizmi demetilacije MeHg

Demetilacijo so prvič opisali v 70. letih 20. stoletja. Vzorcem sedimentov so dodali ^{14}C -MeHg in opazovali nastajanje produktov, $^{14}\text{CH}_4$ in Hg^0 (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Proces so

opredelili kot samočiščenje (angl. self-purification), saj poteka v istem okolju in ga vrši ista združba, ki vrši tudi metilacijo Hg. Billen in sodelavci so leta 1974 ugotovili, da je povečana hitrost demetilacije ob povečani koncentraciji MeHg povezana z bogatitvijo populacije bakterij, ki so odporne na MeHg (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

Sam proces demetilacije je zelo pomemben pri regulaciji kopičenja MeHg v okolju. Izračun razmerja med hitrostjo metilacije in demetilacije pa je orodje za ugotavljanje potenciala za akumulacijo MeHg in vpliva različnih dejavnikov na le-to v obravnavanem ekosistemu (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

Metil živo srebro se lahko demetilira po oksidativni ali reduktivni poti. Pri reduktivni demetilaciji se ogljik sprošča izključno kot CH₄, živo srebro pa kot Hg(0). Vršijo jo bakterije, ki so zaradi *mer* operona odporne na Hg stres. To pomeni, da je reduktivna demetilacija del posebnega detoksifikacijskega zaščitnega sistema, s katerim se bakterije branijo pred vplivi zelo strupenega MeHg. Pri tej poti ključno vlogo igra encim organomerkurialna liaza, ki je produkt gena *merB*. Bakterijski sistem odpornosti na Hg stres je podrobneje predstavljen v nadaljevanju.

Oksidativna demetilacija sicer še ni natančno raziskana, znano pa je, da se ogljik sprošča kot zmes CO₂ in manjših količin CH₄. Oksidativna demetilacija je posledica biokemičnih poti, povezanih z metabolizmom organskih snovi z enim ogljikovim atomom (t.i. C1 spojine) in ni neposredno vezana na odgovor mikroorganizmov na Hg stres. V tem primeru gre torej za oksidacijo metilne skupine, ki je vir ogljika in elektronov, pri tem pa se kot stranski produkt energetskega metabolizma celice sprošča Hg²⁺, ki je bistveno bolj biološko dostopen kot Hg⁰ in je tudi substrat za metilacijo.

V anoksičnih sedimentih, kjer obstajajo ugodni pogoji za metilacijo, prevladujoča oksidativna demetilacija pravzaprav ne predstavlja omejujočega dejavnika za kopičenje toksičnega MeHg, ampak, obratno, konstanten vir substrata (Hg²⁺) za njegovo nastajanje.

To spoznanje je zelo pomembno pri prizadevanjih za varovanje kritičnih ekosistemov pred prekomernim kopičenjem MeHg. Povezano pa je z natančnim poznavanjem dejavnikov, ki vplivajo na to, katera demetilacijska pot bo prevladujoča (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Dejavnika, ki po dosedanjih raziskavah najbolj vplivata na to, katera demetilacijska pot bo v nekem okolju prevladala, sta redoks potencial in koncentracija celokupnega Hg v tem okolju. Reduktivna demetilacija je pogostejša v oksičnih okoljih z višjimi koncentracijami Hg, oksidativna pa je prevladujoča v anoksičnih in s Hg manj obremenjenih okoljih.

Raziskava Jelene Stamenkovic in sodelavcev (Stamenkovic in sod., 2004), je pokazala, da v sladkovodnih sedimentih nekateri dejavniki, ki na metilacijo zelo vplivajo, kot so koncentracija MeHg, hitrost pretvorb žvepla, vsebnost raztopljenega organskega ogljika (DOC) in velikost delcev v sedimentu, ne vplivajo na hitrost demetilacije.

Abiotska demetilacija poteka počasneje in v manjši meri kot biotska. Kljub temu pa Sellers in sodelavci ugotavljajo, da v dobro osvetljenih okoljih z nizkimi koncentracijami celokupnega Hg, abiotska demetilacija prevladuje nad biotsko (Barkay in Wagner-Döbler, 2005, cit. po Sellers in sod., 1996). Pri abiotski demetilaciji ima svetloba ključno vlogo, zlasti vidna svetloba valovne dolžine od 280 do 800 nm ter UVA in UVB žarki. Pri tovrstni demetilaciji se Hg deloma sprošča kot Hg^0 , deloma pa kot Hg^{2+} . Za s Hg močno obremenjena in slabo osvetljena okolja pa velja, da prevladuje biotska demetilacija. (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

2.2.2 Odpornost na Hg stres

Wood je leta 1984 objavil razpravo o šestih poglavitnih mikrobnih mehanizmih za zaščito pred Hg stresom (Wood, 1984, cit. po Boening, 2000). Gre za biokemijske zaščitne sisteme, preko katerih bakterije preprečujejo toksične učinke živosrebrovega iona.

V splošnem ti sistemi zajemajo:

- proteinske črpalke, ki aktivno odstranjujejo Hg^{2+} iz celice,
- encime, ki reducirajo Hg^{2+} v manj biodostopno in manj toksično elementno obliko Hg^0 ,
- proteinske oz. encimske polimere, ki služijo kot kelatorji,
- proteinske receptorje na celični površini, ki vežejo Hg^{2+} in tako preprečujejo njegov vstop v celico,
- sisteme, ki omogočajo tvorbo in precipitacijo netopnih Hg sulfidov ali oksidov na celični površini ali v citoplazmi,
- metilacijo in izločanje MeHg v okolje z difuzijo.

2.2.2.1 Odpornost in redukcija Hg(II) pri bakterijah, ki nimajo operona *mer*

Raziskave so pokazale, da so na Hg stres odporne tudi bakterije, ki sicer ne vsebujejo operona *mer*. Gre za sisteme razstrupljanja, ki ne vključujejo redukcije Hg^{2+} do Hg^0 . Med te sisteme sodijo zmanjšan vnos Hg^{2+} zaradi zmanjšanja prepustnosti celične membrane za ta ion, kopičenje MeHg znotraj celice v posebnih veziklih in demetilacija MeHg, pri kateri se Hg^{2+} takoj veže z žveplom v netopni živosrebrov sulfid in precipitira (Nascimento in Chartone – Souza, 2003).

Redukcijo Hg(II) do Hg(0) vršijo tudi številni acidofilni tiobacili, ki oksidirajo Fe(II). Sugio in sodelavci so leta 2001 objavili, da imajo pri bakteriji *Acidithiobacillus ferrooxidans* v tej reakciji poglavitno vlogo citokrom c oksidaze, leta 2003 pa dokazali, da gre pravzaprav za zadnjo stopnjo dihalne verige, pri kateri se sicer elektroni prenašajo iz Fe^{2+} na kisik. Takšna redukcija živosrebrovega iona sicer omogoča deset do stokrat manjšo toleranco na Hg stres,

kot jo omogoča sistem *mer*, vendar je njeno poznavanje pomembno za razvoj bioremediacijskih metod (Sugio in sod., 2001).

2.2.2.2 Operon *mer* in bakterijska rezistenca na Hg stres

Sistem odpornosti bakterij na živo srebro in njegove organske derivate je razširjen med številnimi Gram pozitivnimi in Gram negativnimi bakterijami, ki naseljujejo številna različna okolja (Nascimento in Chartone – Souza, 2003). V preteklega pol stoletja, pa tudi danes, je predmet številnih biokemijskih, genetskih in mikrobno-ekoloških študij.

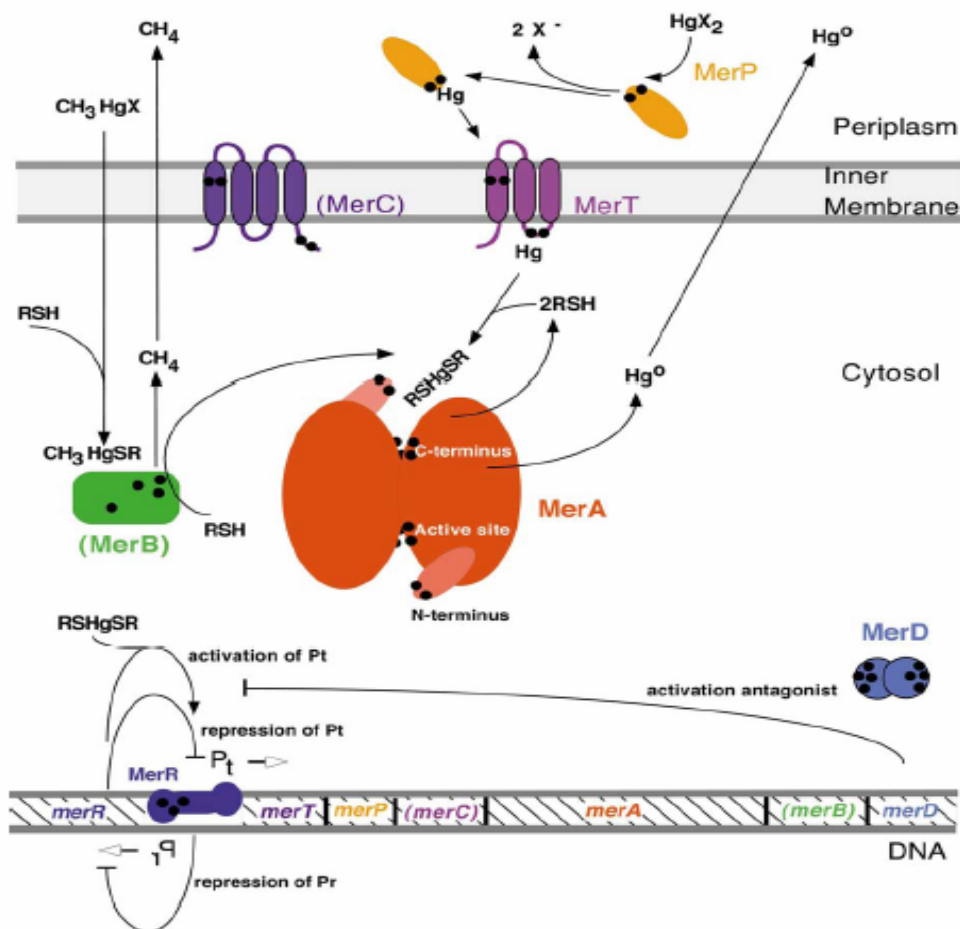
Odkrili so ga leta 1978 v povezavi z začetnimi raziskavami demetilacije MeHg (Barkay in sod., 2003) in odpornosti nekaterih sevov na antibiotike, ki vsebujejo živo srebro (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Danes se preučuje predvsem njegovo vlogo v naravnih ekosistemih in potencialno izkoriščanje za bioremediacijo in biomonitoring s Hg onesnaženih območij ter kot modelni sistem horizontalnih genskih prenosov in metabolizma redoks-aktivnih tiofilnih kovin (Barkay in sod., 2003). To so kovine, ki se z veliko afiniteto vežejo na žveplo.

Nekatere bakterije so sposobne detoksifikacije tako anorganskih kot tudi organskih derivatov Hg. To je t.i. Hg rezistenca širokega spektra. Hg rezistenca ozkega spektra pa pomeni zmožnost detoksifikacije le anorganskih oblik Hg, torej elementnega živega srebra in živosrebovih soli, npr. HgCl_2 (Nascimento in Chartone – Souza, 2003). Osnovni princip rezistence na Hg stres je encimska redukcija Hg^{2+} do Hg^0 . S tem se strupen in bakterijam dostopen živosrebrov ion odstrani iz okolja. Hg^0 je namreč slabše topen v vodnih medijih, zaradi česar je manj biodostopen. Ker je zelo hlapen, se hitro odstrani iz vodnega medija. Zaradi slabe topnosti in hlapnosti je posledično manj škodljiv (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Pri Hg rezistenci širokega spektra dodaten encim najprej odcepi organski del molekule in s tem sprosti Hg^{2+} . Temu potem sledi redukcija do Hg^0 z reduktazo živosrebovega iona. Geni, ki kodirajo sistem odpornosti na živo srebro, tvorijo operon *mer*. Nahajajo se na zelo variabilnih mestih znotraj celičnega genoma - kromosomih, plazmidih in transpozonih,

pogosto so podvojeni, posamezni deli pa se nahajajo znotraj različnih replikonov (Barkay in sod., 2003).

Barkay in sodelavci (2003) navajajo, da produkti genov, ki so del operona *mer*, vršijo tri funkcije: regulacijo, transport in redukcijo. Glavna gena celotnega odpornostnega sistema sta *merA*, ki kodira reduktazo živosrebrovega iona, in *merR*, ki nosi zapis za regulatorski protein. Pojavljata se v obliki različnih paralogov s sorodnimi, a samostojnimi funkcijami (Barkay in sod., 2003).

Indukcija operona *mer* je značilen primer preobčutljivostnega odgovora (angl. hypersensitive response). Aktivnost promoterske regije se poveča za 10 do 90%, ko koncentracija Hg(II) doseže indukcijsko vrednost. Golding in Kelly sta v ločenih raziskavah v letih 2002 in 2003 ugotovila, da gre za izjemno nizke, subpikomolarne koncentracije (Golding in sod., 2002; Kelly in sod., 2003).



Slika 5: Model sistema odpornosti na Hg pri Gram negativnih bakterijah. Na sliki X predstavlja nukleofilno molekulo, RSH pa nizkomolekularni citosolni tiolni pufer. Cisteinski ostanki na encimih so predstavljeni s črnimi pikami (Barkay in sod., 2003, str. 360).

Regulacijo vrši produkt gena *merR*, ki se prepisuje ločeno od strukturnih *mer* genov. MerR je metaloregulatorni protein, ki se veže na promotersko regijo operona, in vrši tako pozitivno (indukcija) kot negativno (represija) regulacijo izražanja strukturnih genov. Z vezavo Hg^{2+} ionov se spremeni njegova tridimenzionalna struktura tako, da se prilega na promotor operona in ga aktivira (Nascimento in Chartone – Souza, 2003).

Transport Hg^{2+} v celico vršita produkta genov *merT* in *merP*, pri nekaterih bakterijah je prisoten še dodatni gen, *merC*. MerP je periplazmatski protein, ki veže živosrebrove ione. Za

transport preko notranje membrane skrbita membranska proteina MerT in MerC. Operon *mer* pri Gram pozitivnih bakterijah ne vsebuje gena *merP*, vnos živosrebrovega iona v celico v celoti vrši MerT (Barkay in sod., 2003).

Za samo razstrupljanje sta odgovorna gena *merA* in (samo pri rezistenci širokega spektra) *merB*. Živosrebrova reduktaza, ki reducira Hg^{2+} v Hg^0 , je produkt gena *merA*. Je inducibilni encim, od FAD odvisna oksidoreduktaza, katere aktivnost je vezana na NADPH in sulfhidril (SH^-) (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Je znotrajcelični flavoprotein, ki ga aktivirajo za celični metabolizem subinhibitorne koncentracije Hg^{2+} ali organskih Hg derivatov (Nascimento in Chartone – Souza, 2003).

Produkt gena *merB* je organomerkurialna liaza. Je monomerni encim brez kofaktorjev. Cepi vez med Hg in organskim radikalom in tako »proizvaja« Hg^{2+} , ki ga MerA reducira. Barkay in sodelavci navajajo, da ima zelo nizko substratno specifičnost (Barkay in sod., 2003). To pomeni, da se veže na številne organske alifatne in aromatske derivate Hg in odceplja zelo različne organske radikale, vendar zelo počasi.

Represijo operona *mer* vrši produkt gena *MerD*. Ko koncentracije Hg(II) v celici padejo pod indukcijsko vrednost, ta protein odstranjuje MerR-Hg kompleks s promoterske regije operona. Tako omogoči vezavo proteina MerR, ki potem inaktivira promotor in prepreči prepisovanje genov operona *mer* (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

2.2.3 Uporaba bakterij, odpornih na Hg, za remediacijo kontaminiranih okolij

V splošnem velja, da se ob vnosu katere koli strupene snovi v nek ekosistem biodiverziteta tega ekosistema zmanjša. Zmanjšanje biodiverzitete in številčnosti populacij tako mikro- kot tudi makroskopskih organizmov je prva in najbolj izrazita posledica kontaminacije. S časom pa se populacije prilagodijo na obstoječi stres. Zaradi tega se biodiverziteta prizadetega ekosistema ponovno poveča, struktura biološke združbe pa se spremeni, saj začnejo

prevladovati organizmi, ki so tolerantni ali celo odporni na stres. Ti ekološki principi veljajo tudi za okolja, kontaminirana s Hg oz. MeHg.

