

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Neža KORON

**BENTOŠKE PRETVORBE ŽIVEGA SREBRA V PREHODIH MED
OKSIČNIM IN ANOKSIČNIM OKOLJEM V TRŽAŠKEM ZALIVU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BENTHIC TRANSFORMATIONS OF MERCURY AT THE OXIC-
ANOXIC TRANSITIONS IN THE GULF OF TRIESTE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Kemijske analize so bile opravljene na Morski biološki postaji v Piranu in na Odseku za znanost o okolju na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

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

Mentor: prof. dr. Jadran FAGANELI
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

Datum zagovora: 3. julij 2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Neža Koron

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 504.5:502.51(282.05):546.49(043)=163.6
KG	ekologija/živo srebro/metilacija Hg/Jadransko morje/Tržaški zaliv/morski sedimenti/vodni stolpec/bentoške pretvorbe
AV	KORON, Neža
SA	FAGANELI, Jadran (mentor)/MANDIĆ MULEC, Ines (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	BENTOŠKE PRETVORBE ŽIVEGA SREBRA V PREHODIH MED OKSIDNIM IN ANOKSIDNIM OKOLJEM V TRŽAŠKEM ZALIVU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 65 str., 6 pregl., 10 sl., 77 vir.
IJ	sl
Jl	sl/an
AI	Živo srebro (Hg) je strupen, neesencialen element, dovzeten za biotske in abiotske pretvorbe. Biogeokemija Hg je kompleksna in globalna. Pri njegovem kroženju igrajo osrednjo vlogo mikroorganizmi. Pomembni so predvsem zaradi sposobnosti metilacije Hg v najbolj toksično obliko, MeHg. MeHg se zaradi vezave z tiolnimi (–SH) skupinami proteinov kopiči v prehranjevalnih verigah in spletih. Človek je toksičnim učinkom MeHg izpostavljen zlasti preko uživanja morske hrane, zato se večji del pozornosti namenja pretvorbam Hg v morskem okolju. Primer slednjega je tudi Tržaški zaliv. Vanj se preko rek Idrijce in Soče že več kot 500 let izplavlja dediščina drugega največjega rudnika Hg na svetu, idrijskega rudnika. Poznavanje vplivov različnih dejavnikov okolja na pretvorbe Hg je še vedno pomanjkljivo. Zato smo v sredini Tržaškega zaliva odvzeli vzorec sedimenta in ga 26 dni inkubirali v temi. V tem času smo dnevno vzorčili vodni stolpec in v vzorcih določali koncentracije Hg _{tot} in MeHg ter drugih kemijskih zvrsti, s katerimi smo opisali mikrobne procese, ki vplivajo na spreminjanje koncentracij Hg. Eksperiment smo razdelili v tri faze: aerobno, anaerobno in fazo reoksigenacije. Ugotovili smo, da v aerobni fazi verjetno potekata procesa metilacije in demetilacije približno enako hitro, v anaerobni fazi metilacija močno prevladuje, tok v vodni stolpec pa je povečan tudi zaradi spremenjenih redoks razmer, ki vplivajo na raztapljanje Fe-oksihidroksidov in alumosilikatov, na katere je vezan Hg. V fazi reoksigenacije pride do hitrega znižanja koncentracije MeHg v vodnem stolpcu, kar je posledica povečane demetilacije in readsorpcije MeHg na netopne anorganske in organske snovi. Anaerobioza je v Tržaškem zalivu problematična, saj pride enkrat letno do stratifikacije vodnega stolpca, nastanek anaerobioze pa je pospešen tudi zaradi lahko razgradljive organske snovi, ki vstopa vanj. Učinkovita bioremediacija tega kontaminiranega okolja je verjetno še precej oddaljena.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 504.5:502.51(282.05):546.49(043)=163.6
CX	ecology/mercury/Hg methylation/Adriatic sea/Gulf of Trieste/marine sediments/water column/benthic transformations
AU	KORON, Neža
AA	FAGANELI, Jadran (supervisor)/MANDIĆ MULEC, Ines (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2008
TI	BENTHIC TRANSFORMATIONS OF MERCURY AT THE OXIC-ANOXIC TRANSITIONS IN THE GULF OF TRIESTE
DT	Graduation thesis (university studies)
NO	X, 65 p., 6 tab., 10 fig., 77 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Mercury (Hg) is toxic, nonessential element, susceptible for biotic and abiotic transformations. Biogeochemistry of Hg is complex and global. Microorganisms play pivotal role in its biogeochemical cycling. Microbial transformations include methylation of Hg to the most toxic form of Hg, MeHg. Due to its interactions with thiol (-SH) groups of proteins MeHg is capable of biomagnifying in aquatic food chains. The major route of human exposure to MeHg is through consumption of contaminated fish. This is also the reason why public health concern is focused on transformations of Hg in aquatic environment. Gulf of Trieste is an example of contaminated aquatic environment. Pollution of the gulf is a result of 500-year mining activity in the second largest Hg mine in the world, the Idrija Mine. Influence of different environmental factors on transformations of Hg is still poorly understood. Benthic transformations of Hg (and nutrients) and fluxes were measured in a microcosm laboratory experiment, using dark benthic flux chamber. Incubation of sediment lasted for 26 days and included three phases: oxic, anoxic and reoxygenation phase. The data showed no noticeable flux of MeHg to water column in oxic phase, which may be due to similar methylation and demethylation rates. Flux of MeHg to water column increased in anoxic phase. This is a result of enhanced methylation and solubility of Fe-oxyhydroxides, which act as complexing agents of Hg in aquatic sediment. In a reoxygenation phase concentrations of MeHg and Hg _{tot} in water column dropped rapidly. This is a result of enhanced demethylation and readsorption to insoluble organic and inorganic matter. Anoxic conditions at sediment-water interphase in Gulf of Trieste are quite common due to yearly stratification of water column and high influx of labile, easy degradable organic matter. Remediation of this severely contaminated environment remains a challenge.

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 HIPOTEZE IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA	4
2 PREGLED OBJAV	6
2.1 EKOTOKSIKOLOGIJA Hg IN POTREBA PO (BIO)REMEDIACIJI	7
2.2 BIOGEOKEMIJSKO KROŽENJE Hg	9
2.2.1 Vloga mikroorganizmov	14
2.2.1.1 Mikrobna metilacija Hg	14
2.2.1.1.1 Biokemijski mehanizmi metilacije	15
2.2.1.2 Demetilacija MeHg	16
2.2.2 Bakterije in mehanizmi odpornosti proti Hg	18
2.2.2.1 Operon <i>mer</i>	19
2.3 VPLIV DEJAVNOSTI V IDRIJSKEM RUDNIKU NA POREČJE IDRIJCE IN SOČE TER NA TRŽAŠKI ZALIV	23
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 VZORČENJE	27
3.2 PRIPRAVA VZORCEV	28

3.3	ANALIZE RAZTOPLJENEGA Hg_{tot} in MeHg	30
3.3.1	Analize raztopljenega MeHg	30
3.3.1.1	Ekstrakcija MeHg	30
3.3.1.2	Postopek etilacije in merjenja	31
3.3.2	Analize celokupnega raztopljenega Hg (Hg_{tot})	33
3.3.3	Izračun koncentracij Hg_{tot} in MeHg v vzorcih	35
3.4	PREOSTALE ANALIZE	37
3.4.1	Analize kisika (O_2)	37
3.4.2	Analiza vodikovega sulfida (H_2S) in nutrientov	37
3.4.3	Analize fluorescirajoče raztopljene organske snovi (FDOM – fluorescent dissolved organic matter)	37
3.4.4	Analize vsebnosti DIC	38
3.4.5	Analize vsebnosti Fe	38
4	REZULTATI	39
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	49
5.1	RAZPRAVA	49
5.1.1	Bentoški procesi in tokovi	49
5.1.2	Pomen za Tržaški zaliv	52
5.2	SKLEPI	53
6	POVZETEK	55
7	VIRI	57

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Pregled pretvorb v biogeokemijskem kroženju Hg (Barkay in sod., 2003: 358)	18
Pregl. 2: Pregled funkcij posameznih proteinov, kodiranih v operonu <i>mer</i> (Barkay in sod., 2003)	22
Pregl. 3: Okoljske razmere na postajah CZ, BAR in AA1 v Tržaškem zalivu (Hines in sod., 2000; Hines in sod. 2006)	26
Pregl. 4: Masne in molske koncentracije Hg_{tot} in MeHg v vzorcih vodnega stolpca ter molski odstotek MeHg v Hg_{tot}	39
Pregl. 5: Hitrost spreminjanja koncentracij analiziranih snovi v vodnem stolpcu med eksperimentom v bentoški posodi	46
Pregl. 6: Snovni tokovi analiziranih snovi med eksperimentom v bentoški posodi	48

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Fontana s Hg avtorja Alexandra Calderja, ustvarjena v spomin Frankovi zasedbi mesta Almadén, kjer se nahaja največji in še delujoči rudnik Hg na svetu (prvič razstavljena leta 1937) (Mercury fountain, 2008)	1
Sl. 2:	Shema biogeokemijskega kroženja Hg v okolju (Barkay in sod., 2003: 357)	9
Sl. 3:	Razmerje koncentracij in relativna termodinamska stabilnost različnih zvrsti Hg v sladki in morski vodi (Ullrich in sod, 2001: 244)	13
Sl. 4:	Shema tipičnega operona <i>mer</i> pri Gram negativnih (G-) bakterijah. Geni in njihovi produkti, ki so zapisani v oklepaju, se ne pojavljajo pri vseh organizmih oz. v vseh operonih <i>mer</i> (Barkay in sod., 2003: 360)	20
Sl. 5:	Satelitska slika Tržaškega zaliva z označeno postajo CZ	27
Sl. 6:	Spreminjanje koncentracij Hg_{tot} v vodnem stolpcu med eksperimentom v bentoški posodi	40
Sl. 7:	Spreminjanje koncentracij MeHg v vodnem stolpcu med eksperimentom v bentoški posodi	41
Sl. 8:	Spreminjanje deleža MeHg v Hg_{tot} v posamezni fazi eksperimenta v bentoški posodi	42
Sl. 9:	Spreminjanje koncentracij O_2 , NO_3^- in NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , H_2S , FDOM, DIC in Fe v vodnem stolpcu med eksperimentom v bentoški posodi	45
Sl. 10:	Obarvanost sedimenta zaradi obarjanja Fe^{2+} v obliki FeS_2 in rumeno-rdeča usedlina Fe_2O_3 na površini sedimenta (posledica postopne oksigenacije)	47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Hg	oznaka se v tekstu nanaša na vse oblike živega srebra, drugačna uporaba oznake oz. okrajšave je v tekstu posebej navedena
Hg_{tot}	oznaka se v naših rezultatih nanaša na celokupno raztopljeno Hg, ki smo ga v vodnem stolpcu izmerili po filtraciji vzorcev skozi filtre z velikostjo por 0,45 µm
MeHg	oznaka se nanaša na raztopljeno monometilno Hg (CH ₃ -Hg ⁺) v vzorcih, filtriranih skozi filtre s porami 0,45 µm
SRB	sulfat reducirajoče bakterije
ŽRB	železo reducirajoče bakterije
CZ	raziskovalna točka v sredini Tržaškega zaliva, kjer je bil odvzet sediment za izvedbo eksperimentalnega dela diplomske naloge (Center Zaliva)
US EPA	United States Environmental Protection Agency
CV AFS	angl. cold vapour atomic fluorescence spectrometry ali atomska fluorescenčna spektrometrija hladnih par (AFS HP)
CV AAS	angl. cold vapour atomic absorption spectrometry ali atomska absorpcijska spektrometrija hladnih par (AAS HP)

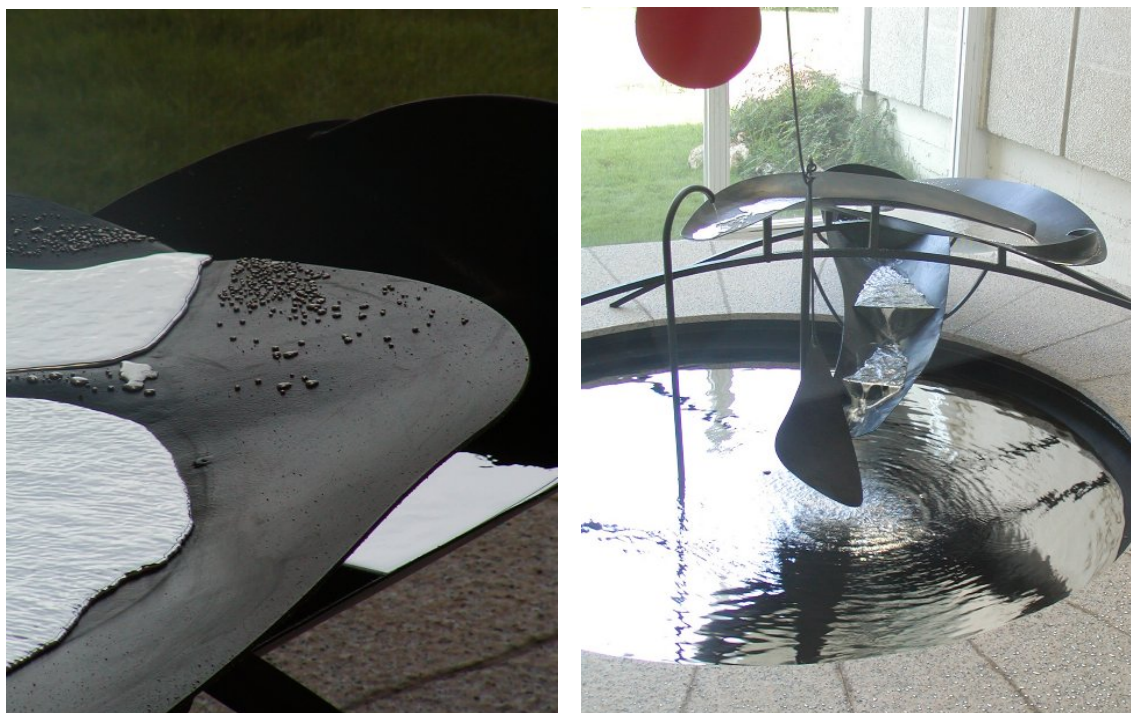
SLOVARČEK

Biogeokemijsko kroženje	kroženje elementov, prisotnih v živih organizmih, med organizmi (biotska faza) in njihovim neživim okoljem (abiotska faza)
Metilacija	dodajanje metilne skupine (CH ₃ -) na atom ali molekulo
Demetilacija	odstranitev metilne skupine z atoma ali molekule
<i>in situ</i>	lat. na mestu, v našem primeru uporabljeno v kontekstu, da je bil eksperiment izveden pri enakih okoljskih pogojih, kot so vladali na mestu odvzema vzorca
Vodni stolpec	voda nad sedimentom
Bioakumulacija	povišanje koncentracij neke snovi v tkivih živih organizmov v primerjavi s koncentracijo te snovi v okolju
Bioremediacija	dekontaminacija ali čiščenje nekega onesnaženega okolja z uporabo živih organizmov
Biomagnifikacija	sukcesivno višanje koncentracij nekega polutanta v tkivih živih organizmov ob prehodu iz enega trofičnega nivoja prehranjevalne verige v naslednjega

1 UVOD

Živo srebro, ki ga v periodnem sistemu elementov najdemo pod oznako Hg, je v zemeljski skorji izjemno redko zastopan kemijski element (0,08 ppm) in se po svoji pogostosti pojavljanja v skorji uvršča na 67. mesto (Mercury (element), 2008).

Zaradi svojih izjemnih lastnosti, kot npr., da je edina kovina, ki je v tekočem agregatnem stanju tako pri normalnih pogojih ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p=101,3\text{ kPa}$) kot tudi pri standardnih pogojih ($T=0\text{ }^{\circ}\text{C}$ oz. $273,15\text{ K}$, $p=101,3\text{ kPa}$), da tvori zmesi (amalgame) z večino kovin (posebno zanimivo zaradi zmesi s srebrom in zlatom) – pri tem sta izjemi platina in železo, da je koeficient temperaturnega raztezanja konstanten ipd., je bil v preteklosti izjemno privlačen za uporabo v različnih panogah in prisoten v veliko končnih izdelkih.



Slika 1: Fontana s Hg avtorja Alexandra Calderja, ustvarjena v spomin Frankovi zasedbi mesta Almadén, kjer se nahaja največji in še delujoči rudnik Hg na svetu (prvič razstavljena leta 1937) (Mercury fountain, 2008)

Ljudje so Hg pogosto pripisovali takšne in drugačne zdravilne lastnosti, resnica o njegovih domnevno blagodejnih učinkih pa je popolnoma drugačna. Čeprav je bila uporaba Hg široko razširjena že v času starih Egipčanov ter kasneje Grkov in Rimljanov, so ljudje v nenevarnost njegove uporabe prvič podvomili ob pojavu poklicnih bolezni, opaženih predvsem pri rudarjih v rudnikih Hg in izdelovalcih klobukov.

Dandanes vemo, da je Hg izjemno toksičen element, ki se je zaradi donedavne široke uporabe v okolju močno razširil. Posledice, danes prepoznane kot nespametne uporabe elementnega Hg in njegovih organskih in anorganskih derivatov, se kažejo v povečani koncentraciji tega elementa v okoljih in ekosistemih, kjer je sicer naravno prisoten v zelo nizkih koncentracijah. Najbolj prizadeta območja so predvsem površinske vode in njihovi sedimenti, pa tudi morski sedimenti. Hg uvrščamo na seznam globalnih polutantov, saj kompleksna biogeokemija povzroča neprestano kroženje z zemeljske površine v atmosfero in nazaj, zaradi česar nobeno okolje ne ostane nedotaknjeno in neprizadeto.

Vire Hg v okolju razdelimo na naravne in antropogene. Najpomembnejši naravni viri so vulkani, skupno pa naj bi naravni viri prispevali kar polovico vseh atmosferskih emisij Hg. Druga polovica je posledica človekove dejavnosti, ki je izrazito aktualna šele od industrijske revolucije, torej od konca 18. stoletja naprej. Hylander in Meili (2003) v svojem preglednem članku kot najpomembnejše gospodarske dejavnosti, ki prispevajo k atmosferski depoziciji Hg, navajata termoelektrarne, ki delujejo na premog ali plin, pri katerem Hg ni bilo odstranjeno, industrijo pridobivanja zlata, industrijo pridobivanja kovin, pri kateri so zlasti problematične topilnice, cementarne, odlagališča z odpadki, kjer so za okolje obremenjujoče predvsem zažigalnice, kloroalkalno industrijo (pridobivanje klora (Cl_2) in natrijevega hidroksida (NaOH)) ter železarsko in jeklarsko industrijo.

Zaradi bremena, ki ga v okolju predstavlja Hg, so raziskovalci in predstavniki industrije osredotočeni primarno na omejevanje dodatnih izpustov Hg v okolje. Tako obstaja več mednarodnih in tudi nacionalnih direktiv, ki delujejo predvsem na preventivnem nivoju. Ena od nacionalnih direktiv, H2E (Hospitals for Healthy Environment), ki se izvaja v Združenih državah, je plod sodelovanja med United States Environmental Protection Agency (US EPA) in American Hospital Association (AHA). Prizadeva si za omejevanje

količine nevarnih odpadkov, ki nastajajo v bolnišnicah in drugih zdravstvenih ustanovah. Velik poudarek je tudi na omejevanju uporabe Hg v zdravstvu, saj naj bi bilo slednje po količini odpadnega Hg kar četrti največji antropogeni vir tega elementa v okolju (Zimmer in McKinley, 2008).

Za uspešno načrtovanje, delovanje in uveljavljanje takšnih direktiv je potrebno prepoznati vse antropogene vire Hg, prav tako pa je nujno tudi poznavanje vseh dejavnikov okolja, ki vplivajo na kroženje Hg v njem.

Hg v okolje vstopa tudi po drugih poteh. Ponavadi gre za odtekanje v tla. Izjemno pomemben, a prezrt vir Hg, so še delujoči rudniki Hg (Hylander in Meili, 2003). Omembe vreden vir so tudi odlagališča odpadkov, med katerimi se lahko znajdejo izdelki, ki vsebujejo Hg. Rešitev za zmanjšanje s tem povezanega onesnaževanja je osveščanje javnosti, kako naj ob izteku uporabe ravna z izdelki, ki vsebujejo Hg. Velik poudarek je tudi na izdelavi in uporabi alternativnih izdelkov, ki Hg ne vsebujejo.

Hg se je kot fungicid in pesticid redno uporabljalo v agronomiji, kar je povzročilo obsežne depozicije Hg v okolje. Poleg tega je prišlo zaradi uporabe monometilnega Hg (MeHg) kot fungicida v Iraku v 70. letih prejšnjega stoletja do množične zastupitve prebivalstva.

