

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Irena SKUK

**METILACIJA ŽIVEGA SREBRA IN DEMETILACIJA METIL ŽIVEGA
SREBRA V IZLIVU REKE SOČE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**METHYLATION OF MERCURY AND DEMETHYLATION OF
METHYLMERCURY IN THE SOČA RIVER MOUTH**

GRADUATION THESIS
University study

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno na Morski biološki postaji Nacionalnega inštituta za biologijo v Piranu.

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

Mentor: prof. dr. Jadran FAGANELI

Somentor: prof. dr. Mark E. HINES

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

Član: prof. dr. Mark E. HINES

University of Massachusetts Lowell, Department of Biological Sciences

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Irena Skuk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 502.51(282.05):546.49:579.68(043)=163.6
KG	ekologija/onesnaževanje okolja/živo srebro/mikrobne pretvorbe/metilacija Hg/demetilacija MeHg/redukcija sulfata/sediment/izliv reke Soče
AV	SKUK, Irena
SA	FAGANELI, Jadran (mentor)/HINES, Mark E. (somentor)/MANDIĆ MULEC, Ines (recenzentka)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	METILACIJA ŽIVEGA SREBRA IN DEMETILACIJA METIL ŽIVEGA SREBRA V IZLIVU REKE SOČE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII,60 str., 2 pregl., 16 sl., 82 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	<p>Idrijski rudnik živega srebra, ki je že 15 let dokončno zaprt še vedno prispeva k velikim vnosom Hg v okolje. Kontaminirana so porečja Idrijce in Soče ter Tržaški zaliv, kjer so bile izmerjene pretvorbe Hg, z namenom oceniti sposobnost sistema za pretvorbo in mobilizacijo Hg, ter produkcijo in razgradnjo MMHg. Na vzorčnem mestu I 6 v ustju Soče smo v jesenskem in zimskem obdobju študirali hitrosti metilacije Hg in demetilacije MMHg z uporabo radioaktivno označenimi ^{203}Hg in $^{14}\text{C-MMHg}$. Hitrost redukcije sulfata so bile določene z uporabo $^{35}\text{SO}_4^{2-}$. Izmerili smo tudi raztopljeni Hg in MMHg, alkalnost, raztopljeni HN_4^+, NO_3^-, PO_4^{3-}, S^{2-}, Fe in Mn v porni vodi ter C_{org}, N_{tot}, S_{tot} in TRS v trdni fazi sedimenta. V obeh temperaturnih obdobjih je bila opazna korelacija med hitrostjo demetilacije MMHg in hitrostjo redukcije sulfata z najvišjimi vrednostmi v vrhnjih plasteh sedimenta jeseni in debelejši vrhnji plasti pozimi. Vpliv višje temperature na metilacijo ni bil močno izražen. Demetilacija MMHg je prvenstveno potekala po oksidativni poti. V nadaljnjih raziskavah pretvorb Hg so bile potencialne hitrosti pomnožene z vsebnostmi Hg zvrsti v sedimentu. Ugotovljeno je bilo, da lahko Hg_{tot} v pornih vodah uporabimo kot oceno količine biodostopnega Hg. Primerjava rezultatov meritev na točki I 6 z vzorčnimi mesti v sredini Tržaškega zaliva (D6, AA1 in CZ) nam pokaže, da se hitrost metilacije z oddaljenostjo od izliva povečuje, obratno pa se manjša hitrost demetilacije in redukcije sulfata. Proti točkam v sredini zaliva se veča tudi razmerje MMHg/Hg_{tot}. Opažamo torej, da je demetilacija povezana za redukcijo sulfata. Slednja tudi vpliva na manjšo dostopnost Hg za metilacijo, ki jo v Tržaškem zalivu lahko pripišemo tudi drugim bakterijskim vrstam. Glede na visoke izmerjene količine Fe v pornih vodah so to lahko npr. reducenti železa.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 502.51(282.05):546.49:579.68(043)=163.6
CX	ecology/environment pollution/mercury/microbial transformation/Hg methylation/MeHg demethylation/sulfate reduction/sediment/ Soča river mouth
AU	IRENA, Skuk
AA	FAGANELI, Jadran (supervisor)/HINES, Mark E. (co-advisor)/MANDIĆ MULEC, Ines (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2010
TI	METHYLATION OF MERCURY AND DEMETHYLATION OF METHYLMERCURY IN THE SOČA RIVER MOUTH
DT	Graduate thesis (university studies)
NO	XII,60 p., 2 tab., 16 fig., 82 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The Idrija mercury mine has been closed for 15 years, but still delivers large quantities of Hg into the environment downstream Idrijca and Soča rivers to the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). The transformation of Hg species in sediments of the Soča river mouth was studied to determine the ability of the estuarine system to transform and mobilize Hg and to produce and degrade MMHg. In cores from site I 6, Hg methylation, MMHg demethylation and sulfate reduction activities were measured in autumn and winter using radio-techniques. (^{203}Hg , $^{14}\text{C-MMHg}$ and $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ respectively). Dissolved Hg, MMHg, alkalinity and dissolved NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , S^{2-} , Fe and Mn, and C_{org} , N_{tot} , S_{tot} and TRS were determined in pore waters and solid phase, respectively. Demethylation rates covaried with sulphate reduction rates mainly in the top surface layers in autumn, whereas the winter rates were higher in a thick surface layer. Conversely, the temperature had not a clear positive effect on Hg methylation. MMHg demethylation occurred primarily via the oxidative pathway. To further investigate the Hg transformations in sediment, the reaction rates constants were multiplied by the concentrations of Hg species measured. We can assume that pore water Hg_{tot} can be an appropriate approximation for bioavailable Hg in sediment. Comparison of estuarine site I 6 with marine sites D6, AA1 and CZ in the Gulf of Trieste shows that methylation rates increase from estuarine towards gulf sites while demethylation and sulphate reduction exhibit an opposite trend. The MMHg/ Hg_{tot} ratio also increases towards the center of the gulf. It seems therefore, while the demethylation seems to be linked to sulphate reduction which causes the low availability of Hg for methylation, that in addition to sulphate reducing bacteria methylation can be also conducted by other bacterial groups, perhaps Fe reducers. This is suggested by higher pore water Fe concentrations observed at I 6.