Barkay in Wagner-Döbler (2005) ugotavljata, da je pestra in na Hg stres odporna mikrobná združba nujna za učinkovito kroženje tega elementa.

Intenzivne raziskave vročih točk (angl. hot spots) za metilacijo, med katerimi izjemno pomembno mesto zasedajo anoksični morski sedimenti, so med drugim usmerjene tudi v ugotavljanje vplivov biodiverzitete in razširjenosti operona *mer* na intenzivnost metilacije Hg. Ta znanja bi omogočila uporabo naravnih rezistentnih sevov in genetsko spremenjenih (kloniranih) laboratorijskih sevov za bioremediacijo kontaminiranih območij (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Za večino bioloških (bakterijskih) čistilnih procesov namreč velja, da so cenovno ugodnejši, tehnološko enostavnejši in energetsko varčnejši od drugih tehnologij. To velja tudi za odstranjevanje Hg iz kontaminiranih voda ali tal s pomočjo bakterij. Glavna ovira za uporabo tovrstnih bioloških čistilnih sistemov je odlaganje velikih količin s Hg močno obremenjene biomase, ki pri tem nastaja (King in sod., 2002).

Danes je v fazi razvoja več alternativnih bioreaktorskih čistilnih naprav, v uporabi pa je le en tak sistem, t.i. packed-bed bioreaktor. Gre za čistilno napravo za industrijske odpadne vode, ki sestoji iz reaktorja, v katerem je biomasa v obliki biofilma imobilizirana na inertne nosilce. Biomasa sestavlja različne na Hg stres odporne bakterije, ki reducirajo živosrebrov ion v elementno živo srebro. To zaradi slabe topnosti v vodnem mediju precipitira na dno bioreaktorja v obliki kapljic. Kontaminirana odpadna voda se v takem reaktorju zadržuje 15 – 60 minut, med tem pa se vsebnost živega srebra opazno zmanjša in doseže vsebnost Hg okoli 50 µg/L (topnost elementnega živega srebra v vodi znaša 35 – 60 µg/L), neodvisno od začetne koncentracija, če ta ne preseže 10 mg/L. Precipitirano živo srebro se po destilaciji lahko ponovno uporabi (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

In situ bioremediacija kontaminiranih območij je bistveno zahtevnejši proces. Uporaba umetno ustvarjenih mokriščnih ekosistemov za odstranjevanje kovin iz odpadnih vod je dobro

dokumentirana, vendar je bilo malo znanega o možnostih uporabe za odstranjevanje nižjih koncentracij Hg(II).

Študija Kinga in sodelavcev iz leta 2001 (King in sod., 2002) je preučevala možnost odstranjevanja tudi nižjih koncentracij živega srebra (parts per trillion) iz odpadnih vod. To je postalo v ZDA predmet razprave, ko so rezultati toksikoloških raziskav na ljudeh pokazali potrebo po znižanju dovoljenih koncentracij živega srebra v ribah in vodah. Zakonska poostreitev kriterijev in okrepljena zavest o zmanjševanju onesnaževanja sta pripomogli k raziskovanju uporabe umetnih mokrišč za odstranjevanje Hg iz odpadnih vod. Ta metoda je cenovno sprejemljivejša od tehnološko zahtevne ionske izmenjave in drugih metod, pri tem pa je potrebno upoštevati, da ravno v sedimentih mokrišč poteka metilacija Hg. Potrebno bi bilo torej ugotoviti, na kakšen način optimizirati precipitacijo Hg iz odpadnih vod in istočasno minimizirati sintezo strupenega MeHg (King in sod., 2002), po možnosti z učinkovito kontrolo oz. pospeševanjem reduktivne demetilacije (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

2.3 ŽIVO SREBRO V SISTEMU IDRJICA-SOČA-TRŽAŠKI ZALIV

Rudišče v Idriji tudi po petstoletnem izkoriščanju ni popolnoma izčrpano, zato še danes vpliva na Idrijco, Sočo in Tržaški zaliv (Hines in sod., 2000). Razumevanje dinamike vnosa živega srebra v reko in njegovih biogeokemijskih pretvorb vzdolž tega vodnega sistema lahko znatno pripomore k razvoju učinkovitih bioremediacijskih metod. Rečni tok v tem sistemu namreč prenaša Hg tudi več kot 100 km daleč in s tem vplivno območje kontaminanta zelo razširi. Ta transport pomeni tudi remobilizacijo Hg in sedimentacijo daleč od prvotnega izvora, kar omogoča metilacijo v za to ugodnih okoljih, ki sicer niso v bližini primarnega vira Hg. Primer takšnega okolja so morski sedimenti v Tržaškem zalivu. To so torej okolja, ki so lahko zelo daleč od primarnega izvora polutanta, postanejo pa sekundarni izvori toksičnih oblik Hg (Hines in sod., 2000).

Številne raziskave omenjenega rečnega sistema so pokazale, da je Hg zelo neenakomerno razporejen vzdolž rečnega toka, kar je verjetno povezano z različnimi pretoki in sedimentacijo

na različnih mestih (Hines in sod., 2004). Gosar in sodelavci (1997) ugotavljajo, da se vsebnost Hg v sedimentih Idrijce spreminja vzdolž toka. Nad rudnikom so izmerili koncentracije 2 mg Hg/kg sedimenta, v okolici Spodnje Idrije, ki se nahaja nekaj kilometrov niže od rudnika pa med 100 in 1000 mg Hg/kg. Z oddaljevanjem od primarnega izvora kontaminacije (rudnik) so izmerjene koncentracije sicer nekoliko upadle, vendar so bile še vedno visoke – med 100 in 200 mg/kg sedimenta. Tako tudi ta študija nesporno ugotavlja, da je rudarjenje zelo vplivalo na mobilizacijo živega srebra iz matične kamnine (Gosar in sod., 1997).

Hines je s sodelavci izvedel multidisciplinarno študijo o biogeokemijskih pretvorbah Hg v Idrijci, Soči in Tržaškem zalivu (Hines in sod., 2000). Meritev vsebnosti Hg_{tot} in MeHg so opravili na 13 vzorcih vod, ki so jih odvzeli vzdolž rek in v zalivu, od tega enega nad rudnikom oz. pred primarnim izvorom kontaminacije, ter na 3 vzorcih sedimenta v zalivu.

Za ugotavljanje vloge živih organizmov pri pretvorbah Hg so izvedli tudi molekularno študijo za detekcijo *mer* genov, analizo mikrobne aktivnosti in analizo populacije bentoških nevretenčarjev. Za molekularno analizo so vzorce vode filtrirali skozi filter s premerom por 0,22 μm in zamrznili na $-70^{\circ}C$, nukleinske kisline pa so nato izolirali z vročo lizo celic. Gena *merA* in *merB* ter 16s rDNA so pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), dobljene pomnožke pa ločili z elektroforezo v agaroznem gelu.

Bentoške nevretenčarje so vzorčili na več mestih vzdolž Idrijce in njenega pritoka Bače, nato so v laboratoriju opravili taksonomske analize. Za analize mikrobne metilacije Hg in demetilacije MeHg v sedimentu Tržaškega zaliva so vzorcem dodali radioaktivno označen substrat $^{203}HgCl_2$ za metilacijo in $^{14}CH_3HgI$ za demetilacijo in jih inkubirali. Meritve so izvedli s scintilacijskim števcem. Poleg opisanih analiz so izmerili še alkalnost vzorcev ter koncentracije Fe , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , C_{org} in C , N in S trdne faze.

Pri nefiltriranih vzorcih je primerjava rezultatov meritev Hg_{tot} med vzorčnim mestom pred rudnikom in po njem pokazala dramatično, stokratno zvišanje koncentracije (od <3 ng/L na >300 ng/L). Koncentracija Hg_{tot} v Idrijci pred rudnikom je bila zelo nizka, podobna rezultatom

nekontaminiranih vod, torej je nesporno, da je glavni vir kontaminacije rudnik Hg v Idriji. Po izlivu Idrijce v Sočo so se koncentracije zaradi razredčenja pričakovano znižale (6 ng/L), s posameznimi opaznimi povišanji na mestih umirjenega pretoka in večje sedimentacije (zajezitve, estuar). Ti izsledki potrjujejo že poznano dejstvo, da so mesta umirjenega pretoka, kjer prihaja do sedimentacije in kopičenja organskega materiala, tudi mesta intenzivnejše mobilizacije Hg. V vzorcih iz zaliva so visoko koncentracijo Hg_{tot} izmerili le v pridneni vodi v bližini izliva Soče, z oddaljenostjo od obale so se izmerjene koncentracije Hg zmanjšale, najverjetneje kot posledica razredčenja.

Gibanje koncentracij MeHg po vzorčnih mestih je bilo podobno kot pri Hg_{tot} . Tudi v tem primeru so se koncentracije po izlivu Idrijce v Sočo znižale, povišanja so opazili v zajezitvah in estuarju. Zelo povišano koncentracijo pa so izmerili v zalivu v bližini estuarja. Razmerje med Hg_{tot} in MeHg je bilo v vseh vzorcih nizko, kar je značilno za vodne sisteme, se pa je povečevalo vzdolž toka.

Raztopljeno živo srebro je v vodah Idrijce predstavljalo 18%, Soče 30% in v pridnenih vodah sredine zaliva 70% Hg_{tot} . V zalivski vodi v bližini estuarja pa manj kot 1%. V tem vzorcu je bil Hg vezan na partikulatni material, zato so sklepali, da je pri odvzemu vzorca prišlo do resuspenzije sedimenta.

Molekularna analiza *mer* genov je pokazala na bogatitev populacije Hg rezistentnih bakterij vzdolž toka od rudnika navzdol. Prisotnosti *mer* genov v vzorcu, odvzetem v Idrijci pred rudnikom, niso ugotovili.

Pri preučevanju bentoških nevretenčarjev so ugotovili, da imajo mesta s povišanimi koncentracijami Hg manjšo pestrost z enim očitno prevladujočim taksonom in tudi manjše skupno število organizmov, za razliko od mest, ki niso izpostavljena Hg stresu. Ta mesta naseljuje bolj pestra in številčnejša populacija, različni taksoni pa so enakomerno zastopani. Torej drži, da ima rudarjenje opazne posledice na življenje v reki.

Metilacijo Hg in demetilacijo MeHg so ugotovili v vseh vzorcih sedimenta iz zaliva. Raven metilacije je bila podobna v vseh vzorcih in je v splošnem padala z globino, maksimum pa so izmerili v sloju na globini 1,5-3 cm.

Za demetilacijo so izmerili podobne globinske profile kot za metilacijo, le da je potekala približno petkrat hitreje od le-te. Ugotovili so, da povečini poteka oksidativna demetilacija, 90% označenega C so izmerili kot $^{14}\text{CO}_2$. Reduktivna demetilacija (do CH_4) pa je intenzivneje potekala v globljih slojih, kjer ni razpoložljivega O_2 .

V pričujoči raziskavi so ugotovili, da je idrijski rudnik nedvomno glavni vir kontaminacije rek in Tržaškega zaliva s Hg, kljub temu pa so glavni vir toksičnega MeHg fizikalno-kemijski in biološki procesi v reki Soči in priobalnem morju. Živo srebro, ki se izpira iz rudišča, pa zelo vpliva na življenje v Idrijci, Soči in Tržaškem zalivu.

Raziskava, v kateri so Hines in sodelavci proučevali metilacijo in demetilacijo Hg vzdolž rečnega sistema Idrijca – Soča – Tržaški zaliv (Hines in sod., 2004), je pokazala, da koncentracije tako Hg_{tot} kot tudi MeHg opazno naraščajo vzdolž tega sistema, kar kaže na velik pomen rečnega toka za transport kontaminanta. Izrazita povišanja so zaznali v vzorcih sedimentov in obrežnih tal tudi po več deset kilometrov stran od primarnega vira kontaminacije, posebno ob območjih mirnejšega srednjega toka in v estuarju Soče. Za ta območja je značilna sedimentacija delcev in visoka mikrobna aktivnost v sedimentih.

Zmožnost metilacije Hg v vzorcih so merili z dodatkom ^{203}Hg , demetilacije pa z dodatkom ^{14}C -MeHg ter merjenjem nastajajočih ustreznih produktov (Me^{203}Hg ter $^{14}\text{CO}_2$ in $^{14}\text{CH}_4$). Opravili so tudi meritve vsebnosti Hg, MeHg, nutrientov in nekaterih ionov v pornih vodah in trdni fazi vseh vzorcev.

Z analizo vzorcev so ugotovili, da ima vsak od obravnavanih habitatov potencial za pretvorbe Hg. V obrežnih tleh je demetilacija potekala hitreje od metilacije (k_{dem} 0,9-5,5% dan^{-1} , k_{met} 0-0,6% dan^{-1}), končni produkt pa je bil metan. To pomeni, da bakterije v tleh vršijo demetilacijo

z encimom organomerkurialno liazo. Rečni sedimenti, odvzeti za jezom, imajo velik potencial tako za demetilacijo kot tudi za metilacijo. Neto metilacijo so izmerili le v vrhnjih slojih sedimenta, v katerih so izmerili tudi najvišjo koncentracijo raztopljenih Hg in MeHg.

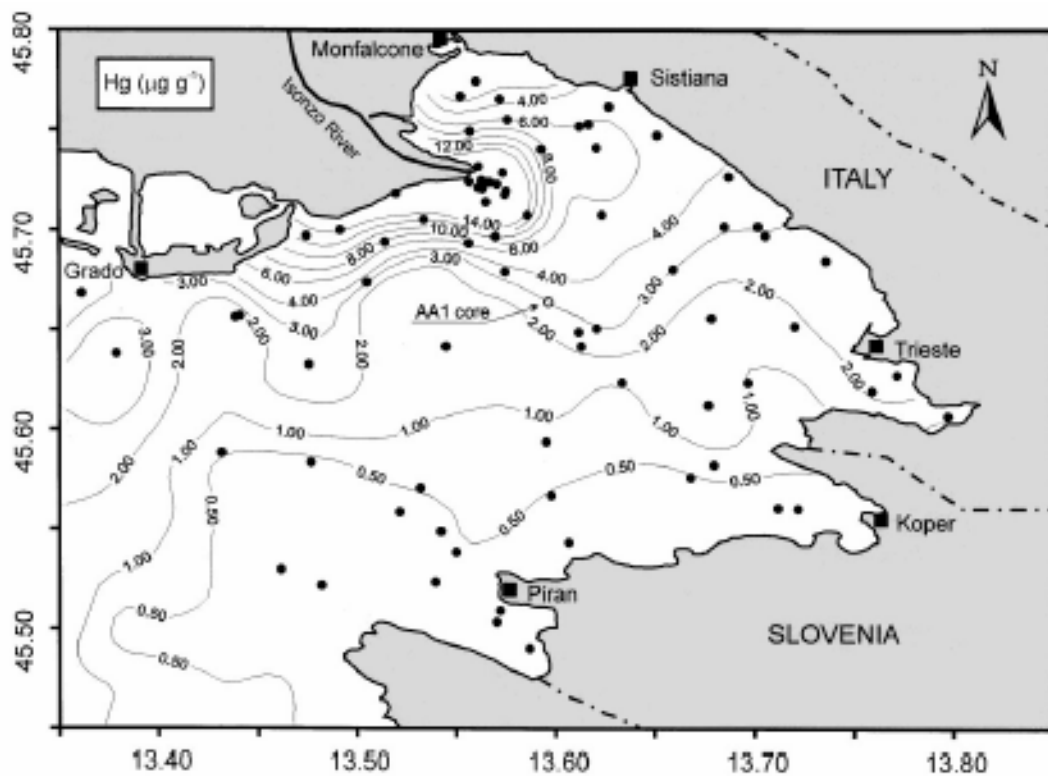
Tudi demetilacija je aktivno potekala, pri kateri se je v zgornjem sloju sedimenta več kot 60% ogljika sprostil v obliki metana, na globini 10 cm pa je metan predstavljal le še približno 10% produkcije. Ti izsledki so nakazali, da se vpliv dejavnikov, ki pogojujejo reduktivno demetilacijo, zmanjšuje z globino.

V estuarju so izmerili višje nivoje metilacije z maksimumom v vrhnjem sloju sedimenta, neposredno pod mejo sediment-voda. Razmerje med hitrostjo metilacije in demetilacije je bilo v estuarskih sedimentih dvakrat večje kot v rečnih. Demetilacija je bila tu v celoti oksidativna (sproščanje izključno CO_2). Porne vode estuarskih sedimentov so vsebovale do 600 ng/L raztopljenega celokupnega Hg, kar predstavlja deset do dvajsetkrat višje koncentracije kot v pornih vodah rečnih sedimentov. Estuarijske porne vode so vsebovale tudi petkrat več MeHg in višje koncentracije SO_4^{2-} . Koncentracije le-tega so v teh vzorcih padale, kar kaže na prisotnost sulfatnih reducentov, ki so vršilci tako metilacije kot demetilacije.