Ekološki in toksikološki vplivi Hg na človeka in živali ter rastline so močno odvisni od kemijske oblike, v kateri se element nahaja. Ker lahko posamezne anorganske oblike prehajajo oz. se pretvarjajo v organske in obratno, je težko napovedati, kako se bo element v okolju obnašal (Ullrich in sod., 2001). Poznavanje in obvladovanje posledic delovanja Hg v okolju je izjemno pomembno, a tudi izjemno zahtevno.

Biogeokemijskemu kroženju je namenjene veliko pozornosti raziskovalcev. Pri kroženju Hg pomembno oz. osrednjo vlogo igrajo mikrobni procesi, ki obsegajo redukcijo Hg^{2+} , oksidacijo Hg^0 , metilacijo Hg in demetilacijo MeHg. Pri zadnjih dveh so pomembne predvsem anaerobne bakterije, zlasti sulfat reducirajoče bakterije (SRB).

V obalnih morjih in estuarijih so pomembna mesta mikrobnih pretvorb Hg predvsem sedimenti, ki so pod vplivom vnosov Hg s sladkovodnimi pritoki. Tak primer je tudi Tržaški zaliv, kamor se že petsto let zlivajo naplavine reke Soče, močno obremenjene s Hg iz idrijskega rudnika Hg. Dosedanje raziskave so pokazale, da Hg v zaliv vstopa večinoma v obliki delcev cinabarita (HgS), ki se nato posedajo v estuariju in zlivnem področju Soče v Tržaškem zalivu. Sedimentirani HgS je lahko nato substrat za mikrobne pretvorbe, od katerih prevladujeta predvsem metilacija Hg in demetilacija MeHg. Raziskave kažejo, da sta nasprotna procesa enako hitra, tokova pa odvisna od koncentracije substata (Hines in sod., 2000). MeHg se iz pornih vod sedimenta sprošča v vodni stolpec, od koder nato vstopa v prehranjevalne verige in splet. Preko teh tako vpliva na marikulturo in človeka, ki je kot najvišji člen prehranjevalne verige najbolj dovzeten za posledice in učinke bioakumulacije MeHg.

1.1 HIPOTEZE IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA

Bentoške pretvorbe Hg so danes predmet intenzivnih raziskav in obsegajo metilacijo Hg, demetilacijo MeHg v povezavi z redukcijo sulfata, bentoške tokove na meji sediment-voda in prehod v vodni stolpec ter prehranjevalne verige in splet.

Še vedno ostaja odprta problematika sprememb procesov ob prehodu iz oksidnega v anoksidno in nato iz anoksidnega v ponovno oksidno okolje. Pričujoče diplomsko delo oz. raziskava je osredotočena na omenjeni problem. Dosedanje raziskave mikrobnih biogeokemijskih pretvorb Hg v sedimentih Tržaškega zaliva so pokazale, da anoksija na meji sediment-voda pospešuje metilacijo in zavira demetilacijo, prav tako pa ob spremenjenih redoks razmerah pospešuje remobilizacijo Hg in MeHg iz sedimenta v zgoraj ležečo vodo. Spremenjene redoks razmere obsegajo predvsem redukcijo Fe^{3+} in raztapljanje kovinskega oksida.

Glede na do danes pridobljeno znanje sklepamo, da bodo hitrosti nastajanja raztopljenega Hg in MeHg ter bentoških tokov na meji sediment-voda povečane v odsotnosti kisika in zmanjšane ob ponovni reoksigenaciji.

Za potrditev hipoteze smo izvedli laboratorijski poskus z inkubacijo morskega sedimenta, odvzetega na postaji CZ v sredini Tržaškega zaliva. Inkubacija je potekala v temi, s čimer smo onemogočili aktivnost primarnim producentom, predvsem bentoškim mikroalgam, pri *in situ* temperaturi, ki je v morju v mesecu oktobru (2007) znašala 20 °C. Inkubacija v temi je prav tako preprečevala fotokatalitično razgradnjo nastajajočega MeHg. Vzorce vodnega stolpca smo odvijali v enakih časovnih intervalih in v njih izmerili vsebnost raztopljenega celokupnega Hg (Hg_{tot}) in raztopljenega MeHg. Določali smo tudi vsebnosti nekaterih končnih akceptorjev elektronov (O_2 in NO_3^-), nastanek H_2S kot posledico redukcije SO_4^{2-} , spremljali smo spreminjanje koncentracij raztopljenega Fe^{2+} . Fe^{3+} lahko v anaerobnem metabolizmu služi kot končni akceptor elektronov. Spremljali smo tudi spreminjanje koncentracij amonija (NH_4^+) in fosfata (PO_4^{3-}). Slednja sta produkta razgradnje organske snovi. Tekom poskusa smo spremljali pH in alkalnost (za izračun koncentracij raztopljenega anorganskega ogljika (DIC – angl. dissolved inorganic carbon)) ter spreminjanje koncentracij raztopljene organske snovi (DOM – angl. dissolved organic matter). Na podlagi izmerjenih vrednosti smo lahko ovrednotili posamezne mikrobne procese, ki vplivajo na produkcijo posameznih vrst Hg.

2 PREGLED OBJAV

Hg je kemijski element, ki ga v periodnem sistemu elementov najdemo med prehodnimi elementi. Kemijska oznaka živega srebra Hg izhaja iz latinskega jezika, iz besede *hydrargyrum*, ki pomeni tekoče srebro. Hg ima atomsko število 80 in atomsko maso 200,59. Je ena izmed petih kovin in skupno šestih elementov, ki se pri normalnih pogojih ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p=101,3\text{ kPa}$) nahajajo v tekočem agregatnem stanju, izmed teh šestih elementov pa sta le Hg in brom (Br) v tekočem agregatnem stanju tudi pri standardnih pogojih ($T=0\text{ }^{\circ}\text{C}$ oz. $273,15\text{ K}$, $p=101,3\text{ kPa}$). Ob izpostavitvi zelo visokim tlakom (7640 atm oz. 774 MPa) postane Hg trden, omenjena vrednost pa se uporablja kot enota za merjenje zelo visokih tlakov. Za Hg je značilna tudi superprevodnost, kadar je ohlajeno na dovolj nizko temperaturo (Mercury (element), 2008).

Hg je znano že iz časa Egipčanov, vendar ga je kot element prvič opisal francoski kemik Antoine Lavoisier v 18. stoletju, v času francoske revolucije (Mercury (element), 2008). Prav iz tistega časa iz Francije prihaja tudi metoda uporabe Hg pri izdelavi klobukov. Zastrupitev s Hg pri klobučarjih je bila tako pogosta, da se je za vse ljudi, ki so izkazovali znake mentalnih bolezni oz. niso izpolnjevali kriterijev 'normalnega' človeka, razvil izraz nor kot klobučar (angl. mad as a hatter). V ZDA so leta 1943 zaradi pritiska sindikata klobučarjev uporabo Hg prepovedali in razvili nove metode, ki so ga nadomestile.

Za Hg je značilna tvorba zmesi z različnimi kovinami, med katerimi sta izjemi platina in železo. Ker je slednji najbolj pogost element v zemeljski skorji in s Hg ne reagira, je to v zemeljski zgodovini povzročilo, da je Hg v skorji prisoten na relativno omejenih, a skoncentriranih območjih. Hg lahko najdemo vezano v spojine, kot so cinabarit (HgS), metacinabarit in hipercinabarit, redkeje pa kot samorodno (elementno) Hg. Najpogostejša oblika Hg je cinabarit. Tvorba stabilnih kompleksov s žveplom in njegovimi spojinami je za Hg zelo značilna in pomembno vpliva na njegovo obnašanje v okolju.

2.1 EKOTOKSIKOLOGIJA Hg IN POTREBA PO (BIO)REMEDIACIJI

Ekotoksikologijo je leta 1977 definirala Truhaut. Opredelila jo je kot vejo toksikologije, ki se ukvarja s preučevanjem toksičnih vplivov naravnih ali sintetičnih onesnaževalcev na mikrobe, rastline, živali (vključno s človekom) in preko njih na integriteto ekosistema.

Človeku najbolj nevarni obliki Hg sta Hg^0 in MeHg. Prvi v človeško telo vstopa z vdihovanjem par, MeHg pa v telo največkrat vstopa ob uživanju kontaminirane morske hrane. MeHg velja za bolj toksičnega, saj smo mu ljudje oz. večina vretenčarjev pogosteje izpostavljeni, poleg tega pa naša telesa nimajo detoksifikacijskih mehanizmov, ki bi omogočali učinkovito odstranjevanje MeHg iz telesa. Boening (2000) v svojem članku povzema, da MeHg ob zaužitju iz krvnega obtoka vstopa v jetra, od tu pa se z žolčem sprošča v črevesje, vendar se nato z blatom ne izloči. Tako pride do resorpcije in ponovnega vstopa MeHg v krvni obtok. Ta pojav je pravzaprav glavni mehanizem bioakumulacije, imenujemo pa ga enterohepatično kroženje. MeHg iz krvi prehaja v tkiva, kjer reagira s citoplazemskimi in jedrnimi proteini. Značilna je tudi sposobnost prestopa krvno-encefalne in placentalne bariere. Ta sposobnost predstavlja nevarnost razvijajočim se organizmom.

MeHg ima visoko afiniteto do tiolnih ($-SH$) skupin proteinov, vezava nanje vpliva na njihove funkcijske sposobnosti (Barkay in Wagner-Döbler, 2005), poleg tega pa je to tudi mehanizem bioakumulacije in biomagnifikacije.

Posledice kronične izpostavljenosti različnim kemijskim vrstam Hg se lahko pojavijo v različnih organskih sistemih človeka. Ponavadi gre za nevrološke težave, ki se lahko kažejo tudi kot zmanjšana motorična sposobnost, Hg pa lahko vpliva še na kardiovaskularni, imunski in reproduktivni sistem (Zahir in sod., 2005).

V preteklosti je večkrat prišlo do akutnih zastrupitev velikega števila ljudi s Hg, kar je pritegnilo pozornost številnih raziskovalcev. Tako so npr. v Iraku raziskovalci poskušali ugotoviti, kako je uživanje z MeHg tretirane hrane pri nosečih materah vplivalo na nadaljni razvoj otroka. Rezultati raziskav so pokazali, da bi lahko bila koncentracija 10 ppm MeHg,

izmerjena v laseh matere, dober kazalec za potencialno nevarnost pojava nevroloških deformacij pri razvijajočem se fetusu (Cox in sod., 1995).

Izmerjena vrednost je izpostavila nov problem. Podobne vrednosti so namreč pogosto izmerili pri predstavnikih različnih skupnosti, ki se v glavnem prehranjujejo z ribami in morskimi sesalci. To bi lahko kazalo na precejšnjo ogroženost veliko večjega števila ljudi.

Zaradi omenjenih izsledkov US EPA in United States Food and Drug Administration (US FDA) (US EPA, 2004) priporočata omejevanje dnevnega vnosa rib, predvsem tistih, ki jih najdemo na vrhu prehranjevalne verige in ki živijo dolgo.

Nekateri avtorji (Myers in sod., 2000) navajajo, da je potrebno biti pri omejevanju uživanja rib zaradi potencialne nevarnosti zastrupitve z MeHg previden, saj ima uživanje rib druge prednosti pri razvoju otrok in odraslega človeka. Tehtna odločitev je potrebna predvsem tam, kjer vsebnosti MeHg v ribah niso kritične oz. v skupnostih, kjer ribe predstavljajo glavni vir proteinov.

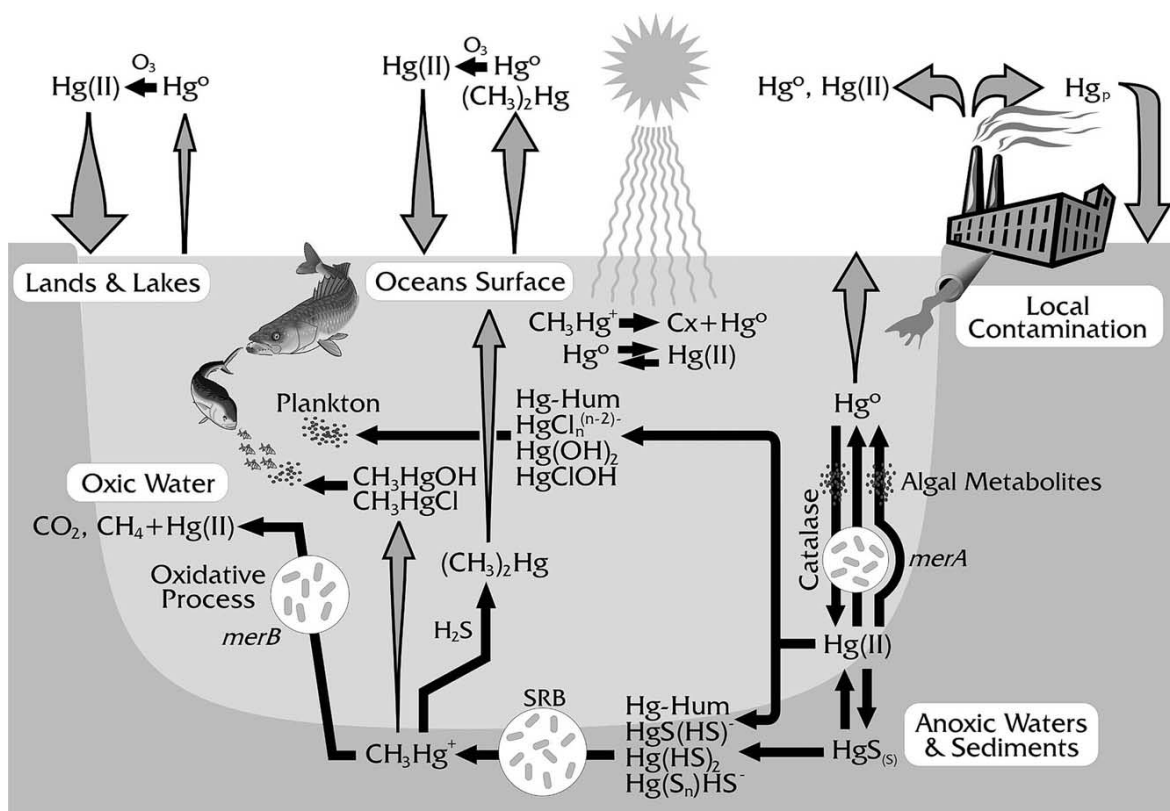
Spoznanje, da je Hg resnično toksičen element, ki celicam v nobeni obliki ni potreben, vseeno pa v okolju aktivno prisoten, je privedlo do zavedanja, da je remediacija močno onesnaženih okolij nujna.

Razširjenost in raznolikost operona *mer* ('mercury resistance') v okolju je pokazala na bakterije kot najprimernejše nosilce bioremediacijske aktivnosti. Operon *mer* je nosilec zapisa za encime, odgovorne za pretvorbe Hg oz. detoksifikacijo.

Zaenkrat se je za najboljši in najbolj dodelan sistem izkazal polnjen bioreaktor oz. bioreaktor z nosilcem (angl. packed bed bioreactor), ki se uporablja za čiščenje odpadne vode kloroalkalne industrije. V tem bioreaktorju bakterije Hg^{2+} reducirajo v Hg^0 , ki se v obliki kapljic nabira pri dnu bioreaktorja, od koder ga je mogoče odstraniti in po potrebi ponovno uporabiti (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

Gre za edini primer aplikacije, medtem ko so ostali še v fazi razvoja. Apikativnost je odvisna predvsem od rentabilnosti projekta. Ta se močno zmanjša, če je obremenjenost s Hg relativno nizka (Barkay in Wagner-Döbler, 2005). Uspešnost nekega bioremediacijskega sistema je močno odvisna tudi od zahtevnosti posega v okolje. Vsekakor pa je za razvoj bioremediacijskih postopkov potrebno celostno poznavanje biogeokemije Hg, vendar to, kot izpostavljata tudi Barkay in Wagner-Döbler (2005), zaenkrat še ni doseženo.

2.2 BIOGEOKEMIJSKO KROŽENJE Hg



Slika 2: Shema biogeokemijskega kroženja Hg v okolju. Temne puščice predstavljajo transformacijo ali prevzem Hg, svetle puščice pa predstavljajo tok Hg med različnimi predeli ekosistema. Širina svetlih puščic naj bi bila proporcionalna pomembnosti določenega toka v okolju (Barkay in sod., 2003: 357).

Pri biogeokemijskem kroženju Hg igrajo osrednjo vlogo mikroorganizmi oz. heterotrofne bakterije (Hamdy in Noyes, 1975), cianobakterije (Lefebvre in sod., 2007), kvasovke (Yannai in sod., 1991) in tudi arheje (Pak in Bartha, 1998). Njihova aktivnost obsega oksidacijo Hg^0 v Hg^{2+} , redukcijo Hg^{2+} v Hg^0 , metilacijo Hg v MeHg in demetilacijo MeHg v Hg. Omenjene pretvorbe potekajo tudi abiogeno, vendar naj bi bil njihov obseg mnogo manjši (Ullrich in sod., 2001).

Kot smo že omenili, lahko vire Hg v okolju razdelimo na naravne in antropogene. Hg iz teh virov v kroženje vstopa preko atmosferskih izpustov ali vezan na delce v rečne in morske sedimente, v prsti pa je v povišanih koncentracijah lahko prisoten že naravno. Kot najpomembnejše naravne vire Hg avtorji (Gustin in sod., 2008) navajajo vulkane, geotermalne vrelce, prst, ki je zaradi geoloških danosti bogata s Hg ali je z njim kontaminirana, in gorenje biomase (gozdov). Najpomembnejši antropogeni viri Hg so izgorevanje fosilnih goriv (predvsem premoga), kloroalkalna industrija, zažigalnice in odlagališča odpadkov ter še delujoči rudniki Hg (Hylander in Meili, 2003).

Prve transformacije Hg potekajo že v atmosferi, od njih pa je odvisen mehanizem odlaganja (suhi in vlažni procesi odlaganja) (Lin in Pehkonen, 1998). Hg v atmosferi obstaja v dveh oksidacijskih stanjih, kot Hg^0 in Hg^{2+} , pri čemer je Hg^0 prevladujoča oblika (po nekaterih navajanjih naj bi obsegal več kot 95 % vsega Hg v atmosferi (Sakata in Marumoto, 2005)), kar podaljšuje njegov zadrževalni čas. Glavni reaktanti v atmosferi, ki sodelujejo pri pretvorbah Hg^0 v Hg^{2+} in obratno so ozon (Munthe, 1992; Hall, 1995), hidroksilni radikali (Lin in Pehkonen, 1997), S(IV) (Munthe in sod., 1991) in hidroperoksilni radikali (Lin in Pehkonen, 1997).

Hg iz zraka nato preko suhih in vlažnih procesov odlaganja prehaja na zemeljsko površino oz. v tla, oceane, morja in površinske vode. Pri vlažnih procesih poteka odlaganje preko precipitacije vode oz. z dežjem, pri čemer se Hg deponira večinoma v obliki Hg^{2+} , pri suhih procesih pa se odlaga predvsem Hg, vezano v/na delce, in Hg v plinski fazi. Pri tem so pomembni predvsem elementno Hg in reaktivne oblike Hg v plinski fazi (RGM – reactive gaseous forms) (Sakata in Marumoto, 2005). Lamborg in sod. (2001) po več

avtorjih povzemajo, da je najpomembnejša oblika Hg, ki se sprošča iz atmosfere, prav Hg^{2+} , saj lahko nastopa kot substrat za mikrobne pretvorbe, posebno metilacijo.

Hg je lahko v povišanih koncentracijah v tleh prisoten naravno ali kot posledica odlaganja atmosferskega Hg. Njegova usoda je odvisna od številnih okoljskih dejavnikov, pomembno vlogo igra tudi sestava prsti. Njena sestava narekuje sposobnost adsorpcije Hg na mineralne ali organske koloide v tleh (Schuster, 1991). Adsorpcija na koloide omejuje dostopnost substrata mikroorganizmom, hkrati pa lahko vezava povečuje topnost in olajšuje transport iz prsti v vodotoke.

Pri kroženju Hg v prsti je eden pomembnejših dejavnikov svetloba, natančneje UV del spektra. UV svetloba deluje na huminske komponente prsti, prav te pa igrajo eno najpomembnejših vlog pri kroženju Hg v tleh. Huminske in fulvinske kisline imajo veliko kapaciteto za vezavo in zadrževanje Hg, saj imajo ogromno število funkcionalnih skupin. Interakcije med huminskimi snovmi in Hg obsegajo kompleksacijo, hidrofobne interakcije, Van der Waalsove sile in kemijske vezi (Matthiessen, 1998). Huminske in fulvinske kisline naj bi bile sposobne tudi abiotske metilacije (Nagase in sod., 1982; Nagase in sod., 1984).