KAZALO

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Slovarček	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA	2
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KEMIJSKE LASTNOSTI ŽIVEGA SREBRA	2
2.2 BIOGEOKEMIČNO KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA	3
2.2.1 Hg v atmosferi	4
2.2.2 Hg v vodnjem okolju	4
2.2.2.1 Vpliv okoljskih faktorjev na porazdelitev Hg	6
2.3 STRUPENOST ŽIVEGA SREBRA	7
2.3.1 Organizmi in njihova izpostavljenost Hg	7
2.4. Hg RESISTENCA PRI PROKARIOTIH	10
2.4.1 Operon <i>mer</i>	10
2.5 PRETVORBE Hg V VODNJEM OKOLJU	14
2.5.1 Metilacija	14
2.5.1.1 Abiotska metilacija	15
2.5.2 Demetilacija	16
2.5.2.1 Abiotska demetilacija	17
2.5.3 Abiotska redukcija	17
2.5.4 Oksidacija Hg	18

2.6	MIKROORGANIZMI IN PRETVORBE Hg	18
2.6.1	Dejavniki ki vplivajo na mikrobne procese	18
2.6.1.1	Vpliv temperature	19
2.6.1.2	Vpliv pH	20
2.6.1.3	Vpliv organske snovi	20
2.6.1.4	Redoks razmere	20
2.6.1.5	Sulfid	21
2.6.1.6	Slanost	21
2.7	Hg V IDRIJCI, SOČI IN TRŽAŠKEM ZALIVU	22
2.7.1	Hg v organizmih	23
3	MATERIALI IN METODE	24
3.1	ORIS PODROČJA RAZISKAVE	24
3.2	VZORČENJE IN OBDELAVA SEDIMENTA	27
3.3	MERJENJE HITROSTI MIKROBNIH PRETVORB	28
3.3.1	Metilacija živega srebra	28
3.3.2	Demetilacija metil živega srebra	28
3.3.3	Redukcija sulfata	29
3.4	ANALIZE PORNİH VOD	30
3.5	ANALIZE TRDNE FAZE	30
4	REZULTATI	31
4.1	HITROSTI PRETVORB ŽIVEGA SREBRA	31
4.1.1	Hitrost metilacije	31
4.1.2	Hitrost demetilacije	33
4.2	HITROST REDUKCIJE SULFATA	35
4.3	ANALIZE PORNİH VOD	36
5	RAZPRAVA	39
5.1	MIKROBNI PROCESI Hg V USTJU SOČE	39
5.2	MIKROBNE PRETVORBE Hg	40
6	SKLEPI	44