Ne glede na to, da je primarni izvor Hg točkovni (rudnik v Idriji), je kontaminirani material zaradi depozicije prisoten vzdolž celotnega rečnega sistema. Zaradi tega tvorijo Idrijca, Soča in Tržaški zaliv dinamičen sistem, v katerem, več kot 100 km od izvora, prihaja do tvorbe in kroženja MeHg.

2.4 ŽIVO SREBRO V SEDIMENTIH TRŽAŠKEGA ZALIVA

V sedimentu Tržaškega zaliva se koncentracije celokupnega Hg gibljejo med 0,064 in 30,38 $\mu\text{g/g}$, s povprečno vrednostjo 5,04 $\mu\text{g/g}$. Te koncentracije uvrščajo Tržaški zaliv med s Hg najbolj onesnažene morske bazene na svetu (Covelli in sod., 2001). Razporeditev je zelo neenakomerna, v splošnem velja, da koncentracije Hg v sedimentu z oddaljenostjo od izliva Soče močno padajo, kot je prikazano na sliki 6.



Slika 6: Koncentracije Hg_{tot} v sedimentih Tržaškega zaliva (Covelli in sod., 2001; str. 546)

Koncentracije MeHg v vzorcih morskega sedimenta se z oddaljenostjo od rečnega ustja zmanjšujejo, nivo metilacije in demetilacije v sedimentu pa pada z globino. Hines in sodelavci (2004) ugotavljajo, da je demetilacija v sedimentu Tržaškega zaliva pretežno oksidativna, le v zimskem času so izmerili nekaj produkcije CH_4 v vrhnjem sloju sedimenta, kar je mogoče pripisati povečanemu izražanju *mer* genov.

2.5 MINERALIZACIJA ORGANSKE SNOVI V SEDIMENTU TRŽAŠKEGA ZALIVA

Sedimentacija in razgradnja organskega materiala v morjih predstavlja pomemben del globalnega biogeokemijskega kroženja ogljika, pa tudi ostalih biogenih makroelementov - vodika, kisika, dušika in žvepla (Emerson in Hedges, 1988, cit. po Čermelj in sod., 2001).

Rizzo navaja, da se v plitvih priobalnih morskih bazenih, kjer eufotična cona sega do dna, na površini sedimenta kopičijo velike količine lahko razgradljivega organskega materiala (Rizzo in sod., 1990). Pri razgradnji tega materiala ima zelo pomembno vlogo količina razpoložljivega kisika. Aerobna razgradnja poteka tako na meji sediment – voda, kot tudi globlje v sedimentu. S kisikom bogata voda z difuzijo prodira nekaj milimetrov v sediment, bioturbacija, ki jo vrši bentoška fauna, pa omogoča oksigenacijo tudi globljih slojev sedimenta.

Tržaški zaliv je primer zgoraj opisanega morskega bazena. Gre za plitev priobalni morski bazen. Za sediment je značilna visoka vsebnost karbonatov, velik vnos organskega materiala in intenzivna bioturbacija. Ta lahko zelo vpliva na poti mineralizacije organskega materiala, saj spreminja redoks potencial sedimenta z dovajanjem sveže oksigenirane vode v globlje sloje (Čermelj in sod., 2001). Svetloba prodre do dna, zato uspevajo bentoške mikroalge (predvsem diatomeje), vendar ugotavljajo, da je poraba kisika pri dnu večja od bentoške primarne produkcije (Čermelj in sod., 2001). Zato imajo pri razgradnji organskih snovi zelo pomembno vlogo anaerobne metabolne poti z alternativnimi akceptorji elektronov (Hines in sod., 1997). Hines in sodelavci (1997) tudi ugotavljajo, da se večina kisika v sedimentu Tržaškega zaliva porabi za reoksidacijo reduciranih kemijskih zvrsti in ne za aerobno razgradnjo organskih snovi.

Čermelj in sodelavci (2001) so analizirali mineralizacijo v sedimentu Tržaškega zaliva. Izmerili so produkcijo raztopljenega anorganskega ogljika oz. DIC (angl. dissolved inorganic carbon), NH_4^+ , PO_4^{3-} in raztopljenega silicija (dSi) ter porabo SO_4^{2-} . Na podlagi dobljenih rezultatov so izrisali globinske profile mineralizacije. Ti profili so pokazali eksponentno padanje produkcije teh snovi in redukcije sulfata, kar pomeni, da je mineralizacija organskega

materiala najintenzivnejša v zgornjem sloju sedimenta in z globino pada (Čermelj in sod., 2001).

Najpomembnejšo informacijo o mineralizaciji oz. razgradnji organskega materiala v sedimentu dajo meritve DIC, saj je v organskih molekulah ravno ogljik najbolj zastopan kemijski element. Ker pa so sedimenti v Tržaškem zalivu bogati s karbonati, naraščanja koncentracij raztopljenega DIC ne moremo *a priori* neposredno povezati z razgradnjo organskih snovi. Na vsebnost DIC namreč vplivajo tudi precipitacija in raztapljanje karbonatov (Ogrinc in sod., 2003). Izvor ogljika v DIC lahko ugotovimo z merjenjem vsebnosti ^{13}C . Izotopska sestava ogljika v organskih snoveh se namreč razlikuje od anorganskih (Ogrinc in sod., 2003). Meritev $\delta^{13}\text{C}\text{-DIC}$ nam torej lahko poda informacijo o tem, kolikšen del DIC izvira iz raztapljanja karbonatov in kolikšen iz mineralizacije organskih snovi. Sayles in Curry navajata, da vsebuje iz karbonatov izvirajoči DIC več ^{13}C kot tisti, ki izvira iz organskega materiala (Sayles in Curry, 1988, cit. po Ogrinc in sod., 2003).

Ogrinc in sodelavci navajajo, da meritve $\delta^{13}\text{C}$ kažejo, da v Tržaškem zalivu glavnina v bentosu proizvedenega DIC izvira iz mineralizacije organskih snovi (Ogrinc in sod., 2003). V navedeni raziskavi so ugotavljali izotopsko sestavo bentoškega DIC, s pomočjo katere so skušali opredeliti, kateri procesi vplivajo na produkcijo DIC oz. na mineralizacijo organskega materiala. Ugotovili so, da približno 2/3 DIC nastaja s sulfatnim dihanjem oz. z mikrobo redukcijo sulfata, 2/3 kisika v sedimentu pa se porabi za reoksidacijo nastalega sulfida v sulfat (Ogrinc in sod., 2003).

Sezonska nihanja temperature vode zelo vplivajo na razmere na meji sediment - voda. Ogrinc in sodelavci navajajo, da so pozno poleti, ko je temperatura pri dnu najvišja, izmerili največjo porabo O_2 in največjo produkcijo DIC. Meritve vsebnosti $^{13}\text{C}\text{-DIC}$ so pokazale, da v tem času kar 11% DIC izvira iz karbonatov. Intenzivnejše raztapljanje karbonatov povzroča povečana vsebnost kislin, ki se sproščajo kot odpadni produkti anaerobnega metabolizma lahko razgradljivih organskih molekul (Ogrinc in sod., 2003). Na podlagi izmerjenih bentoških tokov DIC in C_{org} so izračunali, da se v zalivu reciklira 90% ogljika. Bentoške pretvorbe ogljika so

torej posledica oksične, suboksične in anoksične razgradnje organskega materiala, raztapljanja karbonatov in primarne produkcije bentoških mikroalg (Čermelj in sod., 2001, Ogrinc in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ZNAČILNOSTI GRADEŠKE LAGUNE

Gradeška laguna (ital. Laguna di Grado) je dobila ime po mestu Gradež (ital. Grado) in leži v severovzhodni italijanski pokrajini Furlaniji Julijski krajini (ital. Friuli - Venezia Giulia). Nahaja se v skrajnem zahodnem delu Tržaškega zaliva in je del večjega sistema lagun in plitvin ob severozahodni obali Jadranskega morja, ki ga na zahodu omejuje mesto Ravenna, na vzhodu pa deltasti izliv reke Soče (Brambati, 1996: 13). Skupaj s sosednjo Maransko laguno (ital. Laguna di Marano) obsega 160 km² površine. Razdelitev na Maransko in Gradeško laguno je zgolj administrativne narave, saj gre v bistvu za enoten lagunarni sistem.



Slika 7: Satelitski posnetek Gradeške lagune (Grado, 2006)

Laguni sta ovalne oblike in potekata vzporedno z linijo obale, skupaj sta dolgi 32 in široki približno 5 km. Zanju je značilna razčlenjena mreža otočkov, plitvin in kanalov, morska voda

vteka skozi 6 ustij (ital. bocche lagunari), na podlagi katerih lahko laguni delimo na 6 bazenov. Sta zelo mladi po nastanku, prvi zametki današnjega lagunarnega sistema so nastali okoli leta 500 n. š., ko je morje počasi začelo poplavlјati zaledje mesta Gradež (Grado) (Brambati, 1996: 14, 15).



Slika 8: Pogled na Gradeško laguno (Laguna di Grado, 2004)

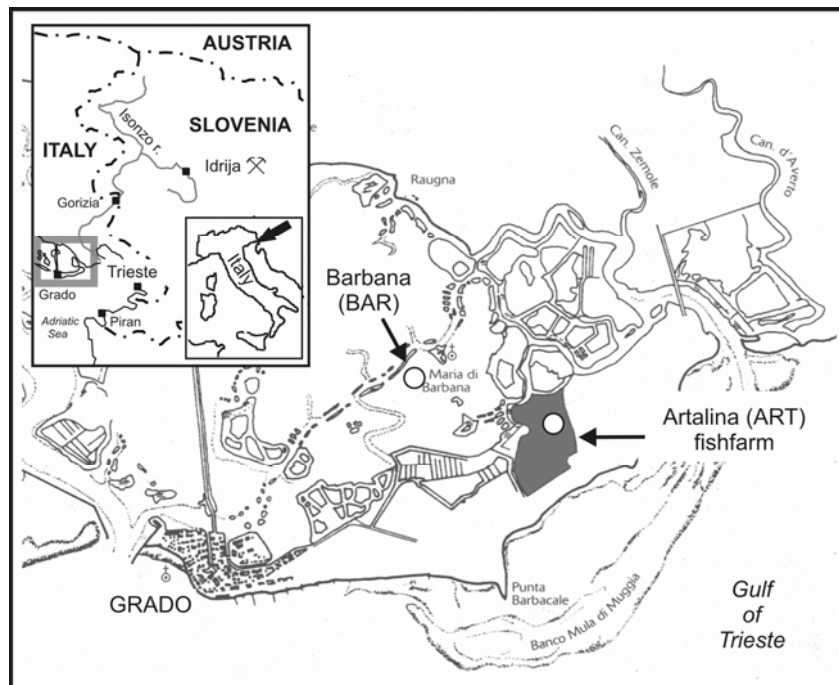
Samo Gradeško laguno na zahodu omejuje izliv reke Tilment (Tagliamento), na vzhodu pa rokavi delte reke Soče (Isonzo). Reki predstavljata tudi glavna vira sladke vode in sedimentnega materiala, predvsem silta in peska. Zaledje lagune je gosto prepleteno z rekami, potoki in kanali. Ti vodotoki zelo tesno povezujejo laguno s kopnim. Voda v laguni je morska, vendar vodotoki, ki se vanjo izlivajo, močno vplivajo na njeno sestavo. Obala lagune in njeno zaledje sta namreč intenzivno obdelana, zelo industrializirana in gosto poseljena. To pomeni, da so vodotoki tudi potencialni vir onesnaževanja lagune.

Sediment Gradeške lagune je sestavljen iz pelita (90%) in peska (10%) in ga bioturbirajo pretežno poliheti. Površino sedimenta naseljujejo večinoma diatomeje, pri vzorčevalni postaji Barbana pa je prisotna tudi makroalga *Gracilaria*.

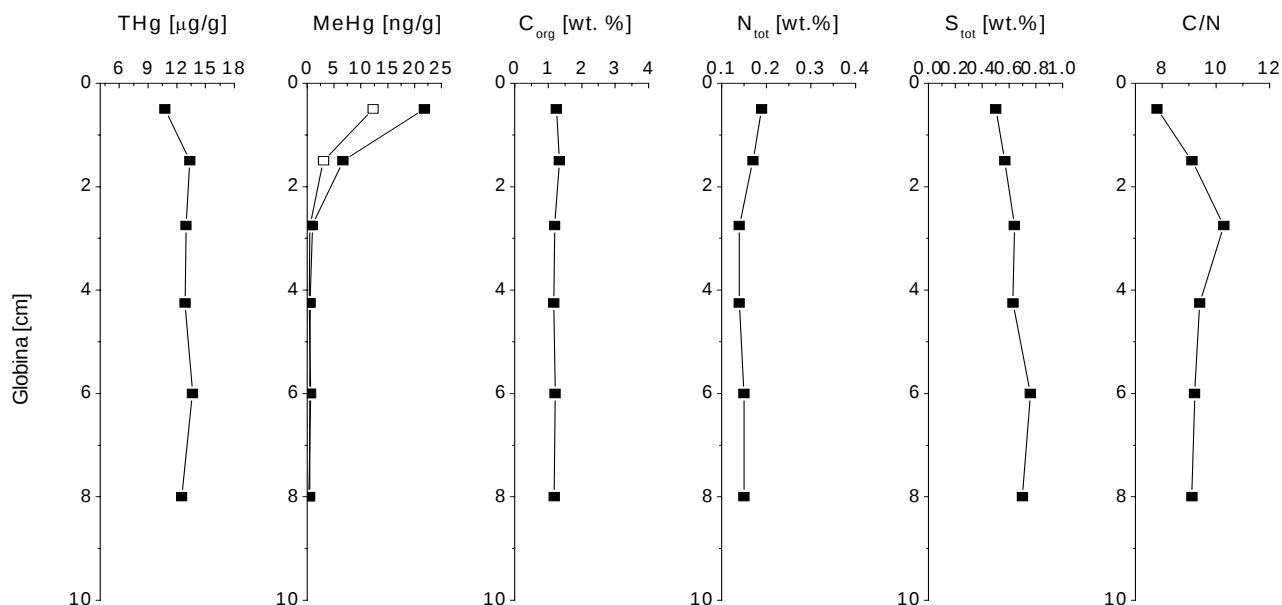


Slika 9: Barbana, eden od številnih otočkov v laguni. Ob njegovi obali se nahaja vzorčevalna postaja BAR, kjer smo odvzeli vzorec sedimenta in morske vode za potrebe eksperimenta (Benvenuti a Grado, 2006).

Laguna je edinstven ekosistem, ki ga naseljujejo številne rastlinske in živalske vrste. Pomembna pa je tudi za gospodarstvo regije. Plitvine izkoriščajo za intenzivno marikulturo in ribolov.