Mauclair in sod. (2008) so izvedli poskus, v katerem so umetno pripravili vzorce prsti tako, da so očiščenemu kremenčevemu pesku dodali različne količine standardiziranih huminskih in fulvinskih kislin. Vzorcem prsti so nato dodali znano količino Hg (v obliki HgCl_2). V poskusu, ki je trajal štirinajst dni, so opazovali emisije Hg^0 s površine umetno pripravljenih vzorcev z različno količino huminskih in fulvinskih kislin. Opazovali so tudi spreminjanje emisij v odvisnosti od izpostavljenosti vidni in UV svetlobi. Rezultati poskusa so pokazali, da vsebnost huminskih in fulvinskih kislin močno zmanjšuje emisije Hg^0 , razlika v zmanjšanju teh emisij pa je zelo opazna, kadar je vsebnost kislin višja od 0,1 % (masni delež). Pokazali so tudi, da se emisije močno povečajo ob izpostavljenosti UV svetlobi.

Pomemben vpliv na redukcijsko sposobnost huminskih in fulvinskih kislin ima pH. Matthiessen (1998) v svoji raziskavi zaključuje, da se redukcijska sposobnost močno poveča ob prehodu raztopine sintetičnih huminskih kislin iz nevtralnega v alkalno pH

omočje. To pripisuje disociaciji oz. deprotonaciji fenolnih funkcionalnih spojin. Ugotavlja, da na reakcije redukcije med huminskimi kislinami in Hg kvantitativno vplivajo tudi ioni, prisotni v raztopini (v njegovi raziskavi je šlo za ione spojin za pripravo pufrov), ne vplivajo pa na odvisnost redukcijske kapacitete od pH.

Poleg kemijskih oz. abiotskih pretvorb Hg potekajo v tleh tudi biotske prevorbe. Jereb in sod. (2003) so opazovali procese metilacije in demetilacije v prebavilih kopenskega rakca (*Porcellio scaber*). Kljub nekaterim analitskim težavam ločevanja posameznih oblik Hg in relativno visoki variabilnosti znotraj rezultatov so prišli do zaključka, da v prebavilih in hepatopankreasu kopenskega rakca ne prihaja le do preučevanih pretvorb, temveč tudi do redukcije Hg^{2+} v Hg^0 in s tem do izgubljanja Hg iz sistema. Vse reakcije, tudi reakcije redukcije Hg^{2+} , so pripisali mikroorganizmom, ki živijo v prebavilih. Ugotovili so, da se večina preostalega zadržanega Hg izloči s fecesom, nekaj pa se ga akumulira v prebavilih in hepatopankreasu. Opazili so tudi, da je delež 'izgubljenega' Hg v obliki hlapnih Hg spojin večji in delež akumuliranega Hg manjši, kadar hrana vsebuje visoke koncentracije Hg. Ko so rakce nato hranili z nekontaminirano hrano, se je delež akumuliranega Hg v prebavilih povečal. Povečane količine Hg^0 so povezali z intenzivnejšim izražanjem operona *mer* (inducibilen operon) pri lokalni mikroflori.

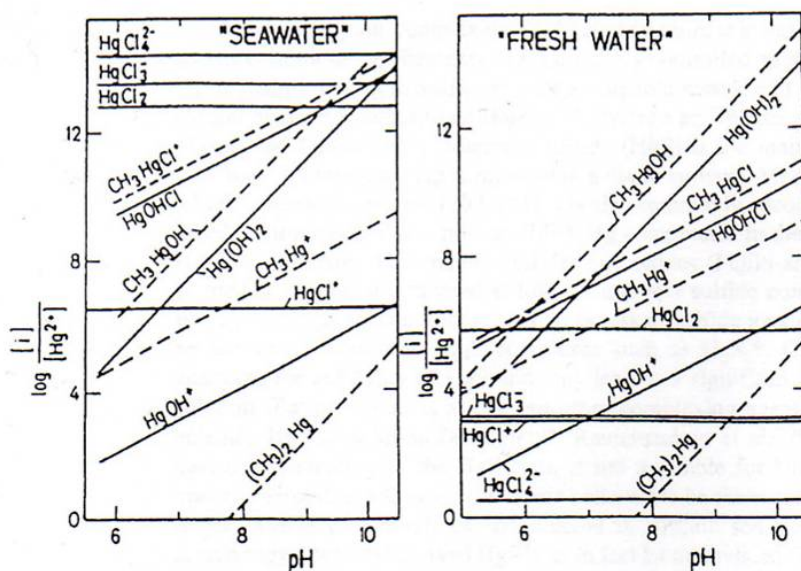
Tudi pri kroženju Hg v površinskih vodah in pripadajočih sedimentih imajo pomembno vlogo tam prisotni živi organizmi oz. mikroorganizmi. Rečni sistemi in njihovi sedimenti pa niso le pomembno mesto biotskih in kemijskih sprememb, temveč tudi pomemben rezervoar Hg. Delce ali koloide z vezanim Hg lahko reka ob delovanju erozije mobilizira še v druge ekosisteme, v končni fazi tudi v morja.

Ker je za sladkovodna telesa in njihove sedimente značilno, da so koncentracije sulfata zelo nizke in je sulfatna respiracija omejena, se je postavljalo vprašanje, od kod potem MeHg v sladkih vodah. Odkrili so, da prihaja v anaerobnih delih sedimentov do sinergističnega delovanja med SRB in metanogenimi arhejami. SRB v teh okoljih fermentirajo (zato ni črne oborine pirita (FeS_2) ali značilnega vonja H_2S) in tako zagotavljajo substrate za aktivnost metanogencev, najpomembnejše pa je, da je ob tem ohranjena tudi sposobnost metilacije Hg (Pak in Bartha, 1998).

Biogeokemija Hg je v morskem okolju kompleksnejša. Pomembno vlogo igrajo abiotski dejavniki, ki neposredno in posredno delujejo na prisotne mikroorganizme in njihovo aktivnost. Glavno mesto mikrobnih pretvorb v morskem okolju predstavljajo sedimenti. Tukaj sta procesa metilacije in demetilacije pomembnejša. Metilacija je v večji meri zastopana zaradi dejstva, da so SRB v morskem okolju številčnejše in aktivnejše kot v kopenskem ali sladkovodnem okolju, kjer je sulfata manj.

V morskem okolju se spremeni oblika kompleksov, v katerih se Hg nahaja. V primerjavi s sladkovodnimi tokovi in njihovimi sedimenti je manj Hg povezanega z organsko snovjo, saj pride do tekmovanja s Cl^- ioni za vezavna mesta (Lindberg in Hariss, 1974; Barkay in sod., 1997). Prav tako je speciacija Hg spremenjena ob visokih koncentracijah S^{2-} . Kadar so vrednosti Eh (redoks potencial) nizke in pH visok, lahko pride do nastanka topnih HgS_2^{2-} kompleksov (Ullrich in sod., 2001), kar povzroči remobilizacijo Hg v vodni stolpec.

Več o biogeokemiji Hg v morskem okolju je napisano v poglavju 2.5 na primeru Tržaškega zaliva.



Slika 3: Razmerje koncentracij in relativna termodinamska stabilnost različnih zvrsti Hg v sladki in morski vodi (Ullrich in sod., 2001: 244)

Ker ima Hg^0 visok parni tlak (Henryeva konstanta je 0,3) in je v vodnih raztopinah slabo topen ($0,6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ vode pri $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$), zelo lahko hlapi na meji tekočina-zrak, kar olajšuje njegovo kroženje (Barkay in sod., 2003), hkrati pa se na ta način izključi iz rezervoarja Hg, ki bi lahko nastopal kot substrat za metilacijo.

2.2.1 Vloga mikroorganizmov

Kot že večkrat omenjeno, so raziskovalci sposobnost biotransformacije Hg opisali pri več skupinah mikroorganizmov. Ti pa niso pomembni le z vidika pretvorb Hg, temveč tudi z vidika sposobnosti akumulacije v biomasi, saj gre za enega od mehanizmov, odgovornih za biomagnifikacijo v prehranjevalnih verigah in spletih.

Ker je MeHg najbolj toksična oblika Hg in smo mu tako ljudje kot druge živali pri vrhu prehranjevalnih spletov zaradi uživanja morske hrane kronično izpostavljeni, se veliko raziskav osredotoča na mehanizme metilacije in demetilacije, njihov obseg ter mehanizme prehoda in biomagnifikacije v prehranjevalnih spletih.

2.2.1.1 Mikrobna metilacija Hg

Po eni največjih in najbolj znanih akutnih zastrupitev ljudi z MeHg, ki se je v 60. letih prejšnjega stoletja zgodila v zalivu Minamata na Japonskem in za posledicami katere je umrlo okoli 2000 ljudi, so raziskovalci začeli iskati vzrok, zaradi katerega je prišlo do tako masovne akumulacije MeHg v morskih organizmih, s katerimi so se pretežno prehranjevale zastrupljene žrtve. Vzrok so odkrili kmalu, šlo je za z MeHg obremenjene izpuste kemične tovarne v bližini.

Katastrofa v zalivu Minamata je odprla nova raziskovalna področja, povezana s Hg. Tako sta že leta 1969 Jensen in Jernelöv opisala biološko metilacijo Hg. Leta 1985 sta Compeau in Bartha izvedla eksperiment, s katerim sta pokazala, da so SRB odgovorne za nastanek večine (95 %) MeHg v naravnem okolju, v njunem primeru, v anaerobnem brakičnem

sedimentu. Tako sta negirala takratno prepričanje strokovne javnosti, da so glavni metilatorji Hg metanogene arheje.

Novejše raziskave kažejo, da SRB niso edini aktivni metilatorji, temveč so to tudi železo-reducirajoče bakterije (ŽRB), evolucijsko sorodne SRB iz reda *Deltaproteobacteria* (Kerin in sod., 2006). ŽRB bi bile lahko pomembne zlasti v anaerobnih sedimentih sladkovodnih sistemov, ki so bogati z Fe (Fleming in sod., 2006, Kerin in sod., 2006).

Pri metilaciji Hg, ki jo opravljajo SRB, opazimo, da je stopnja metilacije največja, ko je limitirajoči dejavnik sulfat. Kadar je sulfata veliko, pride do negativne povratne zanke s H_2S , saj se ta s Hg veže v netopni HgS in tako Hg ni več na razpolago za metilacijo (Compeau in Bartha, 1985, Hammerschmidt in sod., 2008), povišane koncentracije H_2S pa lahko tudi inhibirajo rast SRB.

2.2.1.1.1 Biokemijski mehanizmi metilacije

Biološka metilacija lahko poteka encimsko, kar zahteva prisotnost metabolno aktivnih organizmov, ali pa neencimsko. Za slednjo aktivnost je potreben le metiliran produkt aktivnega metabolizma.

Kot najprimernejši kandidat za neencimsko metilacijo Hg v vodnem okolju se je izkazal metilkobalamin, derivat vitamina B_{12} , ki ga proizvajajo številni mikroorganizmi. Opravljene raziskave (DeSimone in sod, 1973) so pokazale, da pride pri tem do prenosa metilne skupine v obliki karbaniona (CH_3^-). Obe dejstvi so štiri leta kasneje potrdili Ridley in sod. (1977), ki so pokazali, da je v morskem okolju sicer prisotnih več potencialnih donorjev metilne skupine, vendar je le metilkobalamin sposoben prenosa skupine v obliki karbaniona.

Berman in sod. (1990) so prvi raziskovali biokemijski potek metilacije Hg in izvor metilne skupine. Ugotovili so, da je to serin (atom C3). Rezultati so jih napeljali na idejo, da sta v procesu udeležena tetrahidrofolat in kobalamin oz. podoben korinoidni protein. Njihove ideje so leta 1994 potrdili Choi in sod., ki so opisali in razložili celoten potek metilacije Hg

pri bakterijah. Za testni organizem so si, tako kot Berman in sod. (1990), izbrali bakterijo *Desulfovibrio desulfuricans* LS. Ugotovili so, da gre za encimsko voden proces, saj je bila hitrost metilacije 600-krat višja kot transmetilacija s prostim metilkobalaminom. Pokazali so tudi, da encimska metilacija zahteva prisotnost metiltetrahidrofolata (5-CH₃-THF) kot donorja metilne skupine. Metilno skupino s 5-CH₃-THF na korinoidni protein prenese metiltransferaza I, prenos metilne skupine s korinoidnega proteina na Hg pa mediira metiltransferaza II. V svoji raziskavi so ugotovili tudi, da je lahko alternativni donor metilne skupine za THF tudi format, in da prenos poteka po poti acetil-CoA.

Vendar pa metilacije Hg niso sposobne vse SRB oz. predstavniki posameznih družin (*Desulfobacteriaceae*) metilirajo Hg bolj učinkovito kot drugi (*Desulfovibrionaceae*) (King in sod., 2000). Razlike so tudi znotraj posamezne bakterijske družine. Različna hitrost metilacije naj bi bila posledica razlike v mehanizmi, ki jih bakterije uporabljajo za oksidacijo virov ogljika. Tako SRB ločimo v dve skupini. Prva skupina vključuje bakterije, ki niso sposobne popolne oksidacije acetilne skupine acetil-CoA do CO₂, druga skupina pa predstavnike, ki so tega sposobni.

Popolna oksidacija lahko poteka po dveh poteh. Ena poteka preko modificiranega ciklusa citronske kisline (CCK), druga pa po poti acetil-CoA. Slednja vključuje tudi CH₃-THF in korinoidni protein, kar naj bi bil razlog za povečano aktivnost metilacije pri bakterijah, ki za oksidacijo organskega materiala uporabljajo pot acetil-CoA (King in sod., 2000).

2.2.1.2 Demetilacija MeHg

Razgradnja MeHg je lahko, tako kot metilacija, biološko in nebiološko voden proces. Sposobnost demetilacije MeHg imajo tako aerobne kot anaerobne bakterije in metanogene arheje, vendar aerobnim vrstam pripisujejo večji pomen.

Demetilacija MeHg lahko poteka po reduktivni poti, kjer sta produkta razgradnje metan (CH₄) in Hg⁰, ali po oksidativni poti, kjer glavnino predstavlja CO₂, sprost pa se tudi nekaj

CH₄. Pri oksidativni poti ne nastaja Hg⁰, temveč Hg²⁺, ki lahko ponovno služi kot substrat za metilacijo.

Katera pot demetilacije bo prevladovala v ekosistemu je odvisno od koncentracije sulfata in nitrata (Marvin-Dipasquale in Oremland, 1998). Ob povečanih koncentracijah SO₄²⁻ in NO₃⁻ prevladuje oksidativna demetilacija. Poleg tega nekateri podatki kažejo, da je reduktivna pot demetilacije prevladujoča v oksičnem in s Hg močno onesnaženem okolju (>1 μg Hg/g sedimenta), medtem ko oksidativna demetilacija prevladuje v anoksičnih in s Hg manj obremenjenih okoljih.

Reduktivna razgradnja MeHg je ponavadi dvostopenjski proces, ki vključuje encima organomerkurialno liazno in Hg reduktazo. Zapisa za omenjena encima (*merB* in *merA*) se nahajata v operonu *mer*. Če sta v operonu oba gena, gre za t.i. širokospektralno odpornost proti Hg. Prva stopnja je cepitev vezi med atomoma ogljika (C) in Hg, ki jo vrši MerB. Ob tem se v okolje sprosti CH₄. Druga stopnja je redukcija Hg²⁺ v Hg⁰, ki jo vodi MerA.

Oksidativna demetilacija naj ne bi vključevala specifičnih encimov, temveč naj bi šlo za produkt metabolizma C1 spojin (Oremland in sod., 1991).

Z uporabo molibdata (inhibitorja SRB) so Oremland in sod. (1991) ugotovili, da so v anaerobnih razmerah v estuarijih pomembni demetilatorji SRB, in da poteka demetilacija po oksidativni poti. S primerjalno analizo, pri čemer so pri sladkovodnih sedimentih uporabili tako molibdat kot 2-brometan sulfonsko kislino – BES (inhibitor metanogeneze), so ugotovili, da so osrednji demetilatorji v sladkovodnih sedimentih metanogeni in SRB, da pa med njimi stalno poteka kompeticija za donorje elektronov. Metanogene arheje demetilacijo MeHg vršijo po reduktivni poti, vendar demetilacija ne vključuje sistema *mer*.

V omenjeni raziskavi so ugotovili, da v anaerobnih sladkovodnih sedimentih nastaja precejšnja količina CO₂ (posledica demetilacije – uporaba radioaktivno označenega C), vendar njegovega nastanka niso mogli v celoti pripisati aktivnosti SRB ali metanogencev, zato so domnevali, da v procesu pomembno vlogo igrajo še druge anaerobne bakterije. Do podobnih zaključkov so prišli tudi štiri leta kasneje (Oremland in sod., 1995).

Preglednica 1: Pregled pretvorb v biogeokemijskem kroženju Hg (Barkay in sod., 2003: 358)

Pretvorbe	Proces	Mehanizem pretvorbe
metilacija Hg^{2+}	biotski	Prenos CH_3^- skupine z metilkobalamina (B_{12}) preko poti acetil-CoA., ki ga pri SRB posreduje metiltransferaza.
	abiotski	Metilacija Hg s strani fulvinskih in huminskih kislin, karboksilnih kislin in metiliranih kositrovih (Sn) spojin
demetilacija CH_3Hg^+	biotski	Reduktivna metilacija ob delovanju <i>merAB</i> , pri čemer nastane CH_4 in Hg^0 . Oksidativna metilacija ob delovanju še neprepoznanega procesa, pri čemer nastanejo CO_2 in nedefinirane količine različnih zvrsti Hg.
	abiotski	Fotodegradacija pri valovnih dolžinah od 200 do 400 nm.
redukcija Hg^{2+}	biotski	Bakterijska reduktaza Hg iona in neopisana pot pri algah med rastjo v temnem in svetlem okolju.
	abiotski	Fotokemijske reakcije in reakcije v temi, ki jih opravljajo organski in anorganski prosti radikali. Disproporcionacija: $2\text{Hg}^+ \rightarrow \text{Hg}^{2+} + \text{Hg}^0$.
oksidacija Hg^0	biotski	Oksidacija s strani hidroperoksidaz v mikrobnih, rastlinskih in živalskih celicah.
	abiotski	Fotooksidacija, ki jo povzročajo različni oksidanti in prosti radikali.

2.2.2 Bakterije in mehanizmi odpornosti proti Hg

Osborn in sod. (1997) so po različnih avtorjih povzeli, da so bakterije z evolucijo razvile mnogo učinkovitih mehanizmov, s katerimi se spopadajo z uničujočim delovanjem različnih kovin. Veliko kovin (mangan (Mn), železo (Fe), baker (Cu), natrij (Na), kalij (K) in kalcij (Ca)) je nujno potrebnih za normalno delovanje celic, vendar lahko previsoke koncentracije celicam tudi škodujejo.

Bakterije so za učinkovito uravnavanje količine kovin v celicah razvile več mehanizmov, ki delujejo na nivoju:

- omejevanja vstopa v celico,
- aktivnega izločanja kovinskih ionov preko specifičnih sistemov, kodiranih z geni za odpornost,
- znotrajcelične vezave kovin na specifične vezavne proteine,

- zunajcelične vezave kovin na zunajcelične polisaharide celične stene in
- encimske pretvorbe kovine v bakterijam manj toksične oblike.

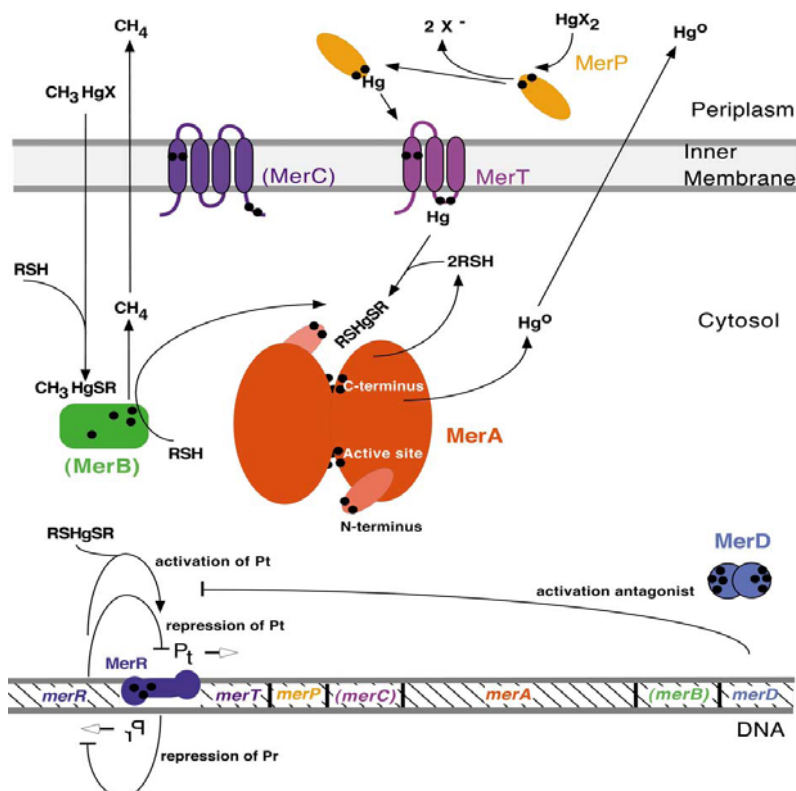
Proti Hg se je razvilo pet različnih tipov odpornosti oz. mehanizmov detoksifikacije, ki so bili opisani pri različnih bakterijah. Prvi mehanizem je omejevanje vstopa Hg^{2+} iona (opisano pri bakteriji *Enterobacter aerogenes*). Drugi mehanizem je demetilacija MeHg, temu pa sledi vezava Hg s H_2S v netopni HgS , s čemer bakterije Hg imobilizirajo (opisano pri bakteriji *Clostridium cochlearium T-2P*). Tretji mehanizem je vezava MeHg s H_2S , ki intenzivno nastaja pri disimilativni redukciji sulfata. Omenjeni mehanizem so opisali pri bakteriji *Desulfovibrio desulfuricans API*, ki na ta način vzdržuje znotrajcelične koncentracije MeHg pod nivojem toksičnosti. Četrty mehanizem je metilacija Hg. Čeprav je MeHg z antropocentričnega gledišča bolj toksičen, bakterije z njegovo produkcijo povečujejo možnost vezave in imobilizacije MeHg s pomočjo katerega od prej omenjenih mehanizmov. Na ta način tudi povečujejo hlapnost Hg, kar je z vidika bakterij manj nevarno. Peti mehanizem je encimska redukcija Hg^{2+} v Hg^0 , ki je značilen tako za Gram pozitivne (G+) kot Gram negativne (G-) bakterije.

2.2.2.1 Operon *mer*

Bakterijska odpornost proti Hg, ki jo posreduje operon *mer*, je edini sistem odpornosti proti kovinam, ki zagotavlja celostno transformacijo tarčne toksične kovine. Ostali mehanizmi temeljijo na črpalkah, ki izločajo katione in oksianione kovin, in na njihovi znotrajcelični vezavi (Barkay in sod., 2003). Glavna produkta genov operona *mer* sta MerR, ki deluje kot regulator in MerA, osrednji encim, ki deluje kot reduktaza iona Hg^{2+} . Pomemben encim je tudi MerB, katerega naloga je, da cepi vez med atomoma C in Hg. Za Hg je značilna vezava z žveplovimi spojinami, kar razloži tudi delovanje Hg na celičnem nivoju. Primarne tarče njegovega delovanja so cisteini proteinov oz. njihove $-\text{SH}$ skupine. Iz tega razloga tudi ni presenetljivo, da imajo proteini Mer v svojih reakcijskih centrih veliko število cisteinov. V te aktivne centre vežejo Hg v reaktivni ionski ali organski obliki in ga pretvorijo v relativno inertno obliko – Hg^0 .

Bakterije, ki so sposobne pretvorbe tako organskih kot anorganskih oblik Hg, imajo t.i. širokospektralno odpornost proti Hg (angl. broad-spectrum Hg resistance), tiste, ki so sposobne pretvorbe le anorganskih oblik Hg, pa imajo t.i. ozkospektralno odpornost proti Hg (angl. narrow-spectrum Hg resistance) (Barkay in sod., 2003).

Operone *mer* ponavadi najdemo na plazmidih, mogoče pa jih je najti tudi na kromosomih ali kot del transpozonov in integronov (Nascimento in Chartone-Souza, 2003), kar razloži, zakaj je fenotip odpornosti proti Hg v bakterijskem svetu tako razširjen.



Slika 4: Shema tipičnega operona *mer* pri Gram negativnih (G-) bakterijah. Geni in njihovi produkti, ki so zapisani v oklepaju, se ne pojavljajo pri vseh organizmih oz. v vseh operonih *mer* (Barkay in sod., 2003: 360)

Barkay in sod. v preglednem članku (2003) razlagajo, da je osrednji encim, udeležen pri odpornosti proti Hg, MerA ali reduktaza iona Hg^{2+} . Gre za citosolno flavin disulfid oksidoreduktazo, ki za redukcijo Hg^{2+} uporablja NAD(P)H. Na notranji membrani najdemo transmembranski protein MerT, ki po prejemu Hg^{2+} od majhnega periplazmskega proteina MerP Hg^{2+} prenese na citosolno stran membrane. Tam lahko pride do neposrednega prenosa Hg^{2+} z MerT na MerA, ali pa se Hg z MerT sprosti kot ditiolni derivat in kot tak predstavlja substrat za MerA. Po redukciji Hg^{2+} v Hg^0 na MerA Hg^0 oddifundira skozi membrano v okolico celice. V tej osnovni različici operona *mer* najdemo tudi MerR, ki deluje kot regulator transkripcije genov za prej opisane proteine. Gre za protein, ki specifično veže Hg in deluje kot aktivator in kot represor.

Operoni *mer* so široko razširjeni med bakterijskimi vrstami, podobna zaporedja pa so našli tudi pri nekaterih arhejah, ki naseljujejo ekstremna okolja, vendar njihove funkcionalnosti oz. aktivnosti niso uspeli dokazati. Pogosto je mogoče tako pri G- kot pri G+ bakterijah v operonu *mer* najti še druge gene. Eden od teh je gen *merB*, ki kodira organomerkurialno liazo ali MerB. Barkay in sod. (2003) povzemajo, da med operoni *mer* G+ in G- bakterij obstajajo določene razlike. Ena je, da so gen *merB* zaenkrat opisali pri več vrstah G+ kot G- bakterij. Druga opazna razlika je, da se pri G+ vrstah z nizko vsebnostjo GC baznih parov *merR* (zapis za osrednji regulator) prepisuje v isti smeri kot strukturni geni, medtem ko se pri G+ *Streptomyces* z visoko vsebnostjo GC baznih parov, *merR* prepisuje ločeno oz. v nasprotni smeri.

Preglednica 2: Pregled funkcij posameznih proteinov, kodiranih v operonu *mer* (Barkay in sod., 2003)

Funkcija	Ime	Opis delovanja
regulatorna	MerR	predstavniki družine regulatornih proteinov, ki se vežejo na MerO (operator) in delujejo kot represorji in aktivatorji transkripcije strukturnih genov sam sebi je negativni avtoregulator, saj se njegov lastni promotor prekriva s promoterjem strukturnih genov ob vezavi Hg^{2+} na MerR pride do alosterične spremembe, temu sledi vezava MerR na DNA in indukcija transkripcije strukturnih genov
	MerD	strukturno podoben MerR antagonist MerR (delecija gena <i>merR</i> povzroči kontinuirano izražanje strukturnih genov, tudi ko Hg^{2+} ni več) potreben za hitro prekinitev prepisovanja gena <i>merA</i> po porabi substrata (Hg^{2+}), saj prihaja zaradi oksidazne aktivnosti MerA (kot tudi ostalih flavin oksidoreduktaz) v odsotnosti substrata do kopičenja vodikovega peroksida (H_2O_2), ki je za celice toksičen
	MerP	majhen periplazmski protein strukturno podoben proteinom za transport skozi membrano in znotrajcelično prenašanje trifilnih kovinskih kationov prenaša Hg^{2+} na prvi transmembranski heliks MerT sodeluje tudi pri vnosu organski oblik Hg
transportna	MerT	protein v notranji membrani ponavadi ga najdemo pri G⁻ in G⁺ bakterijah (izjema je <i>Acidithiobacillus</i>, ki ima le MerC) potreben za prenos Hg^{2+} skozi notranjo membrano sodeluje tudi pri vnosu organskih oblik Hg
	MerC	protein v notranji membrani alternativa MerT domnevajo, da je potreben v okoljih, kjer je koncentracija okoljskega Hg^{2+} zelo visoka
	MerF	protein v notranji membrani
	MerE	domnevno naj bi šlo za protein v notranji membrani
	<i>merG</i>	produkt gena <i>merG</i> naj bi se domnevno nahajal v periplazmi, kjer naj bi vplival na permeabilnost celične membrane in tako omejeval vstop organskim oblikam Hg (raziskovali so le fenil-Hg)

se nadaljuje

nadaljevanje preglednica 2: Pregled funkcij posameznih proteinov, kodiranih v operonu *mer* (Barkay in sod., 2003)

Funkcija	Ime	Opis delovanja
detoksifikacijska	MerA	osrednji encim, reduktaza iona Hg^{2+} , kot vir elektronov ji služi NADPH
		protein v citoplazmi
		soroden encimom iz družine piridin nukleotid disulfid oksidoreduktaz
	MerB	encim organomerkurialna liaza
		protein v citoplazmi
		nizkospecifičen encim, sposoben pretvorbe različnih organskih oblik Hg (fenil-, etil-, metil-Hg)
		edinstven encim, brez znanih homologov, poznanih več različic encima
		brez S-S vezi, cisteine najdemo le v katalitičnem centru

2.3 VPLIV DEJAVNOSTI V IDRIJSKEM RUDNIKU NA POREČJE IDRICE IN SOČE TER NA TRŽAŠKI ZALIV

V vzhodnem delu Slovenije, približno 50 km od Ljubljane, se nahaja drugi največji rudnik Hg na svetu, idrijski rudnik. V rudniku, ki je obratoval od 15. stoletja dalje, naj bi skupno pridobili 107 000 ton Hg^0 . Kljub temu, da je bil leta 1987 sprejet sklep o njegovem postopnem zapiranju (Idrija Turizem, 2008), leta 1995 pa so dokončno prenehali z rudniško dejavnostjo, je reka Idrijca, ki teče skozi mesto in mimo rudnika, že več kot petsto let podvržena intenzivnemu vnosu Hg.

Večino bremena v tem okolju predstavlja Hg (v obliki delcev HgS), sproščen ob neučinkovitem postopku taljenja rude in ob odlaganju odpadkov topilniške dejavnosti. Po nekaterih podatkih naj bi se na ta način v okolje sprostila kar ena četrтина vsega izkopanega Hg, kar pomeni okoli 40 000 ton (Mlakar, 1974; Miklavčič, 1999). Še danes se zaradi erozijskih procesov v Idrijco in z njo povezane ekosisteme vnašajo nezmanjšane količine Hg. V poplavnih ravninah reke Idrijce naj bi se zadrževalo okoli 2029 ton Hg (Žibret in Gosar, 2006).

Hines in sod. (2000) so raziskovali spreminjanje koncentracij Hg_{tot} in MeHg vzdolž reke Idrijce vse do Tržaškega zaliva. V tej raziskavi so ugotovili, da je Idrijski rudnik nesporni onesnaževalec celotnega porečja rek Idrijce in Soče ter Tržaškega zaliva s Hg. Reka Idrijca nad rudnikom zaradi naravno povišanih koncentracij Hg v prsti vsebuje približno 3 ng Hg/l. Koncentracije Hg v vodnih vzocih se nato pri rudniku povišajo na 300 ng/l, nato pa se vzdolž toka reke znižajo na 50 ng/l, v reki Soči pa se koncentracija zniža na 14 ng/l. V estuariju in morskem okolju se koncentracije Hg ponovno povišajo.

Tržaški zaliv je plitev zaliv na skrajnem severnem delu Jadranskega morja. Površina znaša okoli 550 km², povprečna globina je 16 m, najgloblja točka pa je okoli 25 m (Tržaški zaliv, 2008).

Tržaški zaliv, kamor se izliva reka Soča, predstavlja pomembno področje za raziskovanje biogeokemije Hg. Opravljenih je bilo že veliko raziskav, v katerih so se, kot že omenjeno, osredotočili predvsem na procese metilacije in demetilacije Hg ter na pogoje, ki vplivajo na te procese.

Gre za morski bazen, v katerem pride enkrat letno do stratifikacije vodnega stolpca. Spomladi začne nastajati rahla piknoklina, ki je posledica povečane vodnatosti sladkovodnih pritokov Tržaškega zaliva. Na ta način vanj vstopajo večje količine sladke vode, ki ima manjšo gostoto kot morska voda. Stratifikacija je poleti še izrazitejša zaradi segrevanja površinske vode, zaradi česar ima zgoraj ležeča voda manjšo gostoto kot spodaj ležeča. Stratificiranost vodnega stolpca otežuje difuzijo plinov in prehod hranil čez klino, kar lahko skupaj z intenzivno razgradjo organske snovi pripelje do nastanka suboksidnih in anoksidnih pogojev pri dnu.

V samem zalivu je definiranih več raziskovalnih oz. vzorčevalnih točk, na katerih se redno opravlja analize. Sediment za naš eksperiment je bil odvzet na vzorčevalni točki CZ (13° 37,998' E, 45° 37,398' N), na globini približno 24 m.

V primerjavi z ostalimi raziskovalnimi točkami znotraj Tržaškega zaliva, predstavlja točka CZ s Hg relativno neonesnaženo področje, saj se večina Hg, vezanega na delce oz. v obliki

delcev, poseda že v sami delti reke Soče. Njegova razporeditev je odvisna od kemijske oblike, v kateri se nahaja, ko vstopa v morsko okolje (Covelli in sod., 2001).

Sedimentacija in razporeditev snovi v Tržaškem zalivu je relativno dobro raziskana. Sedimente v sredini Tržaškega zaliva (postaja CZ) tako večinoma predstavljajo peliti oz. fin material, večinoma gline in blato (Ogorelec in sod., 1991). Gline na tem mestu predstavljajo ponor Hg, saj imajo veliko površino za njegovo vezavo. Vendar pa lahko ob spremembi okoljskih dejavnikov (predvsem dostopnosti O_2 ali spremembi pH) nastopajo tudi kot vir tega elementa.

Večina raztopljenega Hg v Tržaškem zalivu je reaktivnega Hg (v obliki Hg^{2+} in raztopljenih plinskih zvrsti Hg), kar pomeni, da je raztopljeni Hg potencialno udeležen pri biogeokemijskih transformacijah (Faganeli in sod., 2003).

Hines in sod. (2000) so pokazali, da poteka metilacija Hg v zgornjih slojih morskega sedimenta (1,5–3 cm), medtem ko poteka demetilacija predvsem v prvem 1,5 cm sedimenta, pri čemer je konstanta hitrosti demetilacije petkrat višja od konstante hitrosti metilacije. Z uporabo radioaktivno označenega $^{14}CH_3-Hg^+$ so ugotovili, da večinoma poteka oksidativna demetilacija, kjer je končni produkt demetilacije CO_2 , medtem ko reduktivna demetilacija s končnim produktom CH_4 predstavlja le 10 %. Dodatne raziskave (Hines in sod., 2006) so pokazale, da se delež reduktivne demetilacije v sredini Tržaškega zaliva (postaja CZ) pozimi poveča, medtem ko na drugih raziskovalnih točkah Tržaškega zaliva povečanje ni opazno.

Z raziskavo iz leta 2000 so prišli do pomembne ugotovitve, da čeprav je postaja CZ precej oddaljena od izliva reke Soče in je celokupna vsebnost Hg celo desetkrat nižja od tiste, izmerjene v delti reke Soče, je koncentracija raztopljenega Hg_{tot} in MeHg v pornih vodah sedimenta mnogo višja od vrednosti, določenih na drugih točkah. Raztopljene zvrsti Hg lahko difundirajo v zgoraj ležeči vodni stolpec in tako predstavljajo najbolj pomemben potencialni vir MeHg v Tržaškem zalivu. Gibanje koncentracij MeHg v vodnem stolpcu smo opazovali tudi v okviru tega diplomskega dela.

Izračun masnih bilanc Hg v sredini Tržaškega zaliva kaže, da je 25 % celokupnega Hg udeležena pri aktivnem kroženju, medtem ko je preostalih 75 % relativno neaktivnega. Od aktivnih 25 % je 23 % v metilirani obliki, medtem ko metilirane oblike znotraj 75 % neaktivnega celokupnega Hg predstavljajo le 1,8 % (Covelli in sod., 1999).

Preglednica 3: Okoljske razmere na postajah CZ, BAR in AA1 v Tržaškem zalivu (Hines in sod., 2000; Hines in sod. 2006)

CZ

Globina [m]	Slanost [psu]	Temp. [°C]	O ₂ [ml/L]
24	37,7	20	5,37

Sediment (<63 µm)		C/N			MeHg	
[%]	C _{org} [%]	N _{tot} [%]	(molsko)	S _{tot} [%]	Hg _{tot} [µg/g]	[ng/g]
84	1,3	0,15	10	0,1	0,8	0,4

BAR, AA1

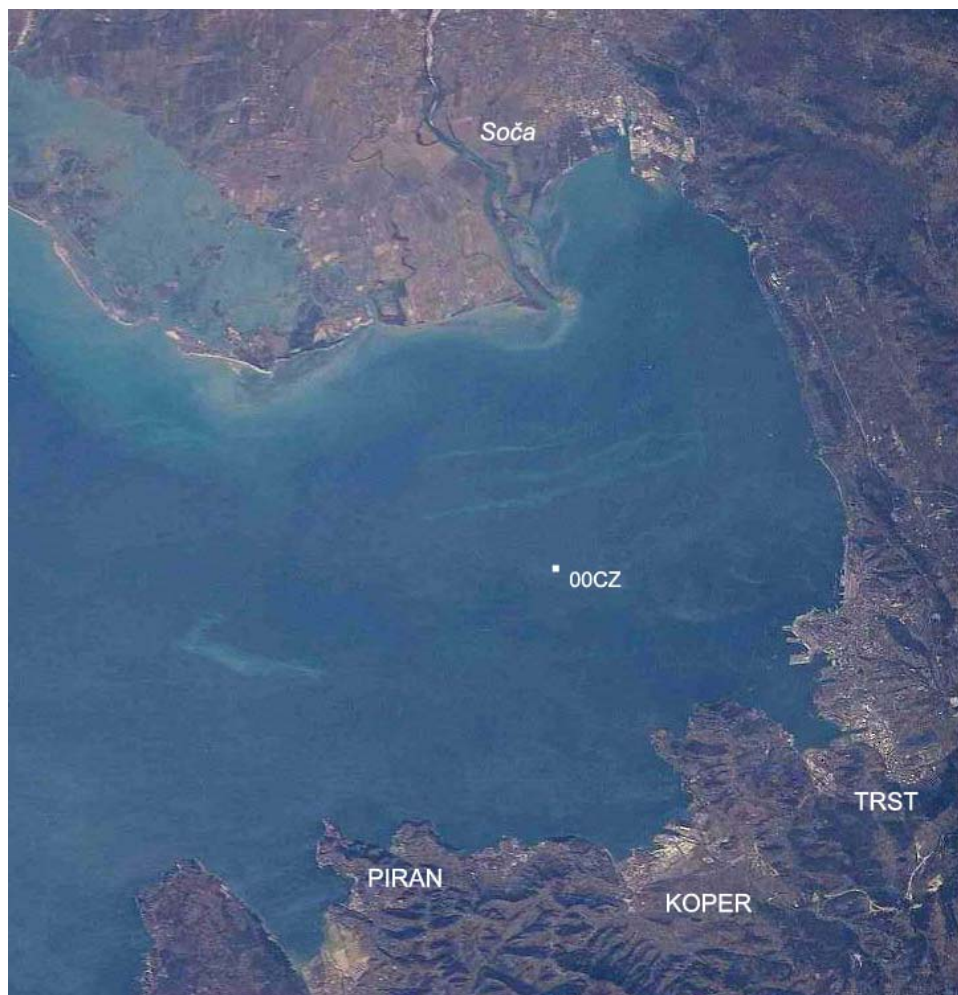
	Globina [m]	Slanost [psu]	Temp. [°C]
BAR	1,5	32,5	20
AA1	22	37,6	16

	Sediment ($<63\text{ }\mu\text{m}$)			C/N		MeHg
	[%]	C _{org} [%]	N _{tot} [%]	(molsko)	Hg _{tot} [μg/g]	[ng/g]
BAR	80	1,12	0,15	8	9,5	17
AA1	92	1,37	0,18	9	2,7	1

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORČENJE

Vzorec sedimenta smo odvzeli konec oktobra 2007 na vzorčevalni postaji CZ v sredini Tržaškega zaliva, na globini okoli 25 m. Za vzorčevanje smo uporabili posebno posodo, t.i. bentoško posodo iz pleksi stekla, z višino 25 cm in premerom 23 cm. Potapljač je z vzorčevalnikom odvzel približno 10 cm sedimenta. Posodo je pokril s pokrovom in na dno pritrdil še podstavek. Na istem mestu je odvzel tudi 20 l sveže morske vode, ki smo jo potrebovali pri celostni izvedbi poskusa.