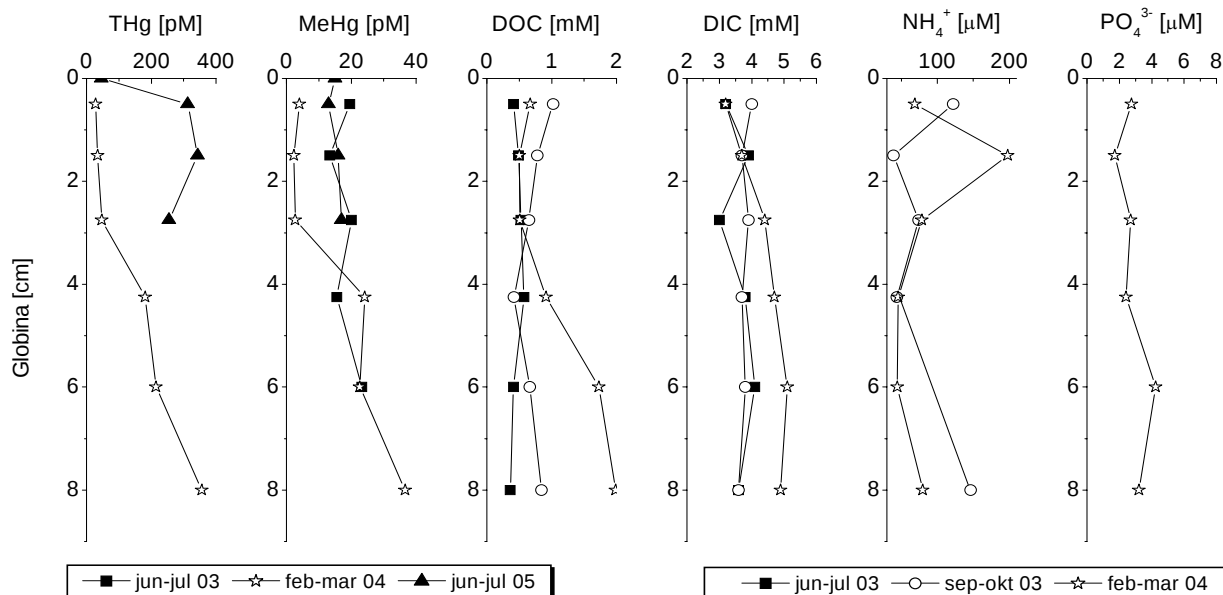


Slika 10: Lokacija vzorčevalne postaje BAR v Gradeški laguni (Covelli in sod., 2006, v pripravi)



Slika 11: Vertikalni profili vsebnosti Hg_{tot} , MeHg, C_{org} , N_{tot} , S_{tot} in molskega razmerja $C_{\text{org}}/N_{\text{tot}}$ v sredici sedimenta pri vzorčevalni postaji BAR (Covelli in sod., 2006, v pripravi)

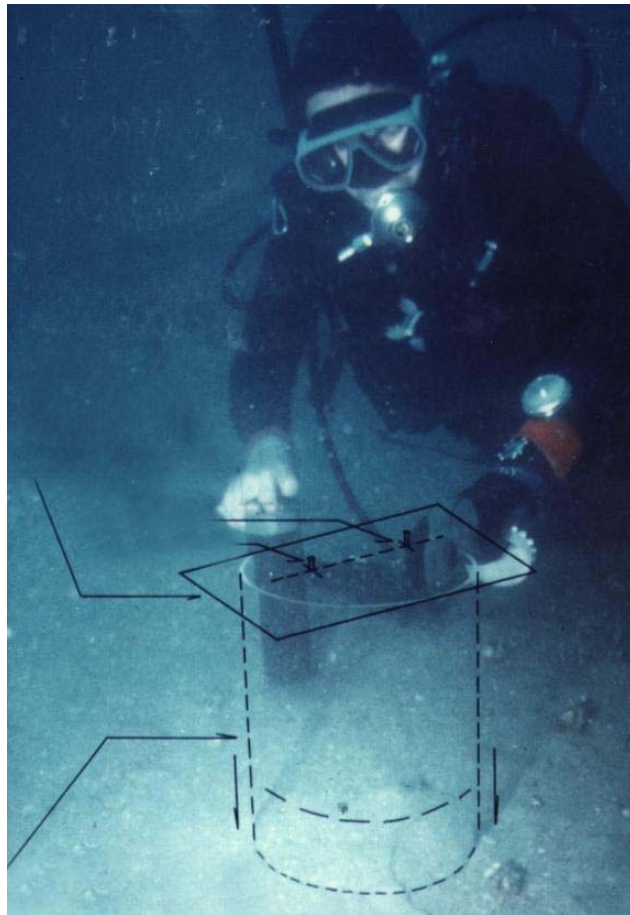
V Gradeški laguni vsebuje sediment povečane koncentracije Hg. Najvišje so v vzhodnem delu v bližini rokavov Soče in padajo proti zahodu, povprečna koncentracija Hg v sedimentu pa je $5,6 \mu\text{g/g}$ (Brambati, 1996: 29). Nesporno je to v glavnem posledica vnosa kontaminanta z naplavinami Soče. Brambati pa ugotavlja, da nezanemarljiv delež Hg izvira iz človeških dejavnosti oz. onesnaževanja neposredno v in ob laguni. Isti avtor tudi ocenjuje, da je v laguno od njenega nastanka do danes priteklo najmanj 186 ton živega srebra (Brambati, 1996: 30).



Slika 12: Vertikalni profili vsebnosti Hg_{tot} , MeHg, DOC, NH_4^+ in PO_4^{3-} v pornih vodah sedimenta pri vzorčevalni postaji BAR (Covelli in sod., 2006, v pripravi)

3.2 VZORČENJE

Vzorec sedimenta smo odvzeli septembra 2005 na vzorčevalni postaji BAR (Barbana) v Gradeški laguni (Slika 9) na globini 1 m. Uporabili smo poseben vzorčevalnik oz. bentoško posodo iz pleksi stekla z višino 25 cm in premerom 23 cm. Posodo je potapljač zasadil približno 10 do 15 cm globoko v sediment. Nato je posodo pokril s pokrovom, jo previdno dvignil in na njeno dno hitro namestil podstavek.



Slika 13: Potapljač se pripravlja na odvzem vzorca sedimenta.

Višina tako odvzetega sedimenta je bila 12,5 cm. Vodo nad sedimentom smo izčrpali iz posode in jo nadomestili s svežo morskno vodo, ki smo jo odvzeli na istem mestu kot sediment.

Posodo smo postavili v zaboj in ga prepeljali v Laboratorij za morsko biologijo v Nabrežini pri Trstu. Pri tem smo zelo pazili, da se sediment ne bi premešal. Bentoško posodo smo nato zatesnili in jo postavili v hladilnik (slika 14), v katerem je bila povprečna temperatura skozi celoten poskus enaka temperaturi na mestu odvzema vzorca. Poleg sedimenta smo na isti vzorčevalni postaji na globini devetih metrov odvzeli še 10 L vode, ki smo jo potrebovali za sprotno nadomeščanje vode iz bentoške posode, ki smo jo odvezemali pri pripravi vzorcev za analize.



Slika 14: Simulacijski poskus v laboratoriju – bentoška posoda z odvzetim sedimentom iz Gradeške lagune

3.3 PRIPRAVA VZORCEV

Na pokrovu bentoške posode sta dva ventila. Skozi prvi ventil smo dnevno odzemale vzorce vodnega stolpca nad sedimentom z brizgalko iz polipropilena. Istočasno smo pri tem odvzeto vodo nadomestili z isto količino sveže morske vode skozi drugi ventil in s tem preprečili vdor kisika v posodo. Vzorce smo filtrirali skozi membranske filtre Millipore HA premera 25 mm s porami 0,45 µm. Poskus je trajal 21 dni. Po končanem poskusu smo vodo nad sedimentom odstranili, iz sedimenta pa smo iztisnili porno vodo. Jedro sedimenta smo v anaerobni vreči v dušikovi atmosferi razrezali na tri po 1 cm debele plasti. Porno vodo smo iz vsakega dela sedimenta iztisnili s pomočjo centrifugiranja in nato filtrirali skozi membranski filter s premerom por 0,45 µm.

Za ohranitev stabilnosti smo vzorce vodnega stolpca in porne vode za določitev Mg, Ca, Mn in Fe nakisali z ultra čisto HNO_3 , vzorce za določitev koncentracije nutrientov PO_4^{3-} , NO_3^- , NH_4^+

in SiO_4^{4-} pa smo zamrznili. Za določitev koncentracije H_2S smo vzorcem dodali enak volumen 6% cinkovega acetata, da se je oboril cinkov sulfid. Pripravili smo še vzorce za določitev koncentracije in izotopske sestave raztopljenega anorganskega ogljika (DIC) ter raztopljenega organskega ogljika (DOC). Vzorce vode za analize Hg_{tot} in MeHg smo shranili v 500 mL teflonskih stekleničkah. Te vzorce smo po odvzemu nakisali s HCl in tako znižali pH vrednost na 1,9. Pripravljene vzorce smo shranili v hladilniku.

3.4 ANALIZE Hg_{tot} IN MeHg

Analize Hg_{tot} in MeHg v vodnih vzorcih smo opravili en mesec po odvzemu v Hg laboratoriju Odseka za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan.

Poudariti je potrebno, da smo posebno pozornost namenili čiščenju laboratorijske posode, saj je preprečevanje možnosti kontaminacije vzorcev s Hg ali MeHg na vseh stopnjah priprave in meritev le – teh zelo pomembno. Na voljo smo imeli majhne količine vzorcev, kar je pomenilo zelo omejeno število ponovitev. Pričakovali smo pikogramske oz. nanogramske koncentracije MeHg in Hg v vzorcih. Ker so to zelo nizke koncentracije, bi lahko s Hg kontaminirana laboratorijska posoda zelo popačila naše rezultate.



Slika 15: Filtracija vzorca pornih vod v anaerobni komori v Laboratoriju za morsko biologijo v Nabrežini pri Trstu

3.4.1 Analize metiliranega Hg (MeHg)

Vsebnost MeHg v vzorcih smo izmerili po postopku, ki so ga opisali Horvat in sodelavci (1993). V 250 mL teflonske stekleničke smo zatehtali po 35 mL vzorca, vsem vzorcem smo dodali 2,5 ml HCl in 15 ml organskega topila CH_2Cl_2 . Vzorcem, ki smo jih dodatno označili z zvezdico (*), smo dodali še standardni dodatek 50 pg (oz. 50 μL standardne raztopine MeHg s koncentracijo 1 ng/mL) MeHg (angl. spiking). Teflonke smo dobro zaprli in čez noč stresali pri sobni temperaturi. Med stresanjem je MeHg prešel iz vodne v organsko fazo, ker je bolje topen v nepolarnem topilu. Naslednji dan smo odpipetirali vodno fazo in organski fazi, v kateri je bil raztopljen MeHg, dodali 20 mL deionizirane (MilliQ) vode ter v vodni kopeli segrevali pri 70°C (v digestoriju). Organsko topilo je izparelo, ker ima vrelišče pri 40°C, MeHg je iz organske prešel v čisto vodno fazo. Ko organska faza ni bila več vidna, smo preostalo vodno fazo še 5 minut prepihovali z N_2 in tako kvantitativno odstranili še morebitne ostanke topila.

Po zaključeni ekstrakciji smo pripravili vzorce za etilacijo in meritev vsebnosti MeHg s CV-AFS. V čiste visoke teflonke smo vlili MilliQ vodo, dodali po 100 μ L 2 M acetatnega pufru in 50 μ L svežega etilacijskega reagenta (1% raztopina natrijevega tetraetilborata v 2% KOH). V vsaki seriji smo izvajali etilacijo v štirih teflonkah. Od tega smo v eno vedno dodali standard (100 μ L standardne raztopine MeHg s koncentracijo 1 ng/mL), ena je bila slepa proba (angl. blank), v preostali dve pa smo vlili vzorec. Skupni volumen etilacijske mešanice je bil približno 100 mL. Da bi zmanjšali možnost eksperimentalne napake zaradi kontaminacije, smo zaporedje teflonk v vsaki seriji premešali. Npr. če je bil v prvi seriji v teflonki številka 1 standard, smo v drugi seriji v to teflonko prelili vzorec ipd. Teflonke smo takoj tesno zaprli, saj je etilacijski reagent zelo občutljiv na zrak.

Etilacijske mešanice smo pretresli in nato pri sobni temperaturi inkubirali 15 minut. Po zaključeni etilaciji smo jih 15 minut prepihovali z N₂ (bubbling). V tem času se je etilirani MeHg ujel na pasti iz Tenax-a (steklena cevka, v kateri je približno 15 g granul smole Tenax). Po zaključenem bubblingu smo odstranili teflonke z vzorci in pasti dodatnih 5 minut prepihovali z N₂ in se na ta način znebili vodnih molekul, ki se med bubblingom ujamejo na Tenax, saj voda zelo moti detekcijo MeHg (Horvat et al, 1993).

Pasti so tako pripravljene za separacijo s plinsko kromatografijo in detekcijo oz. merjenje vsebnosti MeHg z atomsko fluorescenco hladnih par ali CV-AFS (angl. cold vapour atomic fluorescence). Uporabljali smo aparaturo proizvajalca Brooks Rand, ZDA.



Slika 16: Prepihovanje etilacijske mešanice z N_2 (angl. bubbling), pri čemer se etilirani MeHg ujame na pasti iz Tenax-a



Slika 17: Elucija s pasti, separacija s plinsko kromatografijo in detekcija MeHg s CV – AFS

Porne vode se po sestavi zelo razlikujejo od vode, ki nadslojuje sediment. So bogatejše z organskim materialom (predvsem huminskimi kislinami) in drugimi snovmi, ki lahko motijo etilacijo, separacijo in detekcijo MeHg. Zato je v tem primeru destilacija, pri kateri se večine teh snovi znebimo, primernejša od ekstrakcije (Horvat in sod., 1993).

V visoke teflonke smo zatehtali po 10 mL s HCl nakisanega vzorca pornih vod. S cevko smo teflonko z vzorcem povezali s prazno čisto teflonko. Teflonke z vzorci smo postavili v ogret termoblok, prazne pa v posodo z ledom. Vzorce smo segrevali pri 160°C za eno uro oz. dokler v hlajenih teflonkah nismo pridobili približno 8,5 ml kondenziranega destilata. Tako pridobljeni destilati so že pripravljeni za etilacijo, kot je opisana na straneh 43 in 44 in meritev vsebnosti MeHg s CV-AFS. Metoda je zelo občutljiva, saj so meje zaznavnosti 0,001 – 0,01 ng/g.

Za umerjanje inštrumenta smo uporabljali standardno delovno raztopino MeHg s koncentracijo 1 ng/mL, ki smo jo pripravljali vsak dan sproti. Linearnost smo preverjali s pripravo umeritvene krivulje v območju od 20 do 100 pg MeHg. Vsebnost MeHg v standardni raztopini smo preverjali sproti, običajno po merjenju dveh ali treh vzorcev.

Napako meritev smo določili na podlagi nihanj višine kromatografskega signala za vsebnosti MeHg v standardni raztopini, saj smo koncentracijo standarda preverjali sproti. Zato smo imeli na voljo veliko ponovitev in zadostno število meritev. Izračunali smo povprečno višino kromatografskega vrha in standardni odklon. Napaka meritve je $\pm 9,8$ %.

3.4.2 Analize celokupnega Hg (Hg_{tot})

Za meritev vsebnosti Hg_{tot} oz. celokupnega živega srebra smo najprej pripravili teflonke.

V čiste in z deionizirano (MilliQ) vodo dobro sprane teflonke smo nalili 1 mL HCl in 1 mL BrCl ter do roba dopolnili z MilliQ vodo in tesno zaprli. Tako pripravljeno posodo smo čez noč obsevali z UV žarki.



Slika 18: Aparatura za separacijo in merjenje vsebnosti Hg_{tot}

Teflonke smo naslednjega dne izpraznili in ponovno dobro sprali z deionizirano vodo. Vanje smo vlili vzorce in dodali 0,2 mL HCl in 0,5 mL BrCl. Vzorce smo za 3 ure izpostavili UV žarkom. BrCl je močan oksidant, ki pod vplivom UV žarkov vso živo srebro v vzorcu pretvori v Hg(II). S CV-AFS smo namreč merili koncentracijo živosrebrovega iona. Neposredno pred meritvijo smo v vsak vzorec dodali 30 μ L 12% raztopine hidroksil amin hidroklorida ($HONH_3Cl$), ki je odstranil preostali BrCl. Ta bi sicer lahko zelo motil pri meritvah. Teflonko smo dobro pretresli in vzorec vlili v aparaturo za separacijo. V njej se je Hg uplinil in ujel na zlato past. Zaradi amalgamacije se je ločil od ostalih uplinjenih snovi. Sledila je elucija s pasti in detekcija s CV-AFS. Meje zaznavnosti te metode so 0,001 – 0,01 ng/g.

Inštrument smo umerjali s standardno delovno raztopino Hg s koncentracijo 10 ng/mL. Linearnost smo dnevno preverjali s pripravo umeritvene krivulje v območju od 0,2 do 1 ng Hg. Vsebnost Hg v standardni raztopini smo preverjali sproti, običajno po merjenju treh ali štirih vzorcev. Pravilnost rezultatov smo preverjali z uporabo certificiranega referenčnega materiala IAEA – 405c. Osnova za ta referenčni material je estuarski sediment, certificirana vsebnost Hg_{tot} v tem materialu pa je 0,51 (0,77 – 0,85) mg/kg.

Tudi pri meritvah Hg_{tot} smo napako meritev izračunali na podlagi meritev standardne raztopine Hg. Napaka meritev je znašala $\pm 5,7 \%$.

Iz višin dobljenih kromatografskih vrhov smo izračunali koncentracije MeHg in Hg_{tot} v analiziranih vzorcih. Za koncentracije MeHg v vzorcih vodnega stolpca smo uporabili enačbo 1.

$$c [ng MeHg/mL] = (h_{vz}/h_s) * c_s * V_{st}/V_{vz} \quad \dots(1)$$

h_{vz} – višina kromatografskega signala za MeHg v dodanem alikvotu vzorca [mm]

h_s – višina signala, ki ustreza 50 pg MeHg (standard) [mm]

c_s – koncentracija standardne raztopine MeHg (1ng/mL)

V_{vz} – volumen vzorca [mL]

V_{st} – volumen standardne raztopine MeHg

Končni rezultat za vsebnosti MeHg v vzorcih smo izračunali tako, da smo z enačbo 1 dobljeni rezultat pomnožili s povprečnim izkoristkom ekstrakcije. Izkoristek ekstrakcije v odstotkih smo izčunali s pomočjo paralelk vzorcev s standardnim dodatkom 50 pg MeHg po enačbi 1a. Vsebnost MeHg v vzorcih smo merili 4 dni, ker pa nismo vsakemu vzorcu dodali standardnega dodatka, smo za vsak merilni dan izračunali povprečni izkoristek in glede na to vrednost preračunali končno vsebnost MeHg v vzorcih, ki smo jih tisti dan izmerili.

Koncentracije MeHg v vzorcih pornih vod smo izračunali z uporabo enačbe 2, koncentracije Hg_{tot} v vseh vzorcih pa smo izračunali z enačbo 3.

$$c [ng MeHg/mL] = (h_{vz}/h_s) * c_s * V_{st} * (V_k * 1mL / V_{an} * V_s) \quad \dots(2)$$

h_{vz} – višina kromatografskega signala za MrHg v dodanem alikvotu destilata [mm]

h_s – višina signala, ki ustreza 50 pg MeHg [mm]

c_s – koncentracija standardne raztopine MeHg (1ng/mL)

V_s – začetni volumen vzorca (pred destilacijo) [mL]

V_{st} – volumen standardne raztopine [mL]

V_{an} – volumen dodanega alikvota vzorca pri meritvi [mL]

V_k – končni volumen vzorca (po destilaciji) [mL]

$$c \text{ [ng Hg/L]} = (h_{vz}/h_s) * c_s * V_{st} * 1000 \text{ mL}/V_{vz} \quad \dots(3)$$

h_{vz} – višina kromatografskega signala dodanega vzorca [mm]

h_s – višina signala za standard [mm]

c_s – koncentracija standardne raztopine Hg (10 ng/mL)

V_{vz} – volumen vzorca [mL]

V_{st} – volumen standardne raztopine [mL]

3.5 SPREMLJAJOČE ANALIZE

Meritve vsebnosti nekaterih drugih snovi, ki pomembno vplivajo na bentoške pretvorbe Hg v Gradeški laguni in so zato v naši raziskavi relevantne, so obsegale analize kisika (O_2), nitrata (NO_3^-), amoniaka (NH_4^+), fosfata (PO_4^{3-}), silikata (SiO_4^{4-}), H_2S , Fe, Mn, Ca, Mg, raztopljenega organskega ogljika (DOC) in raztopljenega anorganskega ogljika (DIC).

3.5.1 Analize kisika

Koncentracije O_2 so določili v Laboratoriju za morsko biologijo v Nabrežini pri Trstu s titracijo po Winkerju (Grasshof in sod., 1983). Napaka meritve je $\pm 5 \%$.

3.5.2 Analize raztopljenega anorganskega ogljika (DIC)

Koncentracije DIC so določili v Laboratoriju za morsko biologijo v Nabrežini pri Trstu z analizatorjem Shimadzu 5000A TOC po nakisanju vzorca s H_3PO_4 . Napaka meritve znaša $\pm 5 \%$.

3.5.3 Analize izotopske sestave ^{13}C -DIC

Vzorci za določitev izotopske sestave raztopljenega anorganskega ogljika ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$) so pripravili na Odseku za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan tako, da so v ampule dodali nasičeno H_3PO_4 in jih zaprte prepihali s helijem, da so se znebili vpliva CO_2 iz zraka. Tako pripravljene ampule so prelili z vzorcem in izotopsko sestavo sproščenega CO_2 (Capasso in sod., 2003) izmerili iz plinske kape na masnem spektrometru Europa 20-20 s preparativnim modulom ANCA-TG, ki se uporablja za meritve plinastih vzorcev. Pravilnost priprave vzorca in poteka meritev so spremljali s pripravo delovnega standarda Na_2CO_3 , ki ima $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ vrednost $-10,8 \%$. Napaka meritev tako pripravljenih vzorcev znaša $\pm 0,2 \%$.

3.5.4 Analize raztopljenega organskega ogljika (DOC)

Koncentracije DOC so določili v Laboratoriju za morsko biologijo v Nabrežini pri Trstu s katalitsko oksidacijo raztopljene organske snovi pri visoki temperaturi z analizatorjem Shimadzu 5000A TOC po nakisanju vzorca s H_3PO_4 . Napaka meritve je $\pm 5 \%$.

3.5.5 Analize sulfida in nutrientov

Koncentracije S^{2-} in nutrientov PO_4^{3-} , NO_3^- , NH_4^+ in SiO_4^{4-} so določili v laboratoriju Morske biološke postaje v Piranu s standardnimi spektrofotometričnimi metodami (Grasshof in sod., 1983). Napaka meritev znaša $\pm 3 \%$.

3.5.6 Analize kovin

Koncentracije celotnega raztopljenega Ca, Mg, Fe in Mn so določili na Univerzi v Michiganu, Ann Arbor, Michigan, ZDA. Koncentracije so izmerili z atomsko emisijsko spektrometrijo v induktivno sklopljeni plazmi (ICP-OES) z Leeman Labs PlasmaSpec III sistemom. Napaka meritev znaša ± 2 %.

4 REZULTATI

4.1 MERITVE V INKUBACIJSKI POSODI

Kot že navedeno, smo imeli na voljo zelo majhne količine vzorcev za analize MeHg in Hg_{tot}. Zato smo pri nekaterih vzorcih izpustili paralelko s standardnim dodatkom in za te vzorce torej nismo dobili neposrednega podatka o izkoristku ekstrakcije. Meritve smo opravljali tako, da je bil v vsaki seriji vsaj en vzorec oz. paralelka s standardnim dodatkom MeHg. Tako smo lahko izračunali povprečni izkoristek ekstrakcije za vsak merilni dan in ga uporabili za preračunavanje vsebnosti MeHg tistih vzorcev, katerim standarda nismo dodali. V preglednici 1 so podane končne vsebnosti MeHg in Hg_{tot}. Kot že navedeno na 47. in 49. strani znaša napaka meritev za MeHg 9,8 %, za Hg_{tot} pa 5,7 %. Koncentracije MeHg so podane v ng MeHg/L, koncentracije Hg_{tot} pa v ng Hg/L.

Preglednica 1: Koncentracije Hg_{tot} in MeHg v vzorcih

Čas odvzema in		MeHg (ng/L)	MeHg (nM)	Hg _{tot} (ng/L)	Hg _{tot} (nM)
	oznaka vzorca				
Porne vode	1. dan (13.09.05)				
	0-1 cm	0,218	0,001	31,355	0,157
	1. dan (13.09.05)				
	1-2 cm	0,210	0,001	29,854	0,149
	1. dan (13.09.05)				
	2-3,5 cm	2,327	0,011	ni meritve*	ni meritve*
	21. dan (03.10.05)				
	0-1 cm	8,786	0,040	33,400	0,167
	21. dan (03.10.05)				
1-2 cm	8,387	0,038	28,906	0,145	
21. dan (03.10.05)					
	2-3,5 cm	8,140	0,037	17,012	0,085
Supernatant	1. dan (13.09.05)	0,472	0,002	11,156	0,056
	21. dan (03.10.05)	10,36	0,047	23,506	0,118
Vodni stolpec	1. dan (13.09.05)	0,638	0,003	9,669	0,048
	3. dan (15.09.05)	0,951	0,004	10,410	0,052
	5. dan (17.09.05)	1,218	0,006	10,353	0,052
	9. dan (21.09.05)	1,699	0,008	15,313	0,077
	11. dan (23.09.05)	3,219	0,015	18,874	0,094
	14. dan (26.09.05)	17,27	0,078	22,866	0,114
	15. dan (27.09.05)	19,61	0,089	26,757	0,134
	17. dan (29.09.05)	22,10	0,100	19,155	0,096
	18. dan (30.09.05)	38,76	0,175	21,090	0,105
	21. dan (03.10.05)	13,98	0,063	25,910	0,130

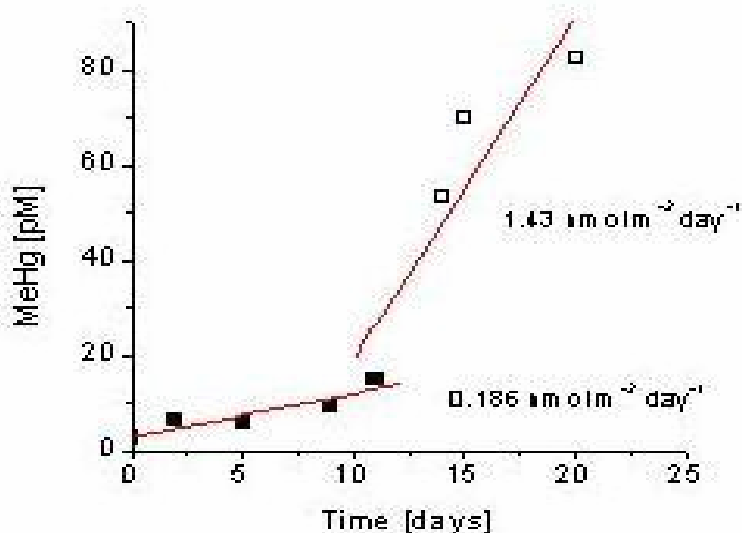
* Zaradi eksperimentalne napake pri separaciji nimamo rezultata za Hg_{tot} v enem od vzorcev porne vode.

Informacijo o potencialni metilaciji v našem eksperimentalnem sistemu nam lahko poda izračun razmerij med metiliranim in celokupnim živim srebrom. Ta razmerja oz. deleži so podani v preglednici 2. Iz rezultatov je razvidno, da razmerje ni konstantno. S časom se je vse večji delež živega srebra pretvarjal v MeHg.

Preglednica 2: Razmerja (deleži) MeHg glede na Hg_{tot}

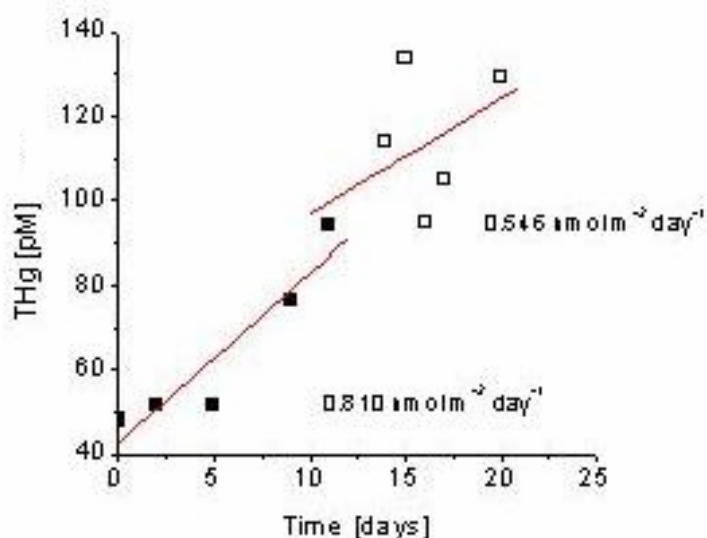
	Čas odvzema in oznaka vzorca	Delež MeHg v Hg_{tot}	Molski delež MeHg v Hg_{tot}
Porne vode	1. dan (13.09.05) 0-1 cm	0,70 %	0,63 %
	1. dan (13.09.05) 1-2 cm	0,70 %	0,64 %
	1.dan (13.09.05) 2-3,5 cm	ni rezultata *	ni rezultata*
	21. dan (03.10.05) 0-1 cm	26,3 %	23,8 %
	21. dan (03.10.05) 1-2 cm	29,0 %	26,3 %
	21. dan (03.10.05) 2-3,5 cm	47,9 %	43,3 %
Supernatant	1. dan (13.09.05)	4,23 %	3,82 %
	21. dan (03.10.05)	44,1 %	39,9 %
Vodni stolpec	1. dan (13.09.05)	6,60 %	5,97 %
	3. dan (15.09.05)	9,14 %	8,27 %
	5. dan (17.09.05)	11,8 %	10,7 %
	9. dan (21.09.05)	11,1 %	10,0 %
	11. dan (23.09.05)	17,1 %	15,4 %
	14. dan (26.09.05)	75,5 %	68,3 %
	15. dan (27.09.05)	73,3 %	66,3 %
	17. dan (29.09.05)	115 %	104 %
	18. dan (30.09.05)	183 %	166 %
	21. dan (03.10.05)	53,9 %	48,8 %

Iz slike 19 je razvidno naraščanje koncentracije MeHg v vzorcih. Po 13. dneh, ko v inkubacijski posodi praktično ni bilo več kisika (slika 20), koncentracije MeHg močno poskočijo.



Slika 19: Spremembe koncentracij MeHg v vodnem stolpcu v bentoški komori

Predvidevali smo, da bo tudi hitrost kopičenja Hg_{tot} v inkubacijski posodi narasla ob prehodu iz oksičnih v anoksične razmere. Rezultati pa so, kot je razvidno iz slike 20, pokazali obratno. V oksičnih razmerah je izmerjena koncentracija Hg_{tot} naraščala hitreje kot v anoksičnih. Do 13. dne inkubacije je bila hitrost kopičenja Hg_{tot} $0,81 \text{ nmol/m}^2\text{dan}$, po prehodu v anoksične razmere pa je ta padla na $0,55 \text{ nmol/m}^2\text{dan}$. Ker pa imamo na voljo le majhno število dokaj razpršenih točk, je dopusten dvom v statistično različnost dobljenih naklonov. Dobljene rezultate bi torej morali potrditi z dodatnimi meritvami in izračuni.



Slika 20: Spremembe koncentracij Hg_{tot} v vodnem stolpcu v bentoški komori

V poskusu opazamo tudi zniževanje koncentracij NO_3^- do 13. dneva kot posledico denitrifikacije (slika 21). V času oksične razgradnje organske snovi in intenzivne porabe kisika smo zasledili naraščanje koncentracij Mn in Fe (sliki 21 in 22), po 13. dnevu pa so vidne približno konstantne koncentracije Mn in padec koncentracij Fe. Gibanje koncentracij NH_4^+ , PO_4^{3-} in SiO_4^{4-} (slike 21, 22 in 23) v času nam pokaže, da je prišlo do močnega naraščanja koncentracij teh snovi v anoksični fazi poskusa zaradi intenzivne mineralizacije sedimentirane organske snovi v Gradeški laguni, ki poteka podobno kot v celotnem Tržaškem zalivu (Ogrinc

in sod., 2003; Čermelj in sod., 2001; Ogrinc in Faganeli, 2006). Močna anoksična produkcija silikata je posledica raztapljanja frustul odmrlih diatomej (Čermelj in sod., 2001).