Slika 5: Satelitska slika Tržaškega zaliva z označeno postajo CZ (Gulf of Trieste, 2008)

V laboratoriju Morske biološke postaje Piran smo zelo previdno, ne da bi premešali sediment, odstranili zgoraj ležečo vodo in jo nadomestili s svežo. S tem smo se izognili nepravilnostim pri kasnejših meritvah, saj bi lahko bile koncentracije Hg in ostalih nutrientov zaradi premikanja sedimenta ob vzorčenju povišane. Bentoško posodo smo zatesnili in na njen pokrov namestili rezervoar z odvzeto morskno vodo. Rezervoar nam je služil za sprotno nadomeščanje vode, ki smo jo v rednih časovnih intervalih odvezemali za pripravo vzorcev. Bentoško posodo z odvzetim sedimentom smo prekrili s črno vrečo, s čimer smo preprečili aktivnost bentoških fototrofnih organizmov in pustili, da poskus teče pri sobni temperaturi, ki se je gibala okoli 20–22 °C. Temperatura morja je v tem obdobju znašala okoli 20 °C (Višine in temperature morja ..., 2007). S črno vrečo smo prekrili tudi rezervoar.

3.2 PRIPRAVA VZORCEV

Eksperiment je bil sestavljen iz treh faz, pri katerih smo opazovali spreminjanje koncentracij različnih snovi, predvsem pa smo se osredotočili na koncentracije celokupnega raztopljenega Hg (Hg_{tot}) in raztopljenega MeHg. Prva faza je bila aerobna faza s postopno porabo kisika, ki je trajala šest dni. Po šestih dneh je nastopila anaerobna faza, ki smo jo vzdrževali dvanajst dni, po dvanajstih dneh (devetnajsti dan eksperimenta) pa smo rezervoar odprli in prešli v tretjo fazo poskusa, fazo reoksigenacije. Skupno je poskus trajal 26 dni, v tem času smo odvzeli 24 vzorcev.

Prvi vzorec ($t=0$) smo odvzeli kar iz rezervoarja vode, s čimer smo se izognili artefaktom, ki bi nastali zaradi nenamerne premešanja sedimenta. S polipropilensko brizgalko smo odvzeli 50 ml vode za meritev vsebnosti kisika (O_2), 1,5 ml za analizo vsebnosti Fe, 100 ml za meritev raztopljenega Hg_{tot} , 100 ml za meritev raztopljenega MeHg in 50 ml za meritve vsebnosti ostalih nutrientov. Vzorce, ki smo jih odvzeli za meritve Hg_{tot} , MeHg, Fe, H_2S in nutriende smo prefiltrirali skozi membranske (nitrocelulozne) filtre Millipore HA s premerom 25 mm in s porami velikosti 0,45 μm . Z vsakodnevnim merjenjem vsebnosti O_2 smo spremljali njegovo porabo in postopno nastopanje anaerobne faze. Ob popolni porabi O_2 smo začeli z odvzemom vzorcev za analizo vsebnosti H_2S . Po dvanajstih

dneh popolne anoksije (devetnajsti dan eksperimenta) smo pokrov bentoške posode odstranili in s tem omogočili difuzijo kisika. Dostop kisika do površine vode je bil omogočen preko lukenj v črni vreči, ki so bile vseeno dovolj majhne, da so preprečile vstop svetlobi. V tretjem delu poskusa (faza reoksigenacije) sveže vode nismo več dovajali, zaradi česar se je gladina vode zniževala. Posledica tega je bilo koncentriranje snovi v vodi, kar smo pri izračunih upoštevali. Domnevamo tudi, da je zaradi tega kisik hitreje dosegel sediment. V fazi reoksigenacije smo ponovno spremljali spreminjanje koncentracij O_2 . Med prvo in drugo fazo poskusa smo vzorce odvezemali preko ventila, ki je nameščen na pokrovu bentoške posode. Poleg ventila za odvzem vzorcev se na pokrovu posode nahaja še ventil za dovajanje sveže vode v rezervoar, kar zagotavlja enake pogoje med potekom celotnega poskusa in preprečuje vstop kisika v naš mikrokozmos. Ob nastopu tretje faze oz. odprtju bentoške posode, smo vzorce jemali neposredno iz bentoške posode pri približno isti globini (relativno na sediment) kot nam je to prej omogočal ventil.

Vzorce za meritve Hg_{tot} in MeHg smo shranili v 500 ml teflonske posodice (Nalgene), ki so bile pred tem temeljito očiščene z detergentom in kislinami. Za stabilizacijo spojin Hg smo dodali 1 ml 30 % HCl (Suprapur, Merck). Vzorce za meritve vsebnosti Fe smo stabilizirali z nekaj kapljicami ultra čiste HNO_3 . Za določitev koncentracije H_2S smo 1 ml vzorca dodali 1 ml cinkovega acetata (Zn-acetat), da se je oboril cinkov sulfid (ZnS). Vse vzorce smo shranili v hladilniku, izjema so bili le vzorci za H_2S , ki smo jih hranili pri sobni temperaturi in vzorci za O_2 , ki smo jih merili vsak dan sproti.

3.3 ANALIZE RAZTOPLJENEGA Hg_{tot} in MeHg

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

Da ne bi porušili ravnovesja v našem reaktorju oz. da ne bi naredili prevelikega posega, smo pri vzorčenju lahko odvzeli le omejeno količino vode. To se je kasneje poznalo tudi pri opravljanju meritev Hg, saj smo lahko pripravili le zelo omejeno število ponovitev.

3.3.1 Analize raztopljenega MeHg

Vsebnost MeHg v vzorcih smo določili po postopku ekstrakcije organskih oblik Hg v organsko topilo, kot so ga opisali Horvat in sod. (1993).

3.3.1.1 Ekstrakcija MeHg

V 125 ml teflonske posodice smo odtehtali po 70 g vzorca in jim dodali po 5 ml HCl (Suprapur) in 30 ml diklorometana (CH_2Cl_2). Znotraj posamezne serije vzorcev smo pripravili nekaj ponovitev vzorcev, ki smo jim dodali znano količino MeHg – 100 pg (dodali smo 100 μ l založne raztopine s koncentracijo 1 ng/ml). Za omenjen postopek se uporablja angleški izraz spiking. Zaradi omejene količine vzorca smo pri omenjenih ponovitvah odtehtali le po 60 g vzorca in jim dodali po 10 g deionizirane (MilliQ) vode. Razredčitev smo upoštevali pri izračunu koncentracije. Pripravljali smo tudi slepe probe ekstrakcije (angl. blank), kjer smo namesto vzorca uporabili MilliQ vodo. Podobno kot pri eksperimentalnih vzorcih, smo tudi vzorce MilliQ vode pripravili z znano količino standardne raztopine MeHg. Spiking MilliQ vode, slepe probe in spiking vzorcev so pri poskusu nujno potrebni, saj na podlagi dobljenih rezultatov izračunamo izkoristek ekstrakcije.

Teflonske posodice smo dobro zaprli in jih čez noč stresali na stresalniku pri 300 obr./min, kar je olajšalo in pospešilo prehod MeHg v organsko fazo. Bistvo ekstrakcije je v tem, da

se znebimo anorganskih oblik Hg (ki ne prehajajo v organsko topilo), ki bi nam lahko motile postopek nadaljnje priprave vzorca in njegovega merjenja.

Po celonočnem stresanju smo vzorcem z vodno vakuumsko črpalko odstranili zgornji vodni sloj in dodali 40 ml sveže MilliQ vode. Vzorce smo nato v digestoriju v vodni kopeli segrevali pri 90 °C. Segrevanje je povzročilo, da je organsko topilo izhlapelo, MeHg, ki je bilo prej raztopljeno v organski fazi, pa je ostalo v vodi. Ko organske faze v teflonskih posodah ni bilo več opaziti, smo preostalo vodno fazo še 5 minut prepihovali z dušikom (N₂), s čimer smo odstranili še morebitne očem nevidne sledi organskega topila.

3.3.1.2 Postopek etilacije in merjenja

Vsak dan smo pred merjenjem pripravili svežo standardno raztopino MeHg, ki smo jo uporabljali za umeritev instrumenta (CV-AFS ali Cold Vapour – Atomic Fluorescence Spectrometry) in za sprotno preverjanje pravilnosti njegovega delovanja. Pripravili smo jo tako, da smo 98,9 ml MilliQ dodali 1 ml Suprapur HNO₃ in 0,1 ml založne raztopine MeHg s koncentracijo 1 µg/ml. Koncentracija tako pripravljene standardne raztopine je bila 1 ng/ml. Teflonska posodica s standardno raztopino je bila zavita v aluminijasto folijo, saj MeHg na svetlobi hitro razpada.

Etilacijske mešanice smo pripravljali v serijah po štiri. Najprej smo za umeritveno krivuljo pripravili serijo vzorcev z naraščujočo količino standarda (0 pg ali meritev ozadja, 25 pg, 50 pg in 100 pg). Pripravili smo jih tako, da smo v visoke teflonske posodice (50 ml), imenovane tudi bubblerji, nalili 40 ml MilliQ vode in jim dodali primeren volumen standardne raztopine. Meritvi ozadja (angl. bubbler blank) nismo dodali nič, standardu 25 pg smo dodali 25 µl standardne raztopine, standardu 50 pg 50 µl in standardu 100 pg 100 µl standardne raztopine. Preostale serije vzorcev so bile vedno sestavljene iz dveh eksperimentalnih vzorcev, iz meritve ozadja oz. bubbler blanka in standarda 100 pg. Z meritvijo ozadja smo preverjali čistost teflonskih posodic in pasti, na katere smo lovili etilirane oblike Hg, s standardom 100 pg pa smo preverjali občutljivost in pravilnost delovanja instrumenta. Vsem vzorcem smo ob pripravi dodali 100 µl 2M acetatnega pufra in 50 µl etilacijskega reagenta (1% raztopina natrijevega tetraetilborata v 2% KOH).

Skupni volumen etilacijske mešanice je bil približno 40 ml. Teflonke smo dobro zaprli in premešali ter pustili, da je etilacija potekala 15 minut pri sobni temperaturi. Po 15 minutah smo na posebno oblikovane nastavke na teflonkah namestili steklene pasti, napolnjene s Tenaxom. TenaxTM je porozni polimerni material na osnovi 2,6-difenilen oksida in je posebno oblikovan za vezavo hlapnih snovi, ki se sproščajo iz različnih materialov. Uporabo Tenaxa kot del standardnih metod predpisuje tudi US EPA (TenaxTM, 2008). Etilacijske mešanice smo nato 15 minut prepihovali z N₂ (angl. bubbling), ki je etilirane oblike Hg izpodrival iz raztopine. Te so se istočasno lovile na pasti. Po končanem prepihovanju posodic z vzorcem smo 5 minut z N₂ prepihovali še pasti same, s čemer smo se znebili vodnih molekul, ki se lahko v postopku prepihovanja ujamejo na pasti in močno motijo postopek merjenja (Horvat in sod., 1993). Da bi se izognili sistematični napaki, smo teflonske posodice in pasti ves čas menjavali in poskrbeli, da nismo slepe probe ali standarda 100 pg pripravljali vedno v isti posodici ali ju lovili na vedno isto past.

Pasti smo nato namestili na aparaturo za separacijo s plinsko kromatografijo prizvajalca Kambič in detekcijo količine MeHg z atomsko fluorescenčno spektrometrijo hladnih par ali CV-AFS. Uporabljali smo detektor proizvajalca Brooks Rand, ZDA.

Napako meritev smo določili z izračunom standardnega odklona višine kromatografskega signala standarda 100 pg. Zaradi velikega števila meritev je ocena napake relativno zanesljiva in znaša $\pm 8,1$ %.

3.3.2 Analize celokupnega raztopljenega Hg (Hg_{tot})

Za preprečevanje kontaminacije naših vzorcev smo morali pred njihovo pripravo najprej pripraviti testne teflonske posodice. Dobro smo jih sprali z MilliQ vodo, nato pa smo MilliQ vodi v posodicah dodali 1 ml BrCl in 1 ml HCl (Suprapur). Čez noč smo jih obsevali z UV svetlobo. Naslednji dan smo posodice izpraznili in jih ponovno dobro sprali z MilliQ vodo. Dodani BrCl je močan oksidant, ki pretvori celokupno raztopljeno Hg v Hg^{2+} (s tem preprečimo izgube s hlapljenjem Hg^0), UV svetloba pa povzroča razgradnjo koloidov, ki bi bili morebiti prisotni v vzorcu in bi imeli vezano Hg.

V očiščene testne teflonske posodice smo odtehtali preostalo količino vzorca (kolikor ga je ostalo od meritev MeHg) in jim dodali 0,5 ml HCl (Suprapur) ter 1 ml BrCl. Teflonske posodice smo nato za tri ure postavili pod UV. Dnevno smo tako pripravili po pet vzorcev (ena ponovitev), dve slepi probi (blank), s katerima smo preverjali čistost testnih posodic in določili količino Hg, ki ga vzorcem dodamo z reagenti (BrCl, HCl in hidroksilamin hidroklorid ($HONH_3Cl$), pro analysi, Merck) ter OPR (angl. ongoing precision recovery). OPR deluje po istem principu kot 'spike' pri meritvah MeHg, saj znanemu volumnu MilliQ vode dodamo znano količino standarda in s tem preverjamo občutljivost in natančnost instrumenta, poleg tega pa preverjamo tudi sam postopek priprave vzorcev. Delovno standardno raztopino s končno koncentracijo 10 ng/ml smo pripravili dvakrat tedensko tako, da smo odtehtali 94,8 mg MilliQ vode in vanjo odpipetirali 0,2 ml intermediarne standardne raztopine Hg s koncentracijo 5 µg/ml in 5 ml HNO_3 (pro analysi, max 0,005 ppm Hg).

Neposredno pred merjenjem smo vzorcem dodali po 60 µl 12% raztopine $HONH_3Cl$, ki prereducira presežek oksidantov – klora (Cl^-) v vzorcih. Nereduciran klor je lahko problematičen, saj nam lahko poškoduje (pasivira) zlato past, s katero sicer lovimo Hg, in tako popači rezultate.

Postopek merjenja količine Hg_{tot} v vzorcu poteka tako, da alikvot vzorca prelijemo v redukcijsko celico, v kateri je kisl raztopina kositrovega klorida ($SnCl_2$). Reducijsko celico zapremo in skozi usmerimo tok N_2 . $SnCl_2$ povzroči, da se celotno Hg, ki je bilo

prej v obliki Hg^{2+} , oksidira do Hg^0 , tega pa nato tok N_2 vodi preko nevtralizacijske celice, ki je sestavljena iz treh izpiralk s padajočo koncentracijo natrijevega hidroksida (NaOH). V prvi izpiralki je tako 5 ml 10% NaOH, v drugi je 5 ml 5% NaOH, v zadnji pa je 5 ml MilliQ vode. V nevtralizacijski celici se kislinske pare nevtralizirajo. Hg^0 nato s tokom N_2 potuje preko sušilnega sredstva (silikagel), kjer pride do vezave vode. Z uporabo silikagela preprečimo kondenzacijo vodne pare na optičnem delu instrumenta in s tem nespecifično absorpcijo. Za silikagelom se nahaja zlata past, na kateri poteče amalgamacija Hg. S pomočjo grelnega sistema in kantalove žičke pride pri 500–600 °C do termične deamalgamacije Hg. Sproščeni Hg nato s tokom N_2 vodimo naprej v merilno celico in detektiramo z atomsko absorpcijsko spektrometrijo hladnih par ali CV-AAS (angl. cold vapour atomic absorption spectrometry). Uporabljali smo detektor proizvajalca Milton Roy.

Pred začetkom merjenja količine Hg v vzorcih je bilo potrebno očistiti sistem, kar pomeni, da smo celoten sistem zagnali, ne da bi dodali kakršen koli vzorec ali standard. Postopek smo ponovili dvakrat, pri tretji ponovitvi pa smo signal zabeležili in na ta način določili ozadje meritev (angl. bubbler blank). Potrebno je bilo narediti tudi umeritveno krivuljo standardne delovne raztopine. Sestavljena je bila iz meritve ozadja, standarda 0,125 ng Hg in standarda 0,250 ng Hg. V tem območju smo pričakovali, da se bodo gibale vrednosti Hg alikvotov naših vzorcev. Po določitvi kalibracijske krivulje smo postopek meritve ozadja ponovili, s čimer smo se prepričali, da ni prišlo do zastajanja Hg v sistemu.

Vzorcev nismo pripravljali v dveh ponovitvah, smo pa zato dvakrat pomerili posamezen vzorec, s čimer smo preverjali ponovljivost in zanesljivost instrumenta ter lastnega dela. V času merjenja vzorcev smo večkrat pomerili tako ozadje kot tudi standard. Obe vrednosti sta nam služili tudi pri izračunu koncentracije Hg_{tot} v naših vzorcih, na podlagi meritev standarda pa smo določili tudi standardno napako metode, ki je znašala $\pm 6,2 \%$.

3.3.3 Izračun koncentracij Hg_{tot} in MeHg v vzorcih

Na podlagi izmerjene višine kromatografskih vrhov vzorcev, standardov, slepih prob in ozadja smo izračunali koncentracijo Hg_{tot} in MeHg v naših vzorcih.

Za izračun koncentracije MeHg v vzorcih smo uporabili enačbo 1.

$$c_{MeHg} = \frac{h_{vz} - h_{BBlk}}{h_{Std} - h_{BBlk}} \cdot c_{Std} \cdot V_{Std} \cdot \frac{1000}{V_{Vz}} \quad [pg/l] \quad \dots(1)$$

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

h_{Std} – višina kromatografskega signala standarda, ki ustreza 100 pg MeHg [mm]

h_{BBlk} – višina kromatografskega signala ozadja [mm]

c_{Std} – koncentracija standardne delovne raztopine (1 ng/ml)

V_{Std} – volumen dodane standardne delovne raztopine [100 μ l]

V_{vz} – volumen vzorca [ml]

Pri izračunu končne koncentracije smo upoštevali še faktor koncentriranja zaradi nižanja gladine vode v bentoški posodi in povprečni izkoristek ekstrakcije, ki smo ga izračunali na podlagi meritev vzorcev z znano dodano količino standarda (spiking) in slepih prob ter na podlagi vzorcev MilliQ vode z znano količino standarda in slepih prob.

Za izračun mase Hg_{tot} v alikvotu smo uporabili enačbi 2 in 3.

$$m_{al} = \left(\frac{h_{al} - h_{Bb}}{h_{Std} - h_{Bb}} - x \cdot \frac{h_{Blk} - h_{Bb}}{h_{Std} - h_{Bb}} \right) \cdot c_{Std} \cdot V_{Std} \quad [pg] \quad \dots(2)$$

$$x = \frac{V_{al}}{V_{vz}} \quad \dots(3)$$

h_{al} – višina kromatografskega signala alikvota vzorca [mm]

h_{Blk} – višina kromatografskega signala slepe probe [mm]

h_{Bb} – višina kromatografskega signala ozadja [mm]

h_{Std} – višina kromatografskega signala standarda, ki ustreza 250 pg Hg [mm]

c_{Std} – koncentracija standardne delovne raztopine [10 ng/ml oz. 10 pg/ μ l]

V_{Std} – volumen dodane standardne delovne raztopine [25 μ l]

V_{al} – volumen alikvota vzorca [ml]

V_{vz} – volumen vzorca [ml]

Faktor x smo upoštevali zato, ker smo merili alikvot vzorca in ne celotnega vzorca. Vsem vzorcem smo dodali enako količino reagentov, s faktorjem x pa smo upoštevali le del z reagenti dodanega Hg.

Za izračun koncentracije Hg_{tot} v alikvotu (ki je enaka koncentraciji vzorca) smo uporabili enačbo 4.

$$c_{vz} = \frac{m_{al}}{V_{al}} \cdot 1000 \text{ [pg/l]}$$

...(4)

m_{al} – izračunana količina Hg v merjenem alikvotu vzorca [pg]

V_{al} – volumen merjenega alikvota [ml]

Pri izračunu končne koncentracije smo ponovno upoštevali faktor koncentriranja zaradi zniževanja gladine vode v bentoški posodi.

3.4 PREOSTALE ANALIZE

Da smo lažje razložili spreminjanje koncentracije raztopljenih oblik Hg med trajanjem našega poskusa, smo vzporedno opravili še druge analize. V aerobni fazi in fazi reoksigenacije smo spremljali porabo oz. raztapljanje O_2 , v anaerobni fazi smo spremljali spreminjanje koncentracij H_2S , v času celotnega poskusa pa smo analizirali še nitrat in nitrit ($NO_3^- + NO_2^-$), fosfat (PO_4^{3-}), amonij (NH_4^+), Fe, pH in karbonatno alkalnost (za izračun DIC) in DOM.

3.4.1 Analize kisika (O_2)

Koncentracije O_2 smo dnevno določali v laboratoriju Morske biološke postaje v Piranu. Določali smo jih z modificirano metodo titracije po Winklerju (Grasshoff in sod., 1999). Modificirali smo jo tako, da vzorev, v katerih smo določali koncentracijo O_2 , nismo zajeli v stekleničke z brušenim vratom, temveč v 50 ml siringo. V siringo smo nato dodali po 0,5 ml raztopine NaOH in $MnCl_2$ ter tako oborili raztopljeni kisik. Napaka meritve je $\pm 5\%$.

3.4.2 Analiza vodikovega sulfida (H_2S) in nutrientov

Koncentracije H_2S oz. S^{2-} in nutrientov NO_3^- in NO_2^- , PO_4^{3-} ter NH_4^+ smo določili v laboratoriju Morske biološke postaje v Piranu. Določili smo jih s standardnimi spektrofotometričnimi oz. kolorimetričnimi metodami (Grasshoff in sod., 1999). Napaka meritev znaša $\pm 3\%$.

3.4.3 Analize fluorescirajoče raztopljene organske snovi (FDOM – fluorescent dissolved organic matter)

Količino FDOM v vzorcih smo določili v laboratoriju Morske biološke postaje v Piranu. Določili smo jo z merjenjem fluorescence. Za huminske in fulvinske kisline je značilno, da

imajo absorpcijski maksimum pri 350 nm (eksitacija), emisijski maksimum pa pri 450 nm (Skoog in sod., 1996).

3.4.4 Analize vsebnosti DIC

Raztopljeni anorganski ogljik (DIC) smo izračunali iz karbonatne alkanosti in pH, z uporabo ustreznih disociacijskih konstant (Hansson in Jagner, 1973). Alkalnost smo določili titrimetrično (Edmond, 1970). Napaka meritev znaša $\pm 2 \%$.

3.4.5 Analize vsebnosti Fe

Vsebnosti raztopljenega Fe smo določili s plamensko AAS. Napaka meritev znaša $\pm 2 \%$

4 REZULTATI

Eksperiment je bil razdeljen na tri faze. Prva faza je bila aerobna oz. oksična faza, v kateri se je postopno porabljal O_2 . Po tej fazi je nastopila anaerobna oz. anoksična faza, ki smo jo vzdrževali dvanajst dni. Anaerobni fazi pa je sledila faza reoksigenacije. Raztapljanja O_2 nismo pospeševali, temveč smo pustili, da se je raztapljal z difuzijo.

Do popolne porabe kisika je prišlo že šesti dan eksperimenta. Zaradi zapoznelega trenda gibanja koncentracij MeHg in Hg_{tot} ter večine ostalih nutritiv (v primerjavi s koncentracijami O_2), smo eksperiment razčlenili drugače. Po novem je aerobna faza potekala od prvega do trinajstega dneva (1.–13. dan) in je vključevala tudi proces denitrifikacije [modre točke na grafih], anaerobna faza je potekala od štirinajstega do devetnajstega dneva (14.–19. dan) [rdeče točke na grafih], faza reoksigenacije pa od dvajsetega do šestindvajstega dneva (20.–26. dan) [zelene točke na grafih]. Pri rezultatih Fe in DOM zapoznelega trenda nismo opazili, zato so rezultati aerobne in anaerobne faze združeni [modre točke z rdečo obrobo].

V preglednici 4 so navedeni rezultati izračuna koncentracij raztopljenega Hg_{tot} in MeHg. Pri izračunih obojih koncentracij smo upoštevali faktor koncentriranja zaradi zniževanja gladine v bentoški posodi ob nastopu faze reoksigenacije, rezultati raztopljenega MeHg pa so popravljeni še za faktor izkoristka ekstrakcije.

Preglednica 4: Masne in molske koncentracije Hg_{tot} in MeHg v vzorcih vodnega stolpca ter molski odstotek MeHg v Hg_{tot}

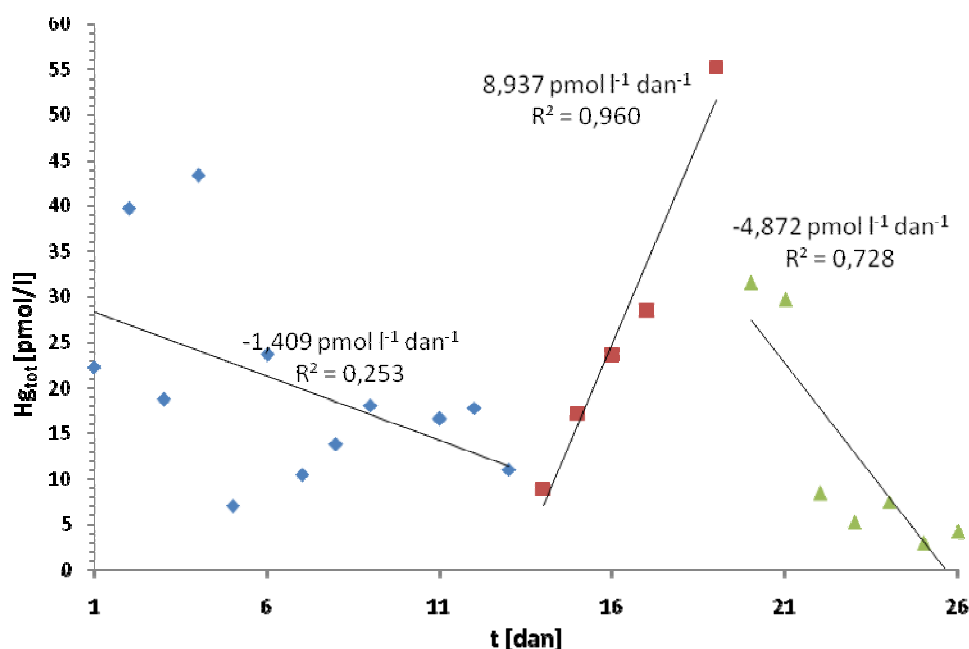
faza	dan eksperimenta	Hg_{tot}	Hg_{tot}	MeHg	MeHg	Molski odstotek
eksperimenta	in oznaka	[ng/L]	[pM]*	[ng/L]	[pM]*	MeHg [%]
aerobna	1. dan (t=0)	4,481	22,338	1,798	8,341	37,3
	2. dan (t=1)	7,960	39,684	0,908	4,213	10,6
	3. dan (t=2)	3,749	18,688	0,050	0,230	1,2
	4. dan (t=3)	8,695	43,347	0,038	0,177	0,4
	5. dan (t=4)	1,421	7,083	0,160	0,744	10,5
	6. dan (t=5)	4,736	23,611	0,534	2,479	10,5
	7. dan (t=6)	2,093	10,434	0,050	0,231	2,2

se nadaljuje

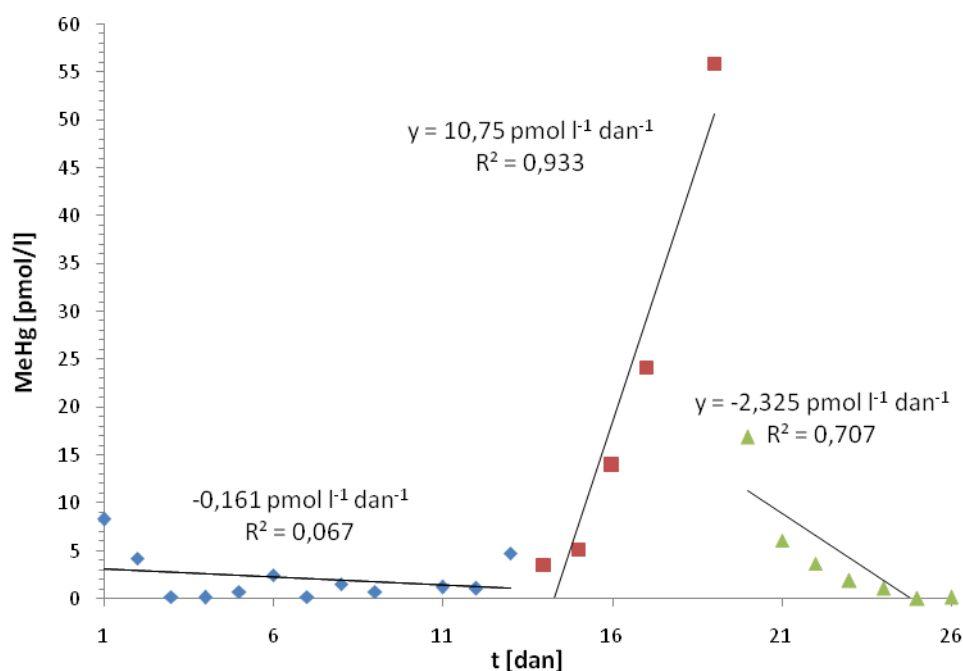
nadaljevanje preglednica 4: Masne in molske koncentracije Hg_{tot} in MeHg v vzorcih vodnega stolpca ter molski odstotek MeHg v Hg_{tot}

faza eksperimenta	dan eksperimenta in oznaka	Hg_{tot} [ng/L]	Hg_{tot} [pM]*	MeHg [ng/L]	MeHg [pM]*	Molski odstotek MeHg [%]
anaerobna	8. dan (t=7)	2,782	13,870	0,338	1,569	11,3
	9. dan (t=8)	3,634	18,117	0,156	0,726	4,0
	11. dan (t=9)	3,330	16,603	0,265	1,227	7,4
	12. dan (t=10)	3,565	17,771	0,238	1,104	6,2
	13. dan (t=11)	2,211	11,024	1,033	4,792	43,5
	14. dan (t=12)	1,791	8,930	0,762	3,538	39,6
	15. dan (t=13)	3,462	17,257	1,120	5,197	30,1
	16. dan (t=14)	4,718	23,522	3,012	13,972	59,4
faza reoksigenacije	17. dan (t=15)	5,705	28,441	5,208	24,155	84,9
	19. dan (t=16)	11,074	55,208	12,062	55,948	101,3
	20. dan (t=17)	6,324	31,528	3,646	16,912	53,6
	21. dan (t=18)	5,958	29,704	1,326	6,151	20,7
	22. dan (t=19)	1,691	8,427	0,800	3,711	44,0
	23. dan (t=20)	1,040	5,185	0,411	1,907	36,8
	24. dan (t=21)	1,152	7,556	0,250	1,114	14,7
	25. dan (t=22)	0,588	2,931	0,005	0,023	0,8
	26. dan (t=23)	0,840	4,190	0,034	0,159	3,8

* enote molske koncentracije so za en red velikosti manjše od enot masne koncentracije



Slika 6: Spreminjanje koncentracij Hg_{tot} v vodnem stolpcu med eksperimentom v bentoški posodi

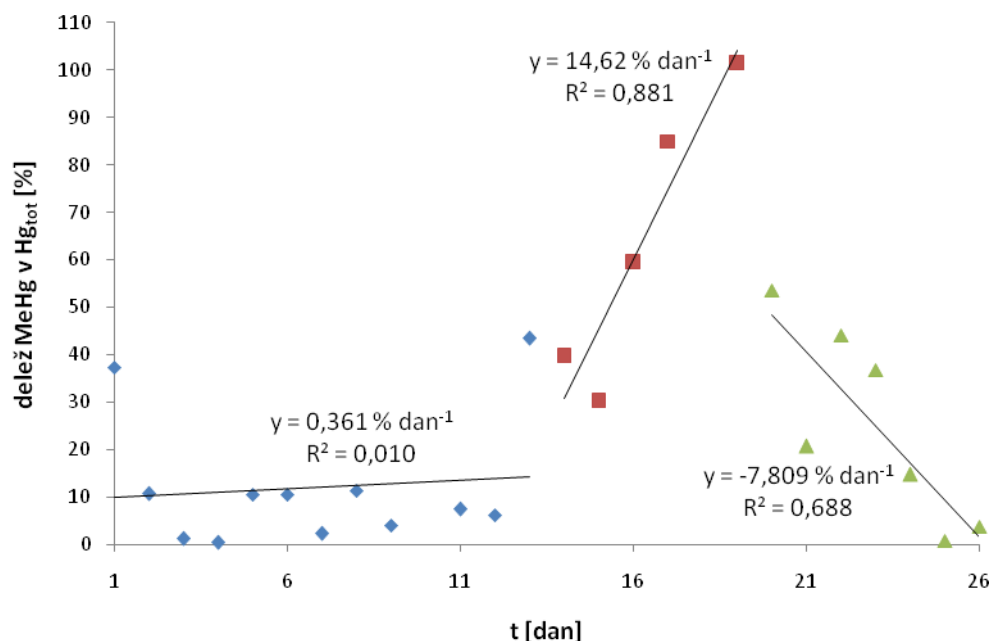


Slika 7: Spreminjanje koncentracij MeHg v vodnem stolpcu med eksperimentom v bentoški posodi

Sliki 6 in 7 kažeta, da v aerobni fazi koncentracije Hg_{tot} in MeHg močno nihajo in kažejo celo negativen trend. Pri tem je potrebno omenjene rezultate obravnavati z distanco, saj so korelacijski koeficienti (R^2) zelo nizki in kažejo na statistično negotovost.

Popolnoma drugače je z rezultati anaerobne faze, kjer začnejo koncentracije MeHg in Hg_{tot} v vodnem stolpcu močno naraščati. Hitrost naraščanja koncentracij MeHg je večja od hitrosti naraščanja koncentracij Hg_{tot} . Slika 8 nam prikazuje, kako delež MeHg v izmerjenem Hg_{tot} z vsakim dnem anaerobne faze narašča. Zadnji dan anaerobne faze (19. dan eksperimenta) MeHg predstavlja ves Hg, izmerjen v vodnem stolpcu.

Ob nastopu faze reoksigenacije pride do zelo hitrega padca koncentracij Hg_{tot} , še bolj pa je zmanjšanje opazno pri MeHg. V naslednjih dneh padanje koncentracij ni več tako izrazito oz. postane bolj enakomerno. Hitrost zmanjševanja koncentracij Hg_{tot} v vodnem stolpcu je za polovico manjša od hitrosti naraščanja v anaerobni fazi, medtem ko je hitrost zmanjševanja koncentracij MeHg ob ustalitvi kar petkrat manjša od hitrosti naraščanja v anaerobni fazi.



Slika 8: Spreminjanje deleža MeHg v Hg_{tot} v posamezni fazi eksperimenta v bentoški posodi

Slika 9 nam prikazuje spreminjanje koncentracij preostalih analiziranih snovi v vzorcih. Do popolne porabe kisika pride že šesti dan eksperimenta. V fazi reoksigenacije opazimo njegovo hitro raztapljanje, vodni stolpec pa je zadnji dan eksperimenta že popolnoma oksidiran in vsebuje enake količine O₂ kot v začetku eksperimenta.

Opazimo, da se v vodnem stolpcu spreminjajo tudi koncentracije NO₃⁻ in NO₂⁻. Do porabe v aerobni fazi verjetno prihaja zaradi denitrifikacije, ki pri nastalih redoks razmerah konkurira sulfatni respiraciji. V fazi reoksigenacije se koncentracije NO₃⁻ in NO₂⁻ v vodnem stolpcu ponovno povečajo.

Aktivnost SRB smo začeli spremljati ob popolni porabi O₂. V aerobni fazi nekega statistično relevantnega naraščanja koncentracij oz. kopičenja H₂S ni mogoče opaziti, se pa koncentracije močno povečajo v anaerobni fazi. Kopičenja H₂S v aerobni fazi ob prisotnosti O₂ ponavadi ni mogoče opaziti, saj se H₂S navadno reoksidira. Hines in sod. (1997) navajajo, da se O₂ v Tržaškem zalivu ponavadi porabi za reoksidacijo reduciranih

kemijskih zvrsti in ne za aerobni metabolizem. V fazi reoksigenacije koncentracije H_2S močno padejo, verjetno na račun reoksidacije v SO_4^{2-} .

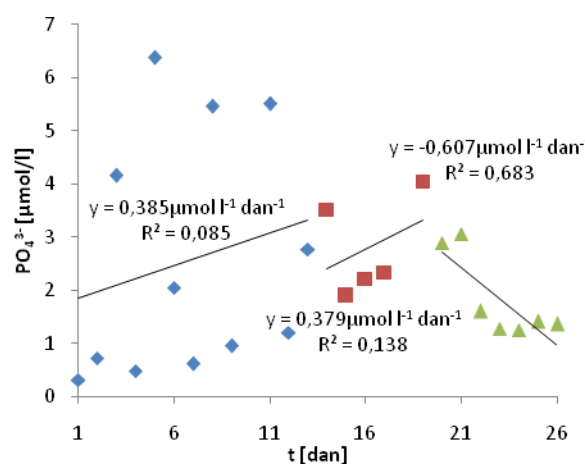
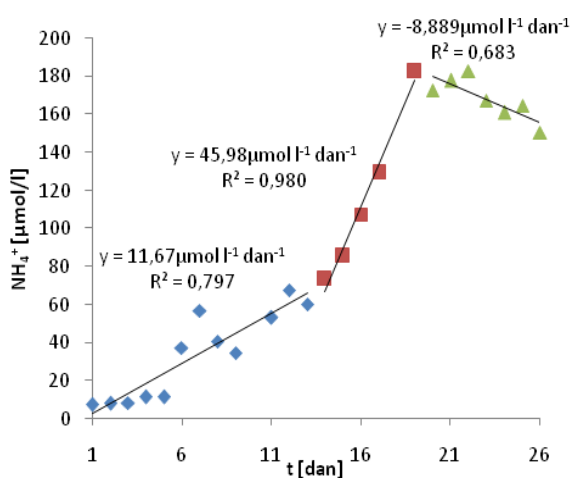
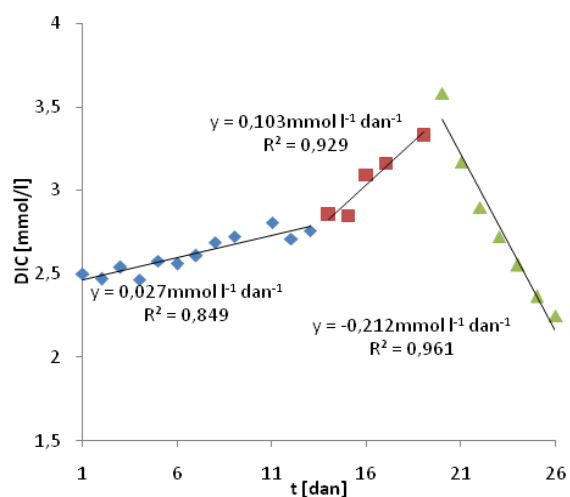
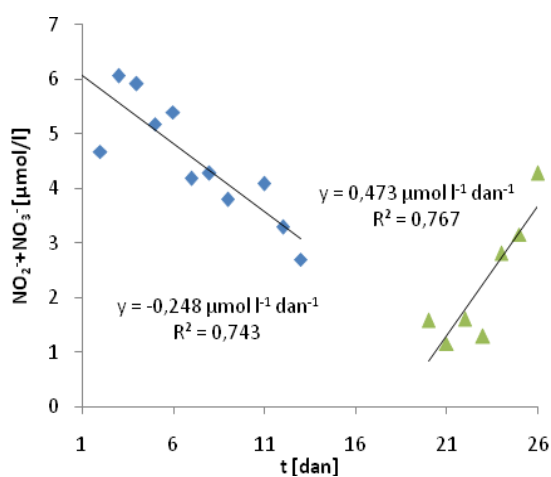
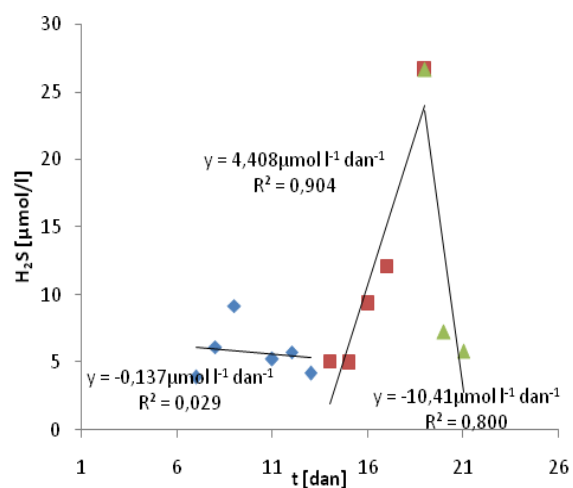
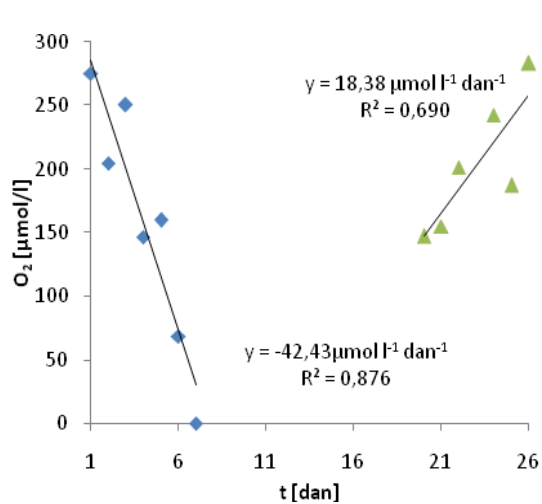
Zelo zanimivo je tudi spreminjanje koncentracij NH_4^+ . Njegove koncentracije konstantno naraščajo že v aerobni fazi, v anaerobni fazi pa se hitrost kopičenja NH_4^+ še poveča. Omenjena trenda kažeta na intenzivno razgradnjo organske snovi. V fazi reoksigenacije začnejo koncentracije NH_4^+ padati.