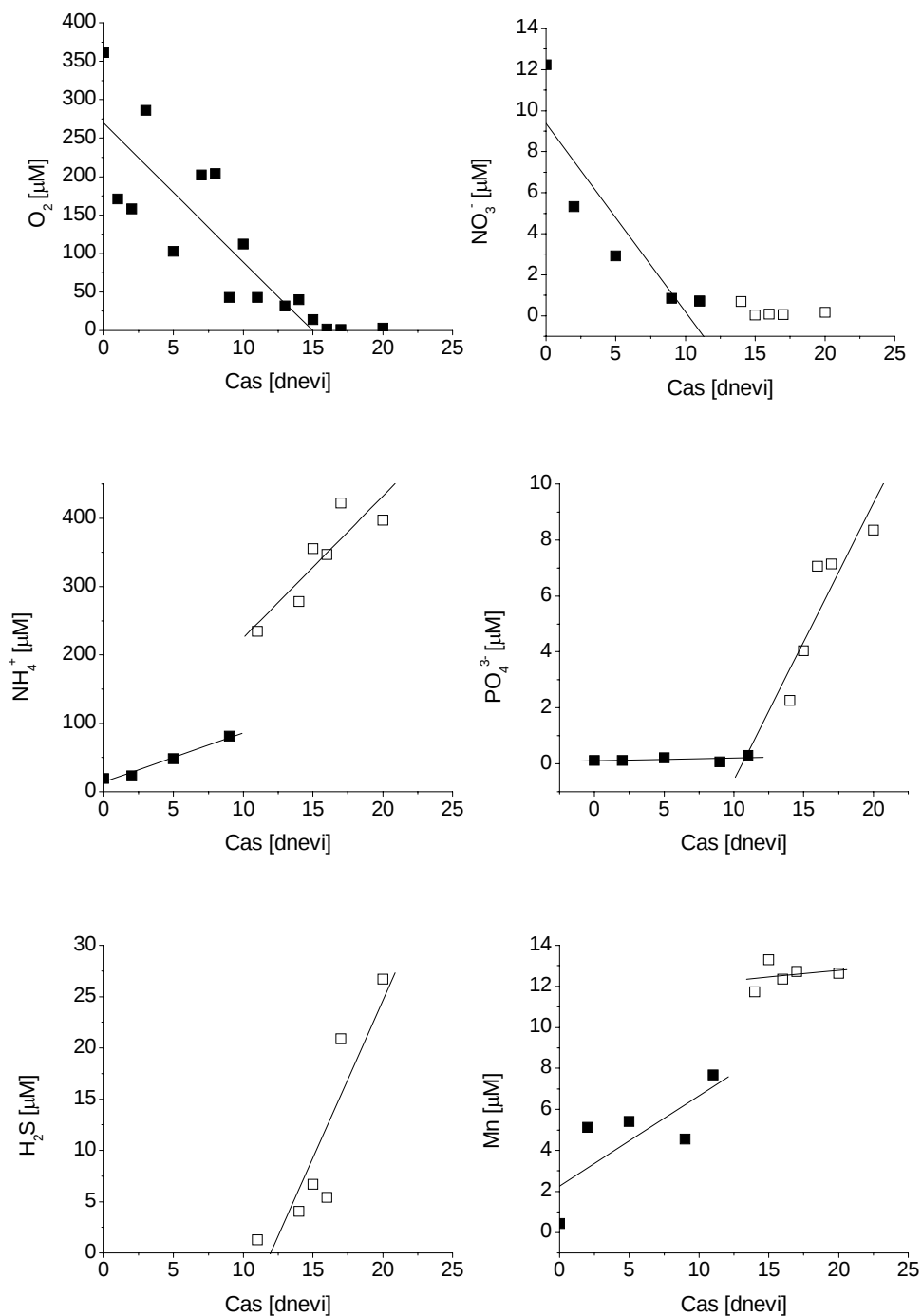
Redukcija sulfata je zelo pomemben mikrobni proces v sedimentu, sproščanje H_2S v vodni stolpec pa zaznamo šele po prehodu iz oksičnih v anoksične razmere. Nedvomno so bili sulfatni reducenti aktivni ves čas inkubacije, vendar je prisotnost kisika v prvih trinajstih dneh omogočala reoksidacijo nastajajočega H_2S (Hines in sod., 1997). Ko je kisika zmanjkalo, se je začel H_2S kopičiti. Podobno se je dogajalo tudi z amonijem, saj smo ob prehodu v anoksične razmere zaznali hitrejše kopičenje NH_4^+ v vodnem stolpcu. Hitro kopičenje fosfata po prehodu v anoksične razmere je povezano s sproščanjem Fe, kar pripisujemo tako sproščanju fosfata s površin raztapljajočih se (redukcija) železovih oksidov, pretežno goethita (Arčon in sod., 1999), kot tudi razgradnji organske snovi (Ogrinc in Faganeli, 2006).

V analizah Mg smo zasledili le rahlo naraščanje koncentracij v oksični fazi in nato skokovito spreminjanje koncentracij v anoksični fazi poskusa. Koncentracije Ca v oksični fazi poskusa padajo in se nato v anoksični skokovito spreminjajo. V oksični fazi prihaja do obarjanja kalcita in rahlega raztapljanja dolomita, v anoksični pa je možno obarjanje obeh mineralov. Časovna nihanja DIC kažejo močno povišane koncentracije v anoksični fazi poskusa. Upoštevajoč razmeroma majhne spremembe koncentracij Ca, ki je indikator raztapljanja karbonatov med poskusom, lahko sklepamo, da je razgradnja sedimentirane organske snovi z vsemi akceptorji elektronov (od O_2 do sulfata) glavni izvor DIC (Ogrinc in sod., 2003).

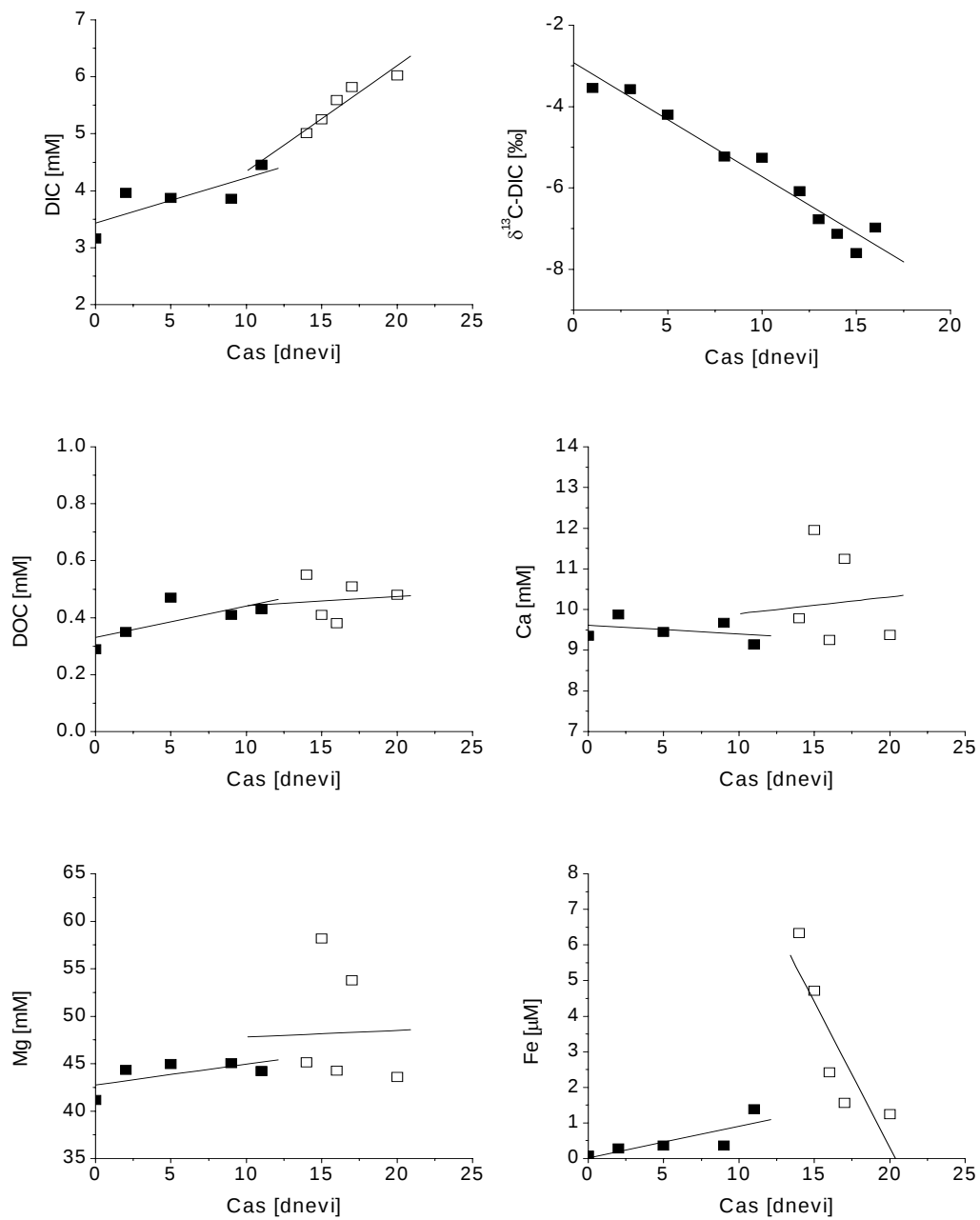
Med inkubacijo se je izotopska sestava DIC spreminjala. Znižanje vrednosti $\delta^{13}C$ -DIC kaže, da je potekala intenzivna mineralizacija organskega materiala. Delež DIC organskega izvora se je povečeval, še zlasti v anoksični fazi poskusa (Ogrinc in sod., 2003). Časovne spremembe koncentracij DOC kažejo povišane koncentracije (kopičenje DOC) v oksični in nižje (porabo) v anoksični fazi, kar potrjuje intenzivno neto mineralizacijo organske snovi v anoksičnem okolju. Možno razlago za ta pojav je podal Hines s sodelavci (1997). Ugotovil je, da se v sedimentu Tržaškega zaliva velika večina organskega materiala mineralizira preko anaerobnih

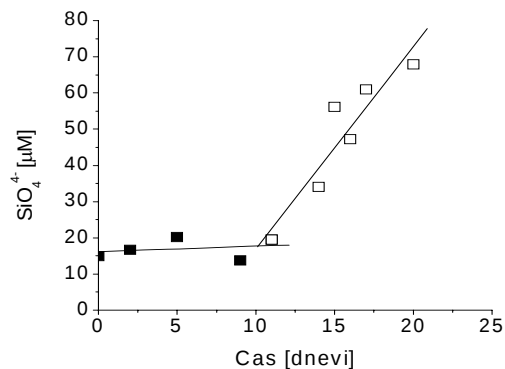
metabolnih poti in, da se glavnina kisika porabi za reoksidacijo reduciranih kemijskih zvrsti in ne za aerobni metabolizem.

Za oba procesa smo analiziranim kemijskim zvrstem iz linearne odvisnosti koncentracije analita od časa inkubacije določili snovne tokove. Snovne tokove smo določili tako, da smo naklon premice pomnožili z višino sedimenta in pretvorili tokove v ustrezne enote. Izračunani snovni tokovi so prikazani v preglednici 3.



Slika 21: Spremembe koncentracij O₂, NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, H₂S in Mn v bentoški komori

Slika 22: Spremembe koncentracij DIC, $\delta^{13}\text{C-DIC}$, DOC, Ca, Mg in Fe in bentoški komori



Slika 23: Spremembe koncentracij SiO_4^{4-} v bentoški komori

Preglednica 3: Snovni tokovi analiziranih kemijskih zvrsti v času inkubacijskega poskusa* *

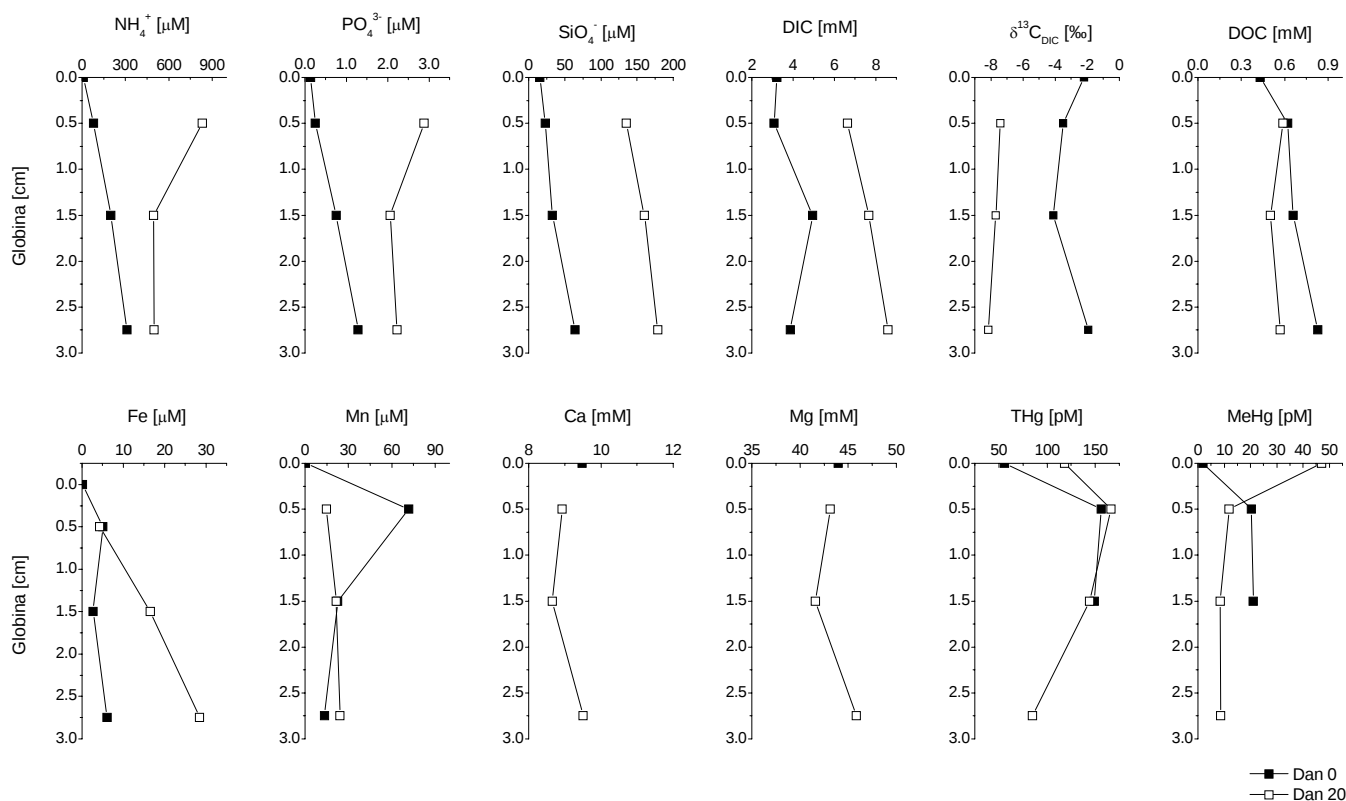
Snovni tok	Oksična faza (čas: 0–13. dan)	Anoksična faza (čas: 13.–22. dan)
	mmol m ⁻² dan ⁻¹ (*nmol m ⁻² dan ⁻¹)	mmol m ⁻² dan ⁻¹ (*nmol m ⁻² dan ⁻¹)
J_{O_2}	-3,62	
$J_{\text{NO}_3^-}$	-0,18	
J_{Mn}	0,14	0,013
J_{Fe}	0,02	-0,16
J_{Mg}	43,8	13,9
J_{Ca}	-4,38	8,24
$J_{\text{PO}_4^{3-}}$	0,002	0,2
$J_{\text{NH}_4^+}$	1,44	4,14
$J_{\text{H}_2\text{S}}$		0,61
J_{DIC}	2,57	37,2
$J_{\text{13C-DIC}}$	-12,6 ‰	-12,6 ‰
J_{DOC}	2,20	0,66
$J_{\text{Hg-tot}}$	0,81 *	0,81 *
J_{MeHg}	0,19 *	1,40 *

** Snovne tokove smo izračunali tam, kjer smo ugotovili linearne zveze med koncentracijo analita in časom poskusa.

4.2 MERITVE V PORNH VODAH

Rezultati meritev celokupnega Hg in MeHg v pornih vodah potrjujejo, da MeHg nastaja v sedimentu. Vsebnost Hg_{tot} in MeHg v pornih vodah smo sicer merili le na začetku in na koncu inkubacije (glej preglednico 1). Ugotovili smo, da v vrhnjem sloju sedimenta (globina 0-1 cm) MeHg nastaja najhitreje. V 21. dneh inkubacije se je koncentracija v tem sloju povišala z začetnih 0,218 ng/L na končnih 8,79 ng/L oz. z 0,700 na 26,30 % celokupnega Hg. To opazno povišanje lahko pripišemo intenzivnim mikrobnim procesom v tem sloju sedimenta. MeHg iz sedimenta učinkovito prehaja v vodni stolpec, kar so potrdile meritve vsebnosti MeHg v inkubacijski komori. Kot že večkrat navedeno, se MeHg v vodnem stolpcu učinkovito vključuje v prehranjevalne spletke in se akumulira v višjih trofičnih nivojih.

Po 21. dneh inkubacije smo v pornih vodah zasledili povišane koncentracije NH_4^+ , PO_4^{3-} , SiO_4^{4-} in DIC ter nižje koncentracije DOC, kar je posledica razgradnje organske snovi v sedimentu. Pomen razgradnje organske snovi za spremembe koncentracij teh snovi potrjuje tudi znižanje vrednosti $\delta^{13}C-DIC$. Koncentracije Fe in Mn so se znižale zaradi obarjanja malo topnih sulfidov.



Slika 23: Koncentracije Hg_{tot} , MeHg, NH_4^+ , PO_4^{3-} , SiO_4^{4-} , DIC, vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ -DIC, DOC, Fe, Mn, Ca in Mg v pornih vodah pred in po inkubacijskem poskusu v Gradeški laguni

5 RAZPRAVA

5.1 TOKOVA Hg IN MeHg

S padanjem koncentracije kisika v eksperimentalni posodi je naraščala hitrost bentoških tokov Hg in MeHg. V obeh fazah poskusa (oksični in anoksični) je bilo prisotno prehajanje Hg in MeHg iz pornih vod sedimenta v vodni stolpec. Do izrazitega dviga hitrosti obeh tokov je prišlo, ko je okolje prešlo iz oksičnega v suboksično oz. anoksično, to je med 13. in 15. dnem

inkubacije. Delež MeHg v toku Hg je v anoksičnem okolju močno narasel, na 50-100 %, kar lahko pripisujemo naraščajoči metilaciji, ki poteka hitreje v anaerobnem, in upočasnjeni demetilaciji, ki poteka hitreje v aerobnem okolju (Ullrich in sod., 2001), čeprav so tudi sulfatoredukcijske bakterije, ki so sicer anaerobi, pomembni demetilatorji (Oremland in sod., 1991). Poleg tega je pomemben tudi vpliv železovih in manganovih oksidov (Ullrich in sod., 2001). Železovi in manganovi oksidi imajo velike površine in velike sposobnosti adsorpcije in koprecipitacije Hg ter sproščanja med raztapljanjem. Tako so Bloom in sodelavci (1999) ugotovili, da je mobilnost MeHg v estuarijskih sedimentih povezana z redoks procesi Fe, medtem ko je mobilnost Hg(II) ($Hg_{tot} - MeHg$) odvisna od nastanka topnih polisulfidov in organskih kompleksov.

Slednje je v našem primeru manj verjetno, saj je bil tok DOC v anoksični fazi poskusa celo nižji kot v oksidni in kaže na njegovo intenzivno razgradnjo. Prav tako so bile nižje tudi koncentracije DOC v pornih vodah po poskusu.

V anoksičnem okolju se oksihidroksidi raztapljajo, kar je razvidno iz hitro naraščajoče koncentracije fosfata po 15. dnevu poskusa. Do tega povišanja pride zaradi naraščajoče razgradnje organske snovi. Tu gre pretežno za biomaso mikroalg, kar potrjuje razmerje $C_{org}/N_{tot} < 10$ (molsko) v sedimentu in pa naraščajoče koncentracije DIC, NH_4^+ in SiO_4^{4-} ter znižane vrednosti $\delta^{13}C-DIC$ v poskusu (Čermelj in sod., 1999; Ogrinc in sod., 2003). K povišanju koncentracije fosfata med anoksično fazo znatno pripomore tudi desorpcija s površine Fe in Mn oksihidroksida (Ogrinc in Faganeli, 2006).

Padec koncentracije Fe in približno konstantna koncentracija Mn v anoksični fazi poskusa pa sta posledica obarjanja Fe in Mn sulfidov, kar ugodno vpliva na hitrost metilacije (Gagnon in sod., 1996). Nastajanje slabo topnih sulfidov dodatno potrjuje tudi opazen padec koncentracije Fe in približno konstantna koncentracija Mn v pornih vodah po poskusu.

Obarjanje HgS ali nastanek Hg-S kompleksov ob prehodu v anoksično fazo je lahko tudi prisotno, saj opazimo nižje tokove Hg_{tot} v anoksični fazi poskusa in nižje koncentracije Hg in MeHg v pornih vodah po poskusu.

Povišana koncentracija MeHg po poskusu je bila omejena le na mejo sediment-voda in vodni stolpec nad sedimentom. Obarjanje in raztapljanje oksihidroksidov, sulfidov in organskih kompleksov lahko vpliva na hitrost metilacije tako, da kontrolira razpoložljive substrate, predvsem HgS^0 (Ullrich in sod., 2001; Hammerschmidt in sod., 2004; Hammerschmidt in Fitzgerald, 2004) v pornih vodah, ki vsebujejo nizke koncentracije S^{2-} . Tak primer je tudi v Tržaškem zalivu (Hines in sod., 1997).

Z enačbo 4 (Berner, 1980: 32) smo določili difuzijske tokove Hg in MeHg med porno vodo v sedimentu in vodnim stolpcem v odsotnosti bioirigacije (bioturbacije).

$$F = - (\Phi D_w / \theta^2) \partial C / \partial x \quad \dots(4)$$

F - tok topljenca koncentracije C v globini x (v našem primeru 1 cm)

Φ - poroznost sedimenta

D_w - difuzijski koeficient topljenca v vodi v odsotnosti trdne faze

θ - tortuoznost

Poroznost smo izračunali z enačbo 5 (Johnson in sod., 1982).

$$\Phi = (M_w + \rho_w) / ((M_w + \rho_w) + (M_{sed} + \rho_{sed})) = 0,63 \quad \dots(5)$$

Tortuoznost smo določili iz poroznosti (Boudreau, 1996) z enačbo 6.

$$\theta = \sqrt{1 - \ln(\Phi^2)} = 1,39 \quad \dots(6)$$

Za Hg smo uporabili $D_w = 5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Gobeil in Cossa, 1993; Mason in sod., 1993). Predpostavili smo, da je MeHg v porni vodi v celoti prisoten kot CH_3HgSH (Dyrssen in Wedborg, 1991; Hammerschmidt in sod., 2004) in D_w določili z enačbo 7 (Schwarzenbach in sod., 1993).

$$D_w = 2.3 \cdot 10^{-4} / V^{0.71} \quad \dots(7)$$

V - molski volumen topljenca določen na podlagi molske mase (248.7 g mol^{-1}) in gostote (4.06 g cm^{-3} pri 25°C ; ATSDR, 1999)

D_w je tako pri 25°C $1.2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Difuzijska tokova Hg_{tot} sta bila 40 in $104 \text{ ng m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ in sta bila 10-100 krat večja kot v sredini Tržaškega zaliva (Covelli in sod., 1999). Difuzijska tokova MeHg pa sta bila $-1,5$ in $-0,1 \text{ ng m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ in sta bila podobna tokovom v sredini Tržaškega zaliva (Covelli in sod., 1999), toda nižja kot n. pr. ob Long Islandu ob vzhodni obali ZDA (Hammerschmidt in sod., 2004). Difuzijski tok Hg v anoksičnem okolju je bil $20 \text{ ng m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, MeHg pa $-0,7 \text{ ng m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Primerjava med inkubiranimi in difuzijskimi bentoškimi tokovi MeHg in Hg pokaže do 10-krat višje vrednosti, kar gre na račun bioturbacije (bioirigacije) sedimenta z bentoško favno. Bentoška fauna torej pomembno vpliva na povečanje difuzijskih tokov in prehajanje Hg in MeHg iz sedimenta v vodni stolpec.

Primerjava inkubiranega bentoškega toka v Gradeški laguni z izmerjenimi bentoškimi tokovi Hg in MeHg *in situ* v sredini Tržaškega zaliva (postaja AA1, Covelli in sod., 1999) pokaže, da so izmerjeni tokovi v Gradeški laguni podobni tokovom v Tržaškem zalivu v poletnem obdobju pri približno enakih koncentracijah Hg_{tot} in MeHg v pornih vodah, a pri 3 do 4-krat višjih vsebnostih Hg_{tot} in do 20-krat višji vsebnostih MeHg v trdni fazi sedimenta (Hines in sod., 2000; Hines in sod., 2006, v tisku). Opisana primerjava kaže na pomembnost metilacije Hg v sedimentu v Gradeški laguni, pri čemer se le-ta po osnovnih biogeokemijskih (vključujejo vsebnosti C_{org} in N_{tot}) in sedimentoloških lastnostih (vključujejo zrnastost in

mineralno sestavo) bistveno ne loči od sedimenta v sredini Tržaškega zaliva (Hines in sod., 2006, v tisku). Pomembna razlika je v S_{tot} , saj so vsebnosti v Gradeški laguni približno 2-krat višje (Hines in sod., 2006, v tisku) in kažejo na intenzivno redukcijo sulfata in obarjanje sulfidov.

Če bentoški tok predstavlja razliko med hitrostmi metilacije in demetilacije v sedimentu (Hines in sod., 2006, v tisku), korigirano za adsorpcijo in desorpcijo, lahko sklepamo, da sta hitrosti metilacije in redukcije sulfata večji v laguni kot v zalivu, a nastali MeHg ostaja pretežno vezan na trdne delce v sedimentu. To potrjujejo tudi porazdelitveni koeficienti K_d (L kg^{-1}) za Hg in MeHg med porno vodo in trdno fazo sedimenta. Ti so 10^6 za Hg in 10^3 za MeHg.

Zanimiva je tudi primerjava lagune z izlivom Soče in področjem v Tržaškem zalivu v neposredni bližini izliva (postaja D6; Hines in sod., 2006, v tisku), kjer so vsebnosti Hg_{tot} približno enake kot v laguni, vsebnosti MeHg so do približno 4-krat višje, koncentracije Hg v porni vodi so približno enake, koncentracije MeHg v izlivu pa približno enake kot v laguni, a višje kot v zalivu v neposredni bližini izliva reke Soče. K_d za Hg in MeHg v sedimentu lagune sta približno enaka vrednostim v zalivu pred izlivom reke, a višja kot v sredini Tržaškega zaliva in estuariju Soče (10^5 oz. 10^2). Ker so v obravnavanih lokacijah vsebnosti C_{org} in N_{tot} približno enake, menimo, da porazdelitev Hg in MeHg med porno vodo in trdno fazo v sedimentu ni toliko odvisna od vsebnosti organske snovi (C_{org}), kot pa od obarjanja in raztapljanja kovinskih oksidov in sulfidov (redoks razmer).

5.2 MASNA BILANCA Hg V INKUBACIJSKEM POSKUSU

Meritve tokov na meji sediment-voda lahko uporabimo za izračun hitrosti izmenjave Hg in MeHg med sedimentom in vodo oz. bentoške masne bilance v Gradeški laguni v oksičnih in anoksičnih razmerah. Upoštevamo, da sta vnos Hg in MeHg v sediment in iznos iz sedimenta v ravnotežju (stacionarnem stanju):

Hg, MeHg (vnos z depozicijo) = Hg, MeHg (tok na meji sediment-voda) + Hg, MeHg (trajno deponiran v sedimentu).

Količino v sedimentu trajno deponiranih Hg in MeHg izračunamo iz hitrosti posedanja (v) in vsebnosti Hg in MeHg ($C_{Hg, MeHg}$) pod cono mešanja (bioturbacije) z enačbo 8.

$$Hg, MeHg (dep.) = v C_{Hg, MeHg} \rho (1 - \Psi) \quad \dots(8)$$

ρ - gostota sedimenta ($2,5 \text{ g cm}^{-3}$)

Ψ - poroznost (0,62; Covelli in sod., 2006, v pripravi)

V - hitrost posedanja (2 mm leto^{-1})

$C_{Hg} = 13 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ in $C_{MeHg} = 2 \text{ ng g}^{-1}$

Količina trajno deponiranega Hg in MeHg v sedimentu je torej $31 \text{ mg m}^{-2} \text{ leto}^{-1}$ oz. $38 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ leto}^{-1}$. Upoštevajoč, da je bentoški tok Hg in MeHg v oksičnem okolju $59 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ leto}^{-1}$ in $15 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ leto}^{-1}$, lahko ugotovimo sposobnost recikliranja (E) Hg in MeHg z uporabo enačbe 9.

$$E = Hg, MeHg(bentoški \text{ tok}) / (Hg, MeHg(bentoški \text{ tok}) + Hg, MeHg(trajna \text{ depozicija})) \quad \dots(9)$$

ki znaša za Hg približno 0,2%, za MeHg pa 22%.

Če v anoksičnih razmerah upoštevamo bentoški tok Hg $41 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ leto}^{-1}$ in MeHg $110 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ leto}^{-1}$, lahko ugotovimo, da je sposobnost recikliranja (E) v anoksičnem okolju za Hg 0,13%, za MeHg pa kar 74%. Visok delež oz. vsebnost MeHg v Hg_{tot} , ki se sprošča iz sedimenta v vodni stolpec, so ugotovili tudi Hammerschmidt in sodelavci (2004) ob Long Islandu ob vzhodni obali ZDA.

To je pomembno, saj sproščeni MeHg prehaja v vodni stolpec in lahko vstopa v prehranjevalne spletke, na vrhu katerih se nahaja človek. Nevarnost zastrupitve z MeHg zaradi uživanja kontaminiranih morskih sadežev iz Gradeške lagune je največja za lokalno prebivalstvo.

Za sedimente v Tržaškem zalivu je značilna povišana koncentracija živega srebra, kar je v glavnem posledica vnosa Hg z reko Sočo. Tu gre torej za prvotno »naravno« kontaminacijo, ki so jo človekove dejavnosti, zlasti rudarjenje, dodatno okrepile. Velik del Gradeške lagune obsegajo slana mokrišča. Ti ekosistemi so izjemno pomembni pri kroženju živega srebra, saj so pri sproščanju in kopičenju Hg zelo učinkoviti. Zaradi intenzivnega ribištva in marikulture pa je to območje posebno občutljivo.

Povprečna koncentracija Hg in MeHg v sedimentih Gradeške lagune je višja kot povprečna koncentracija v celotnem Tržaškem zalivu in približno enaka koncentraciji Hg v izlivu Soče. Koncentracija MeHg v sedimentu Gradeške lagune pa celo 4-kratno presega koncentracije v izlivu Soče. Koncentracije v pornih vodah so približno enake koncentracijam v pornih vodah Tržaškega zaliva.

6 SKLEPI

Ugotovili smo, da v sedimentu lagune poteka metilacija Hg tudi v oksičnih razmerah, posebno izrazito pa v anoksičnih. Dobljeni rezultati so torej potrdili našo hipotezo, da je metilacija hitrejša v anoksičnem okolju.

Povečani tok MeHg v anoksičnih razmerah je lahko posledica ne le povečane metilacije, temveč tudi upočasnjene demetilacije ter sproščanja MeHg med raztapljanjem železovih in manganovih oksidov, na katere je le-ta vezan. Možno je tudi, da na hitrost metilacije vpliva obarjanje in raztapljanje oksidov, sulfidov in organskih kompleksov s kontrolo razpoložljivega substrata (predvsem HgS).

Analiza pornih vod je pokazala, da je metilacija Hg najhitrejša v vrhnjem sloju sedimenta.

Izračuni so pokazali, da je v sedimentu recikliranje Hg majhno, MeHg pa veliko in dosega v anoksičnem okolju 75 %. Izračun bentoške masne bilance je pokazal, da je sproščanje nastalega MeHg odvisno od porazdelitve med trdno fazo in porno vodo v sedimentu.

Pri načrtovanju našega poskusa nismo vključili meritev produkcije Hg^0 . Za izračun celotne masne bilance Hg bi bilo namreč potrebno upoštevati tudi nastajanje raztopljenega Hg^0 . Spremljati pa bi morali tudi, koliko nastalega Hg^0 izhlapi v zrak. Eksperimentalno teh meritev ni težko izvesti. Pri načrtovanju podobnih poskusov zato priporočamo, da se predvidijo tudi meritve Hg^0 .

Bioremediacija, torej odstranjevanje posledic s Hg kontaminiranih področij, je velik izziv za okoljske strokovnjake, onesnaževalce in lokalne oblasti. Poznavanje in možnost nadzora bentoških pretvorb živega srebra ima tudi praktično uporabno vrednost. Pri tem ima lahko pomembno vlogo kontrola (zadrževanje, zmanjševanje) evτροφikacije in anoksije, ki pospešuje metilacijo, zavira demetilacijo in pospešuje tok MeHg iz porne vode v vodni stolpec, kjer vstopa v prehranjevalne verige. Poznavanje procesov kroženja živega srebra je zelo pomembno za to, da jih bomo lahko nadzorovali in s tem zaščitili organizme pred zastrupitvami. Pri tem je potrebno osveščati čim širši krog ljudi z namenom zaščite okolja in potrošnikov.