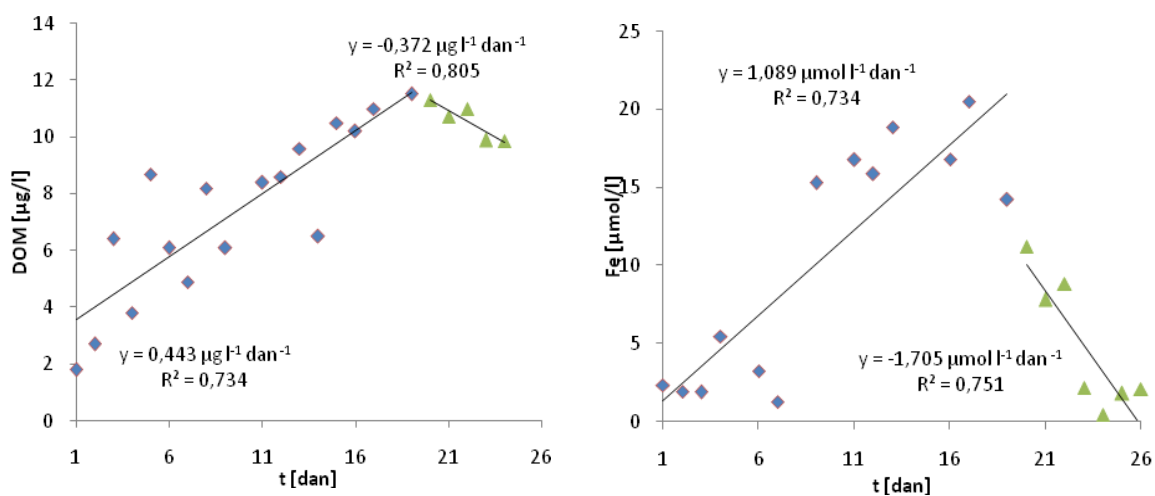
Pri spreminjanju koncentracij PO_4^{3-} v vodnem stolpcu najprej v aerobni fazi opazimo nestanovito oz. nelinearno naraščanje. V anaerobni fazi koncentracije PO_4^{3-} še vedno naraščajo. Pri razlagi dobljenih rezultatov moramo biti spet previdni, saj so vrednosti korelacijskega koeficienta nizke in verjetno obstaja več razlag za opaženo spreminjanje. V fazi reoksigenacije se začnejo koncentracije linearno zniževati.

V vodnem stolpcu smo merili tudi koncentracijo DOM oz. natančneje FDOM. Za DOM je značilna velika površina in sposobnost vezave Hg oz. MeHg. Prav tako je za DOM značilna tudi vezava na alumosilikate in Fe-oksihidrokside, prisotne v sedimentu. Ob spremenjenem redoks potencialu pride do sprememb nabojev na površini alumosilikatov in do redukcije Fe^{3+} v Fe^{2+} , kar omogoči raztapljanje DOM. Rezultati DOM iz aerobne in anaerobne faze so združeni. Enako je z rezultati Fe.

Tako nam podatki DOM v aerobni in anaerobni fazi kažejo, da so se v sedimentu redoks razmere postopoma spreminjale v bolj reducirajoče, kar je povzročilo povečano sproščanje oz. raztapljanje DOM, v fazi reoksigenacije pa so se koncentracije znižale, kar bi lahko bila posledica bolj oksidirajočih redoks razmer in ponovnega obarjanja oz. vezave DOM na Fe-oksihidrokside ali alumosilikate.

Zgoraj navedeno lahko potrdimo tudi z rezultati meritev vsebnosti raztopljenega Fe^{2+} . Njegove koncentracije se zaradi spreminjajočih se redoks razmer v aerobni in anaerobni fazi hitro povečujejo. V fazi reoksigenacije je mogoče opaziti strm padec koncentracij tega elementa. Padec gre pripisati oksidirajočim razmeram v vodnem stolpcu, zaradi česar se je Fe^{2+} oksidiral v Fe^{3+} in oboril.





Slika 9: Spreminjanje koncentracij O_2 , H_2S , NO_3^- in NO_2^- , DIC, NH_4^+ , PO_4^{3-} , DOM in Fe v vodnem stolpcu med eksperimentom v bentoški posodi

Preglednica 5: Hitrost spreminjanja koncentracij analiziranih snovi v vodnem stolpcu med eksperimentom v bentoški posodi

Analizirana snov	Hitrost [$\mu\text{mol l}^{-1} \text{ dan}^{-1}$]		
	aerobna (oksična) faza	anaerobna (anoksična)	faza reoksigenacije
	[1. – 13. dan]	faza [14. – 19. dan]	[20. – 26. dan]
O ₂	-42,43		18,38
H ₂ S	-0,137	4,408	-10,41
NO ₃ ⁻ in NO ₂ ⁻	-0,248		0,473
DIC [□]	0,027	0,103	-0,212
NH ₄ ⁺	11,67	45,98	-8,889
PO ₄ ³⁻	0,385	0,379	-0,607
DOM ^Δ		0,443	-0,372
Fe		1,089	-1,705
Hg _{tot} [*]	-1,409	8,937	-4,872
MeHg [*]	-0,161	10,75	-2,325

rezultati, napisani odebeljeno, so statistično relevantni oz. je vrednost R² višja od 0,6

□enote hitrosti spreminjanja koncentracij DIC so mmol l⁻¹ dan⁻¹

*enote hitrosti spreminjanja koncentracij MeHg in Hg_{tot} so pmol l⁻¹ dan⁻¹

Δenote hitrosti spreminjanja koncentracij DOM so μg l⁻¹ dan⁻¹

Raztapljanje, ki je posledica redukcije Fe³⁺ v Fe²⁺ in njegovo obarjanje v obliki FeS₂ je razvidno tudi s spodnje slike, kjer vidimo črno obarvanost sedimenta. Nastanek oborine je eden izmed dokazov za aktivnost SRB.



Slika 10: Obarvanost sedimenta zaradi obarjanja Fe^{2+} v obliki FeS_2 in rumeno-rdeča usedlina Fe_2O_3 na površini sedimenta (posledica postopne oksigenacije)

Snovne tokove, ki so podani v preglednici 6, smo izračunali tako, da smo hitrosti, dobljene iz linearnih regresij (podane v preglednici 5), pomnožili z višino vodnega stolpca v bentoški posodi (v povprečju je znašala 16 cm).

Preglednica 6: Snovni tokovi analiziranih snovi med eksperimentom v bentoški posodi

Snovni tok analizirane snovi	Snovni tok [$\text{mmol m}^{-2} \text{ dan}^{-1}$]		
	aerobna (oksična) faza [1. – 13. dan]	anaerobna (anoksična) faza [14. – 19. dan]	faza reoksigenacije [20. – 26. dan]
J_{O_2}	-6,79		2,94
$J_{\text{H}_2\text{S}}$	-0,02	0,71	-1,67
$J_{\text{NO}_3^-}, \text{NO}_2^-$	-0,04		0,08
J_{DIC}	4,32	16,48	-33,92
$J_{\text{NH}_4^+}$	1,87	7,36	-1,42
$J_{\text{PO}_4^{3-}}$	0,06	0,06	-0,10
J_{DOM}^{Δ}		0,07	-0,06
J_{Fe}		0,02	-0,03
$J_{\text{Hg}_{\text{tot}}}^*$	-0,23	1,43	-0,78
J_{MeHg}^*	-0,03	1,72	-0,37

številke, napisane odebeljeno, so statistično relevantne

*snovna tokova MeHg in Hg_{tot} sta podana v $\text{nmol m}^{-2} \text{ dan}^{-1}$ $^{\Delta}$ snovni tok DOM je podan v $\text{mg m}^{-2} \text{ dan}^{-1}$

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Bentoški procesi in tokovi

Hitra poraba in padec koncentracij NO_3^- v času nam kažejo, da je v sedimentu potekala intenzivna razgradnja organske snovi in da je v globljih plasteh sedimenta potekala denitrifikacija (nitrarna respiracija) ali disimilativna redukcija nitrata do amonija (nitrarna amonifikacija). Sulfatna respiracija, ki je najpomembnejši anaerobni proces v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod., 1997), je v sedimentu verjetno potekala ves čas, vendar je prišlo do opaznega kopičenja H_2S šele trinajsti dan oz. pet dni po popolni porabi O_2 v vodnem stolpcu.

Na intenzivno razgradnjo organske snovi kažejo tudi spremembe koncentracij NH_4^+ . Glede na to, da so se koncentracije v vodni stolpec sproščenega NH_4^+ ob nastopu anaerobne faze in med njo močno povečale, lahko zaključimo, da je bila razgrajena organska snov bogata z dušikom (Hines in sod., 2006). Poraba oz. zmanjševanje koncentracij NO_3^- in NO_2^- v aerobni fazi je lahko posledica denitrifikacije, pri kateri sta končna produkta N_2 in N_2O , ki sta slabo topna in inertna za pretvorbe. Vendar na osnovi naših rezultatov težko ločimo med denitrifikacijo in nitrarno amonifikacijo, saj so koncentracije NH_4^+ dva reda velikosti višje od koncentracij NO_3^- in NO_2^- . Znano pa je, da nitrarna amonifikacija prevladuje v izrazitih anoksičnih (reduktivnih) razmerah (Christensen in sod., 2000). Ponovno povišanje NO_3^- v fazi reoksigenacije je posledica nitrifikacije. Gre za striktno aeroben proces, ki ga vodijo kemolitoavtotrofni mikroorganizmi. Nitrifikacijo in denitrifikacijo so kot pomembna procesa v teh sedimentih opisali že Kemp in sod. (1999) ter Hines in sod. (1997, 2000).

Meritve DIC v našem eksperimentu predstavljajo anorganske oblike C (CO_2 , karbonate in bikarbonate). Spreminjanje koncentracij DIC prav tako kaže na intenzivno razgradnjo organske snovi v aerobni fazi, vendar je razgradnja še intenzivnejša v anaerobni, saj je tok DIC močno povečan. Ogrinc in sod. (2003) so na podlagi meritev izotopske sestave DIC v

Tržaškem zalivu ugotovili, da je večina DIC posledica mineralizacije organske snovi in da gre 2/3 DIC pripisati sulfatni respiraciji. V tej fazi bi lahko povečan tok pripisali tudi raztapljanju karbonatov, do katerega pride zaradi kislih končnih produktov anaerobnega metabolizma. Ogrinc in sod. (2003) so ugotovili, da pozno poleti, ko je temperatura najvišja in metabolizem mikroorganizmov najbolj intenziven, raztopljeni karbonati predstavljajo kar 11 % vsega DIC. V fazi reoksigenacije je tok DIC močno negativen, kar bi lahko pripisali delovanju kemolitotrofnih nitrifikatorjev, ki CO_2 uporabljajo kot edini vir C za izgradnjo celičnega materiala. Negativni tok je lahko tudi posledica ponovnega obarjanja karbonatov. O vplivu CO_2 kot produktu demetilacije MeHg na rezultate DIC je težko govoriti in delati kakršne koli zaključke. Za točno določitev hitrosti in obsega metilacije in demetilacije bi bilo potrebno uporabiti radioaktivno označene reagente.

Za PO_4^{3-} v severnem Jadranu velja, da je limitni dejavnik, kar pomeni, da se večina PO_4^{3-} , prisotnega v razkrajajoči organski snovi, porabi za izgradnjo nove biomase. Znano je tudi, da morski in sladkovodni sedimenti predstavljajo pomemben rezervoar fosforja (P). Gre za rezervoar, v katerem je kroženje počasno (pretežno geokemijsko). Dostopnost P je omejena, saj je zanj značilno, da se obarja v prisotnosti Ca^{2+} , Mg^{2+} in Fe^{3+} ionov. Do raztapljanja fosfata prihaja ob spremembi redoks razmer, kar je tudi razlog za porast koncentracij raztopljenega PO_4^{3-} v našem poskusu v aerobni in anaerobni fazi eksperimenta. Vendar pa kakšnih bistvenih zaključkov na podlagi naših rezultatov ne moremo narediti, saj se vrednosti skokovito spreminjajo, nizek je tudi korelacijski koeficient. V fazi reoksigenacije prihaja do ponovnega obarjanja PO_4^{3-} .

Zmanjšanje koncentracije O_2 je povzročilo povečan anaerobni metabolizem, kjer lahko Fe^{3+} nastopa kot končni akceptor elektronov, ob tem pa nastaja v vodi bolj topen Fe^{2+} (Ogrinc in Faganeli, 2006). Zaradi spremenjenih redoks razmer je lahko prišlo tudi do hitre kemijske redukcije Fe^{3+} , ki je v anaerobnih okoljih pogosto konkurenčna mikrobnim transformacijam (Canfield in sod., 2005). FeS_2 smo opazili kot črno oborino na meji sediment-voda, prav tako se je Fe kot FeS_2 obarjal tudi v pornih vodah, saj je bil sediment počrnjen po celotni globini. To je razvidno s slike 10, kjer je O_2 v nekaj dneh (ob nastopu faze reoksigenacije) že dosegel površino sedimenta, saj je tam črna oborina izginila in je nastala rdeče-rumena oborina Fe_2O_3 , ni pa še dosegel nižjih plasti.

Tok Fe v aerobni in anaerobni fazi (združeni) je močno pozitiven, kar kaže na intenzivno raztapljanje kompleksov Fe. Sočasno z redukcijo (biotsko ali abiotsko) Fe^{3+} v Fe^{2+} je potekalo tudi njegovo obarjanje v netopni FeS_2 , kar lahko razložijo tudi rezultati H_2S . Tok Fe v aerobni fazi močno korelira s tokom DOM, kar pomeni, da je organska snov v sedimentih Tržaškega zaliva povezana s Fe-oksihidroksidi.

Zaradi raztapljanja kompleksov Fe, na katerega so lahko vezane anorganske oblike Hg in MeHg, so se tudi koncentracije slednjih v vodnem stolpcu povečale. Hitrost spreminjanja koncentracij MeHg je v anaerobni fazi večja od hitrosti spreminjanja koncentracij Hg_{tot} . V anaerobni fazi eksperimenta se je delež MeHg v Hg_{tot} močno povečal (slika 8), kar lahko pripišemo povečani aktivnosti SRB in 'ugodnim' redoks razmeram, ki so omogočile tok MeHg iz pornih vod v vodni stolpec. Tako za organske kot anorganske kemijske zvrsti Hg je sicer značilna sorpcija na organske in anorganske snovi v sedimentu, vendar so anorganske oblike vezane močnejše kot organske (Suchanek in sod., 1998). To lahko dodatno razloži, zakaj sta hitrost spreminjanja koncentracij in snovni tok MeHg večja od hitrosti in snovnega toka Hg_{tot} .

Ker je za Hg značilna tudi kompleksacija z DOM (FDOM), ki je lahko adsorbirana na omenjene Fe-oksihidrokside ali alumosilikate, v našem primeru ne moremo kvantitativno oceniti, kolikšen del v vodni stolpec sproščenega MeHg je dejansko posledica sproščanja iz kompleksirajočih snovi in kolikšen del predstavlja MeHg, sintetiziran med našim poskusom.

Videti pa je, da DOM na tok Hg in MeHg ne vpliva pomembno oz. večina Hg in MeHg ni vezanega na DOM, saj bi v nasprotnem primeru v anaerobni fazi eksperimenta tako kot pri Hg_{tot} in MeHg, opazili tudi močno povečani tok DOM.

V našem eksperimentu nismo merili vsebnosti Hg^0 , ki lahko predstavljal pomembno frakcijo Hg, sproščenega v vodni stolpec (Covelli in sod., 2008). Ob predpostavki, da je metilacija v vodnem stolpcu zanemarljiva, bi lahko prav Hg^0 predstavljal tisti delež v Hg_{tot} (ki ni MeHg), ki se v anaerobni fazi vztrajno zmanjšuje. Druga možna razlaga za opazen pojav je reakcija sproščenega Hg^{2+} s H_2S in njegovo obarjanje v obliki HgS .

V fazi reoksigenacije so se koncentracije Hg_{tot} , MeHg in DOM hitro znižale. Opazovani pojav lahko pripišemo readsorpciji in koprecipitaciji na površinah Fe-oksihidroksidov in mineralov glin. Tako kot v anaerobni fazi tudi v fazi reoksigenacije ne moremo kvantitativno ovrednotiti, kolikšen delež k zmanjševanju koncentracij opazovanih snovi prispevata ponovno obarjanje in kolikšen delež demetilacija (v primeru MeHg). Vsekakor demetilacija poteka, kar je razvidno s slike 8, ki nam kaže, kako se delež MeHg zmanjšuje.

5.1.2 Pomen za Tržaški zaliv

Zanimiva je primerjava bentoških tokov Hg in MeHg na postaji CZ s predhodno izmerjenimi tokovi v Gradeški laguni (postaja BAR; Covelli in sod., 2008). Medtem ko sta oba tokova v aerobni fazi na postaji CZ usmerjena v sediment, sta bila tokova na postaji BAR usmerjena iz sedimenta. Razlike lahko pripišemo približno 10-krat višji koncentraciji Hg_{tot} in 50-krat višji koncentraciji MeHg v površinskem sedimentu Gradeške lagune (v primerjavi s sedimenti na postaji CZ), medtem ko so ostali pomembni biogeokemijski parametri približno enaki (zrnastost, C_{org} , N_{tot} , razmerje C/N). Tudi koncentracije raztopljenega Hg in MeHg v pornih vodah sedimentov Gradeške lagune so približno 2-krat višje kot v Tržaškem zalivu. Izstopa le približno 5-krat višja vsebnost S_{tot} , kar kaže na večji pomen redukcije sulfata in s tem tudi hitrosti metilacije v sedimentu. V anaerobni fazi sta oba tokova na obeh postajah usmerjena iz sedimenta in sta količinsko primerljiva.

Naši rezultati in rezultati prejšnjih raziskav, opravljenih na področju Tržaškega zaliva, kažejo na velik metilacijski potencial lokalne mikrobne združbe. Ta potencial je zelo odvisen od številnih abiotskih dejavnikov, ki posredno in neposredno vplivajo na mikroorganizme in na samo gibanje različnih kemijskih zvrsti v tem ekosistemu. Redoks potencial igra izjemno vlogo pri aktivnosti SRB in mobilizaciji MeHg iz pornih vod v vodni stolpec.

Zanimiva je tudi primerjava med našimi izmerjenimi tokovi in predhodno izmerjeno celotno produkcijo MeHg (razliko med metilacijo Hg in demetilacijo MeHg) na postaji CZ, ki znaša približno $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{dan}^{-1}$ (Hines et al., 2006). Opazimo, da je produkcija MeHg približno 2-krat večja od toka MeHg v anaerobnih razmerah, kar kaže, da se

pomemben delež nastalega MeHg, ne le v aerobnih razmerah, akumulira v trdni fazi (sedimentu).

Rezultati naše raziskave so pomembni, saj smo z njimi pokazali, da je metilacija Hg v sedimentu obsežna in da je obsežen tudi tok MeHg v vodni stolpec v anaerobnih pogojih, poleg tega pa smo pokazali tudi, da poteka kopičenje MeHg in Hg_{tot} v vodnem stolpcu med anaerobno fazo počasneje kot njuna odstranitev iz vodnega stolpca. Tržaški zaliv je morski bazen, kjer v poletnem obdobju nastopa stratifikacija vodnega stolpca z znižano koncentracijo kisika v plasti pri dnu (hipoksija ali celo anoksija), kar povzroči povečano metilacijsko aktivnost in hitrejši tok MeHg in Hg_{tot} v vodni stolpec. Kako to neposredno vpliva na obseg biomagnifikacije v prehranjevalni verigi, zaenkrat še ni znano, vsekakor pa proces ni zanemarljiv (Faganeli in sod., 2003). Tržaški zaliv je podvržen stalnim vnosom Hg iz idrijskega rudnika. Porečje reke Idrijce je tako kontaminirano, da se količina vnešenega Hg z leti ne zmanjšuje in se verjetno tudi v bližnji prihodnosti še ne bo. Ta ocena temelji na globinskem profilu vsebnosti Hg v prsti okoli reke Idrijce in oceni letne količine erodiranega materiala, ki vstopa v Tržaški zaliv (Kocman, os. sporočilo). Ker predstavlja Tržaški zaliv pomembno ribolovno in marikulturno področje, je poznavanje problematike MeHg nujno potrebno.

5.2 SKLEPI

- čeprav metilacija verjetno poteka v sedimentu tudi v aerobnih razmerah (v vodnem stolpcu), se aktivnost SRB kot osrednjih metilatorjev Hg močno poveča v anaerobnih pogojih
- rezultati potrjujejo hipotezo, da je hitrost metilacije močno odvisna od vsebnosti O_2 v sedimentu in vodnem stolpcu
- prisotnost oz. odsotnost O_2 ne deluje le neposredno na aktivnost SRB, temveč tudi na obnašanje in porazdelitev Hg med sedimentom in vodnim stolpcem – v anaerobnih razmerah se tako tudi zaradi 'ugodnih' redoks razmer pospeši prehajanje v vodni stolpec

- vsebnosti Hg_{tot} in MeHg v vodnem stolpcu so izrednega pomena, saj je prav raztopljena frakcija tega polutanta glavni vir nakopičenega MeHg v prehranjevalnih spletih
- vpliv raztopljenega MeHg na bioakumulacijo in obseg posledic je odvisen predvsem od trajanja anoksičnih pogojev, saj daljša obdobja anaerobioze z razvojem stabilne mikrobne združbe anaerobov pospešujejo metilacijo in zavirajo demetilacijo ter omogočajo hitrejšo in obsežnejšo prehajanje nastalega MeHg iz sedimenta v vodni stolpec
- ob ponovni reoksigenaciji sedimenta in vodnega stolpca prihaja do hitrega in opaznega znižanja koncentracij MeHg in Hg_{tot} v vodnem stolpcu, kar je verjetno posledica intenzivnejše demetilacije ter koprecipitacije in readsorpcije Hg na netopne mineralne in organske snovi v sedimentu
- anaerobne razmere so zaradi specifičnih hidrografskih in geografskih razmer, ki vladajo v Tržaškem zalivu, bolj verjetne – v poletnem obdobju nastopi stratifikacija vodnega stolpca
- verjetnost razvoja hipoksije in anoksije je še toliko večja, ker je Tržaški zaliv podvržen eutrofikaciji zaradi vnosa lahko razgradljive organske snovi
- Tržaški zaliv je plitev (max. 25 m), zaradi česar so temperature vode tudi pri dnu višje, to pa ugodno vpliva na mikrobni metabolizem.
- zaenkrat ne moremo vplivati na količine Hg, ki vstopajo v zaliv z reko Sočo, lahko pa vplivamo na proces eutrofikacije, s čemer lahko vsaj delno prispevamo k zmanjšanemu toku MeHg iz sedimenta v vodni stolpec – s tem bi zmanjšali obseg vnosa MeHg v organizme

6 POVZETEK

Živo srebro je zelo strupen element, v naravi redko zastopan oz. naravno prisoten večinoma v relativno neaktivni obliki, cinabaritu (HgS). Tako človekova dejavnost kot naravni procesi so močno pripomogli k njegovi povečani mobilnosti in aktivnosti v različnih ekosistemih.

Neugodna lastnost živega srebra je ta, da je občutljiv tako na biotske kot abiotske pretvorbe in da so nekatere oblike močno hlapne, kar lajša njegovo biogeokemijsko kroženje med zemeljsko površino in atmosfero. Prisotnost v atmosferi in sproščanje iz nje ter potovanje na dolge razdalje so razlogi, zaradi katerih mu pravimo globalni polutant.

Biogeokemiji Hg v morskem okolju je namenjene največ pozornosti, saj prihaja v tem okolju do obsežnih mikrobnih pretvorb. Najpomembnejša je metilacija Hg v MeHg, ki se lahko kopiči v prehranjevalnih verigah in spletih. Tržaški zaliv predstavlja pomembno mesto raziskav omenjenih pretvorb, saj gre za ekosistem, ki je močno onesnažen s Hg. Vanj se že več kot 500 let izplavljajo ostanki rudniške dejavnosti drugega največjega rudnika Hg na svetu, idrijskega rudnika.

Za potrditev oz. zavrnitev hipoteze, da sta mikroba metilacija in snovni tok MeHg povečana v odsotnosti O₂ in zmanjšana ob njegovem ponovnem vstopu v sistem, smo v sredini Tržaškega zaliva (točka CZ) odvzeli vzorec sedimenta in izvedli inkubacijski poskus. Potekal je 26 dni v temi pri temperaturi 20 °C. V tem času smo odvzeli 24 vzorcev in v njih določili vsebnosti Hg_{tot}, MeHg, O₂, H₂S, NO₃⁻ in NO₂⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, DIC, Fe in DOM. Na podlagi časovnih sprememb koncentracij vseh naštetih kemijskih zvrsti smo izračunali snovne tokove v vodnem stolpcu.

Eksperiment je obsegal tri faze: aerobno (oksično), anaerobno (anoksično) in fazo reoksigenacije. V slednji smo pustili, da se je raztapljal O₂ iz zraka. Sklepamo, da sta procesa metilacije in demetilacije v aerobni fazi verjetno enako hitra. V anaerobni fazi pride zaradi spremenjenih redoks razmer do povečane aktivnosti SRB ter do olajšane mobilizacije MeHg v vodni stolpec, saj pride do redukcije Fe³⁺ v Fe²⁺ (ki je bolj topno) in s

tem do raztapljanja kovinskega oksida, na katerega je lahko vezano Hg. Trajanje anaerobioze je ključnega pomena. V našem eksperimentu je MeHg v najbolj anaerobni fazi eksperimenta predstavljal 100 % celotnega raztopljenega Hg (Hg_{tot}).

Meritve vsebnosti drugih kemijskih zvrsti so nam omogočile vpogled v mikrobne in kemijske procese, ki potekajo v sedimentu in vplivajo na razmere v vodnem stolpcu. Tako smo ugotovili, da lahko razgradljiva organska snov povečuje aktivnost mikrobne združbe, zaradi česar pride do hitre porabe O_2 . V sedimentu potekajo tako denitrifikacija oz. nitratna amonifikacija, kot tudi sulfatna respiracija. Ta je najpomembnejša, saj so SRB osrednji metilatorji Hg. V anaerobnih pogojih poteka tudi mikrobna redukcija Fe^{3+} v Fe^{2+} , kjer Fe^{3+} služi kot akceptor elektronov. Temu procesu pogosto konkurirajo kemijske pretvorbe. Redukcija Fe^{3+} v Fe^{2+} povzroča raztapljanje kovinskih oksihidroksidov, na katere je vezano Hg (tudi MeHg). To povzroča njegovo mobilizacijo v vodni stolpec, od koder lahko vstopa v prehranjevalne verige in spletke. Hg je lahko povezano tudi z DOM, ki se v spremenjenih redoks razmerah sprošča s kovinskih oksihidroksidov, vendar v našem eksperimentu pomembne povezave nismo ugotovili.

V fazi reoksigenacije se koncentracije MeHg in Hg_{tot} v vodnem stolpcu hitro znižajo, kar kaže na povečano aktivnost demetilatorjev, zmanjšanje koncentracij pa je posledica tudi readsorpcije in koprecipitacije s kovinskim oksidom.

Poznavanje biogeokemijskih pretvorb Hg in dejavnikov, ki vplivajo nanje, je pomembno za preprečevanje kopičenja MeHg v morskih organizmih. Preko uživanja teh lahko pride do zastrupitev ljudi in živali. Zaenkrat lahko vplivamo le na vnos lahko razgradljivega organskega materiala v Tržaški zaliv in s tem preprečimo evtrofikacijo. Vprašanje, kako aktivno vplivati na biogeokemijske pretvorbe Hg (predvsem na proces metilacije), pa še vedno ostaja odprto.

7 VIRI

- 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
- Barkay T., Miller S. M., Summers A. O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 355–384
- Barkay T., Gillman M., Turner R. R. 1997. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 11: 4267–4271
- Berman M., Chase T., Bartha R. 1990. Carbon flow in mercury biomethylation by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1: 298–300
- Boening D. W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review. *Chemosphere*, 40: 1335–1351
- Canfield D. E., Thamdrup B., Kristensen E. 2005. *Aquatic geomicrobiology*. Amsterdam, Elsevier: 640 str.
- Christensen P. B., Rysgaard S., Sloth N. P., Dalsgaard T., Schwerter S. 2000. Sediment mineralization, nutrient fluxes, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in an estuarine fjord with sea cage trout farms. *Aquatic Microbial Ecology*, 21: 73–84
- Choi S. C., Chase T., Bartha R. 1994. Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4: 1342–1346

- Compeau G., Bartha R. 1985. Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 2: 498–502
- Covelli S., Faganeli J., De Vittor C., Predonzani S., Acquavita A., Horvat M. 2008. Benthic fluxes of mercury species in a lagoon environment (Grado Lagoon, Northern Adriatic Sea, Italy). *Applied Geochemistry*, 23: 529–546
- Covelli S., Piani R., Kotnik J., Horvat M., Faganeli J., Brambati A. 2006. Behaviour of Hg species in a microtidal deltaic system: The Isonzo River mouth (northern Adriatic Sea). *Science of the Total Environment*, 368: 210–223
- Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Brambati A. 2001. Mercury contamination of coastal sediments as a result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic sea). *Applied Geochemistry*, 16: 541–558
- 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
- Cox C., Marsh D. O., Myers G. J., Clarkson T. W. 1995. Analysis of data on delayed development from the 1971-1972 outbreak of methylmercury poisoning in Iraq: Assessment of influential points. *Neurotoxicology*, 16: 727–730
- DeSimone R. E., Penley M. W., Charbonneau L., Smith S. G. Wood J. M., Hill H. A. O., Pratt J. M., Ridsdale S., Williams R. J. P. 1973. The kinetics and mechanisms of cobalamin-dependent methyl and ethyl transfer to mercuric ion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 304: 851–863
- Edmond J.M. 1970. High precision determination of titration alkalinity and total carbonate dioxide content of sea water by potentiometric titration. *Deep-Sea Research*, 17: 737–750

- 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
- Fleming E. J., Mack E. E., Green P. G., Nelson D. C. 2006. Mercury methylation from unexpected sources: Molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1: 457–464
- Grasshoff K., Kremling K., Ehrhardt M. 1999. *Methods of Seawater Analysis*. 3rd ed. Weinheim, Wiley-VCH: 632 str.
- Gulf of Trieste. 2008. Wikipedia
en.wikipedia.org/wiki/Gulf_of_Trieste (junij, 2008): 1 str.
- Gustin M. S., Lindberg S. E., Weisberg P. J. 2008. An update on the natural sources and sinks of atmospheric mercury. *Applied Geochemistry*, 23: 482–493
- Hall B. 1995. The gas phase oxidation of elemental mercury by ozone. *Water, Air and Soil Pollution*, 80, 1-4: 301–315
- Hamdy M., Noyes O. 1975. Formation of methyl mercury by bacteria. *Applied Microbiology*, 30, 3: 424–432
- Hammerschmidt C. R., Fitzgerald W. F., Balcom P. H., Visscher P. T. 2008. Organic matter and sulfide inhibit methylmercury production in sediments of New York-New Jersey Harbor. *Marine Chemistry*, 109: 165–182
- Hansson I., Jagner D. 1973. Evaluation of the accuracy of Gran plots by means of computer calculations, Applications to the potentiometric titration of the total alkalinity and carbonate content in sea water. *Analytica Chimica Acta*, 65: 363–373

- Hines M. E., Faganeli J., Adatto I., Horvat M. 2006. Microbial mercury transformations in marine, estuarine and freshwater sediment downstream of the Idrija Mercury Mine, Slovenia. *Applied Geochemistry*, 21: 1924–1939
- Hines M. E., Horvat M., Faganeli J., Bonzogo 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 Section A*, 83: 129–139
- Hines M. E., Faganeli J., Planinc R. 1997 Sedimentary anaerobic microbial geochemistry in the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea: Influences of bottom oxygen depletion. *Biogeochemistry*, 39: 65–86
- 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
- Hylander L. D., Meili M. 2003. 500 years of mercury production - global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Science of the Total Environment*, 304: 13–27
- Idrija Turizem. 2008. 20. stoletje. Idrija, Iera (Idrijsko-Cerkljanska razvojna agencija) d.o.o.
<http://www.idrija-turizem.si/sl/idrija-skozi-as/20.-stoletje.html> (maj 2008): 1 str.
- Jereb V., Horvat M., Drobne D., Pihlar B. 2003. Transformations of mercury in terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea). *Science of the Total Environment*, 304: 269–284
- Jensen S., Jernelöv A. 1969. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature*, 223: 753–754

- Kerin E., Gilmour C., Roden E., Suzuki M., Coate, J., Mason R. 2006. Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 12: 7919–7921
- King J. K., Kostka J. E., Frischer M. E., Saunders F. M. 2000. Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 6: 2430–2437
- Lamborg C. H., Fitzgerald W. F., O'Donnell J., Torgersen T. 2002. A non-steady-state compartmental model of global-scale mercury biogeochemistry with interhemispheric atmospheric gradients. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66, 7: 1105–1118
- Lefebvre D. D., Kelly D., Budd K. 2007. Biotransformation of Hg(II) by Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1: 243–249
- Lin C., Pehkonen S. O. 1998. Two-phase model of mercury chemistry in the atmosphere. *Atmospheric Environment*, 32, 14/15: 2543–2558
- Lin C., Pehkonen S. O. 1997. Aqueous free radical chemistry of mercury in the presence of iron oxides and ambient aerosol. *Atmospheric Environment*, 31, 24: 4125–4137
- Lindberg S. E., Harriss R. C. 1974. Mercury-organic matter associations in estuarine sediments and interstitial waters. *Environmental Science and Technology*, 8: 459–462
- Marvin-Dipasquale M. C., Oremland R. S. 1998. Bacterial methylmercury degradation in Florida Everglades peat sediment. *Environmental Science and Technology*, 32: 2556–2563
- Mason R. P., Kim E. H., Cornwell J., Heyes D. 2006. An examination of the factors influencing the flux of mercury, methylmercury and other constituents from estuarine sediment. *Marine Chemistry*, 102: 96–110

Matthiessen A. 1998. Reduction of divalent mercury by humic substances - kinetic and quantitative aspects. *Science of the Total Environment*, 213: 177–183

Mauclair C., Layshock J., Carpi A. 2008. Quantifying the effect of humic matter on the emission of mercury from artificial soil surfaces. *Applied Geochemistry*, 23: 594–601

Mercury (element). 2008. MSN Encarta. Redmond, Microsoft Corporation
[http://encarta.msn.com/encyclopedia_761556180/Mercury_\(element\).html](http://encarta.msn.com/encyclopedia_761556180/Mercury_(element).html) (april 2008): 2 str.

Mercury fountain. 2008. Wikipedia
http://en.wikipedia.org/wiki/Mercury_Fountain (maj 2008): 1 str.

Miklavčič V. 1999. Mercury in the town of Idrija (Slovenia) after 500 years of mining and smelting. V: Mercury contaminated sites. Ebinghaus R., Turner R. R., Lacedra L. D., Vasiljev O., Salomons W. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 257–277

Mlakar I. 1974. Osnovni parametri proizvodnje rudnika Idrija skozi stoletja do danes. *Idrijski razgledi*, 19: 1–40

Munthe J. 1992. The aqueous oxidation of elemental mercury by ozone. *Atmospheric Environment*, 26A, 8: 1461–1468

Munthe J., Xiao Z. F., Lindquist O. 1991. The aqueous reduction of divalent mercury by sulfite. *Water, Air and Soil Pollution*, 56, 1: 621–630

Myers G. J., Dawidson P., Cox C., Shamlaye C., Cernichiari E., Clarkson T. W. 2000. Twenty-seven years studying the human neurotoxicity of methylmercury exposure. *Environmental Research Section A*, 83: 275–285

Nagase H., Ose Y., Sato T. 1984. Mercury methylation by compounds in humic material. *Science of the Total Environment*, 32: 147–156

- Nagase H., Ose Y., Sato T., Ishikawa T. 1982. Methylation of mercury by humic substances in an aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 24: 133–142
- Nascimento A. M., Chartone-Souza E. 2003. Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research*, 2: 92–101
http://www.funpecrp.com.br/GMR/year2003/vol1-2/sim0005_full_text.htm (maj 2008)
- Ogorelec B., Mišič M., Faganeli J. 1991. Marine geology of the Gulf of Trieste (northern Adriatic): Sedimentological aspects. *Marine Geology*, 99: 79–92
- Ogrinc N., Faganeli J. 2006. Phosphorus regeneration and burial in near-shore marine sediments (the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67: 579–588
- Ogrinc N., Faganeli J., Pezdič J. 2003. Determination of organic carbon mineralization in near-shore marine sediments (Gulf of Trieste, northern Adriatic) using stable carbon isotopes. *Organic Geochemistry*, 34: 681–692
- 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, 1: 130–137
- Oremland R. S., Miller L. G., Dowdle P., Connel T., Barkay T. 1995. Methylmercury oxidative degradation pathway potentials in contaminated and pristine sediments of the Carson River, Nevada. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2745–2753
- Osborn M. A., Bruce K. D., Strike P., Ritchie D. A. 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiology Reviews*, 19: 239–262.

- Pak K., Bartha R. 1998. Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 6: 1987–1990
- Reyes N. S., Frischer M. E., Sobecky P. A. 1999. Characterization of mercury resistance mechanisms in marine sediment microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 273–284
- Ridley W. P., Dizikes L. J., Wood J. M. 1997. Biomethylation of toxic elements in the environment. *Science*, 197: 329–332
- Sakata M., Marumoto K. 2005. Wet and dry deposition fluxes of mercury in Japan. *Atmospheric Environment*, 39: 3139–3146
- Schuster E. 1991. The behavior of mercury in the soil with special emphasis on complexation and adsorption processes - A review of the literature. *Water, Air, & Soil Pollution*, 56: 667–680
- Skoog A., Hall P. O., Hulth S., Paxeus N., Rutgers van der Loeff M., Westerlund S. 1996. Early diagenetic production and sediment-water exchange of fluorescent dissolved organic matter in the coastal environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60, 19: 3619–3629
- Suchanek T. H., Mullen L. H., Lamphere B. A., Richerson P. J., Woodmansee C. E., Slotton D. G., Harner E. J., Wooward L. A. 1998. Redistribution of mercury from contaminated lake sediments of Clear Lake, California. *Water, Air, and Soil Pollution*, 104: 77–102
- Tenax™. 2008. TA Adsorbent Resin Physical Properties. New Jersey, Scientific Instrument Services, Inc.
<http://www.sisweb.com/index/referenc/tenaxtam.htm> (april 2008): 2 str.

Truhaut R. 1977. Eco-toxicology - objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, 2: 151-173

Tržaški zaliv. 2008. Wikipedia.

http://sl.wikipedia.org/wiki/Tr%C5%BEE%C5%A1ki_zaliv (maj 2008): 1 str.

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, 3: 241–293

US EPA. 2004. What you need to know about mercury in fish and shellfish. Washington DC, US EPA – United States Environmental Protection Agency
<http://www.epa.gov/waterscience/fish/advice/> (junij 2008): 2 str.

Višine in temperature morja v oktobru 2007. 2007. Mesečni bilten Agencije Republike Slovenije za okolje, 14, 10
http://www.arso.gov.si/o%20agenciji/knji%c5%benica/mese%c4%8dni%20bilten/bilten_2007_10.pdf : 75 str.

Yannai S., Berdicevsky I., Duek L. 1991. Transformations of inorganic mercury by *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1: 245–247

Zahir F., Rizwi S. J., Haq S. K., Khan R. H. 2005. Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20: 351–360

Zimmer C., McKinley D. 2008. New approaches to pollution prevention in the healthcare industry. *Journal of Cleaner Production*, 16: 734–742

Žibret G., Gosar M. 2006. Calculation of the mercury accumulation in the Idrijca River alluvial plain sediments. *Science of the Total Environment*, 368: 291–297

ZAHVALA

"Gratitude is merely a secret hope of further favors." (Francois de La Rochefoucauld)