7 POVZETEK

Živo srebro je zelo strupen neesencialen element in pomemben polutant, njegovo biogeokemijsko kroženje je globalno. V preteklosti je njegova široka uporaba povzročila več dramatičnih zastrupitev prebivalstva, kar je znatno vplivalo na pospešeno raziskovanje njegovih pretvorb in vplivov na okolje in ljudi. Zmanjševanje porabe živega srebra v svetu je pripomoglo k odločitvi o postopnem zaprtju rudnika v Idriji, ki je bil drugi največji rudnik te kovine na svetu. Kljub prenehanju izkopavanja pa je petstoletna rudarska dejavnost močno mobilizirala živo srebro, zato je območje vzdolž Idrijce, Soče in Tržaškega zaliva še danes zelo onesnaženo.

Mikrobni procesi v morskih in sladkovodnih okoljih vodijo do nastajanja zelo strupenega MeHg. Ta nato prehaja v vodni stolpec, kjer se učinkovito vključuje v prehranjevalne spletke, pri čemer se bioakumulira. Zato je zelo nevaren za organizme, ki se nahajajo na najvišjih trofičnih nivojih, tudi za človeka.

Gradeška laguna v zahodnem delu Tržaškega zaliva sodi v vplivno območje idrijskega rudnika živega srebra. Ker gre za plitev morski ekosistem, ga izkoriščajo za intenzivno marikulturo in ribištvo. Raziskovanje pretvorb in mobilizacije živega srebra je torej pomembno tudi za zaščito zdravja okoliškega prebivalstva, ki uživa ribe in školjke iz lagune.

Izvedli smo inkubacijski poskus z vzorcem sedimenta iz Gradeške lagune. Med inkubacijo smo redno odvezemali vzorce iz vodnega stolpca nad sedimentom, na začetku in na koncu poskusa pa smo iz sedimenta iztisnili porno vodo. V dobljenih vzorcih smo izmerili vsebnost Hg_{tot} , MeHg, O_2 , DIC, $\delta^{13}C - DIC$, DOC, PO_4^{3-} , NO_3^- , NH_4^+ , SiO_4^{4-} , Ca, Mg, Fe in Mn. Na podlagi časovnih sprememb koncentracij smo izračunali bentoške tokove teh snovi.

Ugotovili smo, da na hitrost bentoškega toka Hg odločilno vpliva sprememba redoks potenciala. Ob prehodu v anoksične razmere je hitrost metilacije skokovito narasla, torej metilacija Hg hitreje poteka v anoksičnem okolju. Delež MeHg je namreč ob prehodu iz oksičnega v anoksično okolje narasel na 50-100 % celotnega bentoškega toka Hg. Z analizami ostalih snovi smo ugotovili njihove vplive in povezanost s pretvorbami Hg. Bentoški tok Hg je zelo povezan z anaerobno razgradnjo organske snovi in raztapljanjem Fe in Mn oksidov. Upoštevajoč količine v sedimentu trajno deponiranega Hg in MeHg in pa bentoške tokove obeh zvrsti smo ugotovili, da je v oksičnem okolju sposobnost recikliranja Hg 0,2 %, MeHg pa 22 %. V anoksičnem okolju je sposobnost recikliranja Hg 0,13 %, MeHg pa kar 74 %.

Poznavanje procesov kroženja živega srebra je zelo pomembno za zaščito vseh organizmov pred zastrupitvami. Učinkovito zmanjšanje možnosti kontaminacije lagunarnih prehranjevalnih splotov z MeHg je možno z nadzorovanjem dejavnikov, ki vplivajo na hitrost metilacije in na

bentoški tok MeHg, zlasti preprečevanje eutrofikacije in anoksije. Pri tem ostajajo možnosti bioremediacije, torej odstranjevanja kontaminanta (Hg) iz prizadetih območij, velik izziv.

8 VIRI

- Arčon I., Ogrinc N., Kodre A., Faganeli J. 1999. EXAFS and XANES characterization of sedimentary iron in the Gulf of Trieste (N. Adriatic). *Journal of Synchrotron Radiation*, 6: 659-629.
- ATSDR- Agency of toxic substances and disease registry. 1999. Toxicological profile for mercury. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: 676 str.
- Barkay T., Miller S. M., Summers A. O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 355 – 284
- Barkay T., Wagner-Döbler I. 2005. Microbial transformations of mercury: potentials, challenges, and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Advances in Applied Microbiology*, 57: 1 – 52
- Benvenuti a Grado. 2006.
http://www.grado.it/home_frame.html (30.4.2006): 3 str.
- Berner R.A., 1980. Early diagenesis: A theoretical approach. Princeton, Princeton University Press: 241 str.
- Bloom N.S., Gill G.A., Cappellino S., Dobbs C., McShea L., Driscoll C., Mason R., Rudd J. 1999. Speciation and cycling of mercury in Lavaca Bay, Texas, sediments. *Environmental Science and Technology*, 33: 7-13
- Boening D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40: 1335 – 1351

- Bonzongo J.-C. J., Donkor A. K. 2003. Increasing UV – B radiation at the earth's surface and potential effects on aqueous mercury cycling and toxicity. *Chemosphere*, 52: 1263 – 1273
- Boudreau B.P. 1996. The diffusive tortuosity of fine-grained unlithified sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60: 3139-3142
- Brambati A. 1996. Metalli pesanti nelle lagune di Marano e Grado. 1. ed. Trieste, Regione Autonoma Friuli - Venezia Giulia, Direzione dell' ambiente-Servizio dell' idraulica: 174 str.
- Buzina R., Stegnar P., Buzina – Suboticanec K., Horvat M., Petric I., Farley T.M.M. 1995. Dietary mercury intake and human exposure in an Adriatic population. *Science of the Total Environment* 170: 199 - 208
- Capasso G., Favara R., Grassa F., Inguaggiato S., Longo M. 2003. Automated techniques for preparation and measuring stable carbon isotope of total dissolved inorganic carbon in water samples ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$). V: 7th International Conference on Gas Geochemistry, Freiberg, Germany, 22 – 26 Sept. 2003. Programme & Abstract Book. Katlenburg, Lindau, Copernicus GmbH: 38 – 38
- Compeau G.C., Bartha R. 1985. Sulphate-reducing bacteria: principal methylation of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 498 – 502. Cit po
- Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Brambati A. 1999. Porewater distribution and benthic flux measurements of mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 48: 415 – 428
- Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Brambati A. 2001. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long – term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic sea). *Applied Geochemistry*, 16: 541 – 558

- Covelli S., Faganeli J., DeVittor C., Predonzani S., Aquavita A., Horvat M., Ogrinc N. 2006. Benthic fluxes of mercury species in a lagoonary environment. V pripravi
- Čermelj B., Ogrinc N., Faganeli J. 2001. Anoxic mineralization of biogenic debris in near-shore marine sediments (Gulf of Trieste, northern Adriatic). *Science of the Total Environment*, 266: 143 - 152
- Devereux R., Winfrey M. R., Winfrey J., Stahl D. 1996. Depth profile of sulphate – reducing bacterial ribosomal RNA and mercury methylation in an estuarine sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 20: 23 – 31
- Dyrssen D., Wedborg M. 1991. The sulfur-mercury(II) system in natural waters. *Water Air and Soil Pollution*, 56: 507 – 519
- Emerson S., Hedges J.I. 1988. Processes controlling the organic carbon content of open ocean sediments. *Paleoceanography*, 3: 621 – 634. Cit. po:
- EUROCAT – European catchments & coastal zones – Soča catchment and the Gulf of Trieste. Rende (CS), Istituto sull'inquinamento atmosferico del Consiglio nazionale delle ricerche, (avgust 2004)
<http://www.cs.iaa.cnr.it/EUROCAT/idrija%20english.htm> (15. september 2005): 4 str.
- Faganeli J., Horvat M., Covelli S., Fajon V., Logar M., Lipej L., Čermelj B. 2003. Mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (northern Adriatic sea). *Science of the Total Environment*, 304: 315 – 326
- Gagnon C., Pelletier E., Mucci A., Fitzgerald W.F. 1996. Diagenetic behaviour of methylmercury in organic-rich coastal sediments. *Limnology and Oceanography*, 41: 428-434.

- Garrity G. M., Winters M., Searles D. B. 2001. Taxonomic outline of the procaryotic genera – Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York, Bergey's manual trust in Springer Verlag (julij 2005)
http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline_1_2001.pdf (18.julij 2005): 41 str.
- Gill G.A., Bloom N.S., Cappellino S., Driscoll C.T., Dobbs C., McShea L., Mason R., Rudd J.W.M. 1999. Sediment-water fluxes of mercury in Lavaca Bay, Texas. Environmental Science and Technology, 33: 663-669
- Gill G. 2001. Chemistry of mercury to methylmercury. Ocean Springs, Mississippi-Alabama Sea Grant Consortium (april 2006)
<http://www.masgc.org/mercury/abs-gill.html> (5.4.2006): 1 str.
- Gobeil C., Cossa D., 1993. Mercury in sediments and sediment pore water in the Laurentian Trough. Canadian Journal of Fishery and Aquatic Science, 50: 1794 – 1800
- Golding G.R., Kelly C.A., Sparling R., Loewen P.C., Rudd J.W.M., Barkay T. 2002. Evidence for facilitated uptake of Hg(II) by *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* under anaerobic and aerobic conditions. Lymnology and Oceanography, 47: 967 - 975
- Gordon G., Skett P. 1986. Introduction to drug metabolism. New York, Chapman and Hall: 350 str. Cit po: Boening D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. Chemosphere, 40: 1335 – 1351
- Gosar M., Pirc S., Bidovec M. 1997. Mercury in the Idrijca River sediments as a reflection of mining and smelting activities in the Idrija mercury mine. Journal of Geochemical Exploration, 58: 125 – 131

Grasshof P.N., Ehrhardt, M., Kremling, K. 1983. Methods of seawater analyses. Weinheim, Verlag Chemie: 419 str.

Grado. 2006. Wikipedia, the free encyclopedia :

<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:NASA7-722-46H-s.jpg> (2. maj 2006): 1 str.

Gulf of Trieste. 2006. Wikipedia, the free encyclopedia :

http://en.wikipedia.org/wiki/Gulf_of_Trieste (2. maj 2006): 1 str.

Hammerschmidt C. R., Fitzgerald W. F. 2004. Geochemical control on the production and distribution of methylmercury in near-shore marine sediments. Environmental Science and Technology, 38: 1487-1495

Hammerschmidt C. R., Fitzgerald W. F., Lamborg C. H., Balcom P. H., Visscher P. T. 2004. Biogeochemistry of methylmercury in sediments of Long Island Sound. Marine Chemistry, 90: 31 – 52

Heimlich J.E. 2002. Extension fact sheet - The invisible environment series: Mercury.

Columbus, Ohio State University (28. marec 2002).

<http://ohioline.osu.edu/cd-fact/0200.html> (29. april 2006): 2 str.

Hines M.E., Faganeli J., Planinc R. 1997. Sedimentary anaerobic microbial biogeochemistry in the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea: Influences of bottom water oxygen depletion. Biogeochemistry, 39: 65 - 86

Hines M.E., Horvat M., Faganeli J., Bonzongo J.C.J., Barkay T., Major E.B., Scott K.J., Bailey E.A., Warwick J.J., Lyons W.B. 2000. Mercury biogeochemistry in the Idrija river, Slovenia, from above the mine into the Gulf of Trieste. Environmental Research, 83: 129 - 139

- Hines M. E., Faganeli J., Horvat M. 2004. Methylation and demethylation of mercury throughout the Idrija River system. V: 7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant, Part 2 – Biogeochemistry, Ljubljana, 27. junij – 2. julij 2004. RMZ – Materials and Geoenvironment: Periodical for Mining, Metallurgy and Geology = RMZ – Materiali in geookolje: revija za rudarstvo, metalurgijo in geologijo, 51: 1060 – 1063
- Hines M.E., Faganeli J., Adatto I., Horvat M. 2006. Microbial mercury transformations in marine, estuarine and freshwater sediments downstream of the Idrija mercury mine, Slovenia. Applied Geochemistry, v tisku
- Horvat M., Liang L., Bloom N.S. 1993. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples, Part II – Water. Analytica Chimica Acta, 282: 153 – 168
- Horvat M., Jereb V., Fajon V., Logar M., Kotnik J., Faganeli J., Hines M. E., Bonzongo J. – C. 2002. Mercury distribution in water, sediment and soil in the Idrijca nad Soča river systems. Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis, 2: 287 – 296
- Horvat M., Kontić B., Kotnik J., Ogrinc N., Jereb V., Fajon V., Logar M., Faganeli J., Rajar R., Sirca A., Petkovšek G., Zagar D., Dizdarevič T. 2003. Remediation of mercury polluted sites due to mining activities. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 33: 291 – 296
- Jensen S., Jernelöv A. 1960. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. Nature, 223: 753 - 754
- Johnson K.M., Burney C.M., Sieburth J.M. 1982. Enigmatic marine ecosystem metabolism measured by direct diel tot. CO₂ and O₂ flux in conjunction with DOC release and uptake. Marine Biology, 65: 49 – 60

- Kelly C.A., Rudd J.W., Holoka M.H. 2003. Effect of pH on mercury uptake by an aquatic bacterium: implications for Hg cycling. *Environmental Science and Technology*, 37: 2941 - 2946
- King J. K., Harmon S. M., Fu T. T., Gladden J. B. 2002. Mercury removal, methylmercury formation and sulfate-reducing bacteria profiles in wetland mesocosms. *Chemosphere*, 46: 859 – 870
- Klaassen C.D., Amdur M.O., Doull J. 1986. *Toxicology, the basic science of poisons*. 3rd ed. New York, Macmillan: 974 str. Cit. po: Boening D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40: 1335 – 1351
- Laguna di Grado. 2004. Lignano Sabbiadoro (UD), Istituto comprensivo »Giosue' Carducci« - Scuola secondaria di primo grado (28. junij 2004)
http://scuolamedia.lignano.org/ipertesti/zone_um/laguna_di_grado.htm (15. junij 2006): 2 str.
- Mason R., Fitzgerald W. 1996. The global mercury cycle: oceanic and anthropogenic aspects. V: *Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances*. Bayens W. (ed.). Dordrecht, Kluwer Academic: 85 – 108
- Mason R.P., Fitzgerald .W.F, Hurley J., Hanson A.K., Donaghay P.L., Sieburth J.M. 1993. Mercury biogeochemical cycling in a stratified estuary. *Limnology and Oceanography*, 38: 1227 – 1241
- Mercury. 2006. Wikipedia, the free encyclopedia :
<http://en.wikipedia.org/wiki/Mercury/Element> (2.maj 2006): 9 str.
- Mestni muzej Idrija. 1995. 500 let rudnika živega srebra in mesta Idrije (osrednja muzejska razstava). Idrija, Mestni muzej Idrija, grad Gewerkenegg, Prelovčeva 9, 5280 Idrija

- Nascimento M. A., Chartone – Souza E. 2003. Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. Ribeirão Preto, Fundação de Pesquisas Científicas, Genetic Molecular Research online journal. (2003)
http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0005_full_text.htm (29.april 2006): 10 str.
- Ogrinc N., Faganeli J., Pezdič J. 2003. Determination of organic carbon remineralization in near-shore marine sediments (Gulf of Trieste, northern Adriatic) using stable carbon isotopes. *Organic Geochemistry*, 34: 681- 692
- Ogrinc N., Faganeli J. 2006. Phosphorous regeneration and burial in near-shore marine sediments (Gulf of Trieste, northern Adriatic sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67: 579 - 588
- Oremland R. S., Culbertson C. W., Winfrey, M. R. 1991. Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures - involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 130 – 137
- Rizzo W.W. 1990. Nutrient exchange between the water column and a subtidal benthic microalgal community. *Estuaries*, 13: 219 – 226
- Sayles F.L., Curry W.B. 1988. $\delta^{13}\text{C}$, TCO_2 and the metabolism of organic carbon in deep sea sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52: 2963 – 2978. Cit. po
- Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. 1993. *Environmental organic chemistry*. New York, Wiley: 681 str.

- Sellers P., Kelly C.A., Rudd J.W.M., MacHutchon A.R. 1996. Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature*, 380: 694 – 697 :Cit.po
- Stamenkovic J., Gustin M. S., Marvin – DiPasquale M. C., Thomas B. A., Agee J.L. 2004. Distribution of total and methyl mercury in sediments along Steamboat Creek (Nevada, USA). *Science of the Total Environment*, 322: 167 – 177
- Sugio T., Iwahori K., Takeuchi F., Negishi A., Maeda T., Mamimura K. 2001. Cytochrome c oxidase purified from a mercury-resistant strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans* volatilizes mercury. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92: 44 – 49
- Ullrich S. M., Tanton T. W., Abdrashitova S. A. 2001. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31: 241 – 293
- Wood J.M. 1984. Alkylation of metals and the activity of metal-alkyls. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 7: 229 – 240 . Cit po