7	POVZETEK	45
7.1	SUMMARY	47
8	VIRI	49
	ZAHVALA	60

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Temperatura, slanost in celotna suspendirana snov (TSM) v vodnem stolpu na mestu vzorčenja I 6 v estuariju Soče, novembra 2006 in marca 2007.	25
Pregl. 2: Koncentracije celotnega živega srebra ($Hg_{tot.}$) in celotnega metilnega živega srebra ($MeHg_{tot.}$) v vodnem stolpu na mestu vzorčenja I 6 v estuariju Soče, novembra 2006 in marca 2007.	25

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Globalno kroženje živega srebra. (Barkay, 2003: 357).	3
Sl. 2: Primer operona <i>mer</i> pri G- <i>Shigella flexneri</i> (Tn21) in G+ <i>Staphylococcus aureus</i> (pl258) bakterijah (Nascimento in Chartone-Souza, 2003).	10
Sl. 3: Model za G- značilnega operona <i>mer</i> (Barkay in sod., 2003: 360).	12
Sl. 4: Izliv Soče v Tržaški zaliv z označenima mestoma vzorčenja I 6 v estuariju ter točkami D6, AA1 in CZ v zalivu.	26
Sl. 5: Globinski profil hitrosti metilacije Hg v vzorcih sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče.	32
Sl. 6: Globinski profil hitrosti demetilacije MeHg v vzorcih sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče.	34
Sl. 7: Globinski profil hitrosti redukcije sulfata v vzorcih sedimenta vzorčenega v estuariju Soče, novembra 2006 in marca 2007.	35
Sl. 8: Globinski profil alkalnosti, vsebnosti PO_4^{3-} , NH_4^+ in $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ v porni vodi sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče.	36
Sl. 9: Globinski profil Hg_{tot} in MeHg (Horvat, 2007), ter Fe^{2+} in Mn v porni vodi sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče.	37
Sl. 10: Globinski profil C_{org} , N_{tot} , razmerje C/N ter profil S v trdni fazi sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče.	38
Sl. 11: Globinski profil celotnega reduciranega žvepla (TRS) v trdni fazi sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče.	38
Sl. 12: Hitrosti metilacije ($\%$ dan $^{-1}$) v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod. 2006).	42
Sl. 13: Hitrost redukcije sulfata (mmol ml^{-1} dan $^{-1}$) v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod. 2006).	42
Sl. 14: Hitrost demetilacije ($\%$ dan $^{-1}$) v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod. 2006).	43

Sl. 15: Razmerje med metilacijo in demetilacijo v sedimentu Tržaškega zaliva

(Hines in sod. 2006).

43

Sl. 16: Delež MeHg v Hg_{tot}. v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod. 2006).

44

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA1	vzorčevalna postaja v sredini Tržaškega zaliva
CZ	vzorčevalna postaja v jugovzhodnem delu Tržaškega zaliva
DMHg	dimetil živo srebro
DOC	dissolved organic carbon (raztopljeni organski ogljik)
DZ	vzorčevalna postaja v ustju reke Soče
HTZ	high turbidity zone (območje visoke turbidnosti)
I 6	vzorčevalna postaja v estuariju Soče
MeHg	metilirano živo srebro
MMHg	monometil živo srebro
MR	mercuric reductase (živosrebrova reduktaza)
OL	organomercurial lyase (liaza organskega živega srebra)
SRB	sulfat reducirajoče bakterije
TRS	total reduced sulfur (celotno reducirano žveplo)
TSM	total suspended matter (celotna suspendirana snov)

SLOVARČEK

- Demetilacija:** odcepljanje metilne skupine z atoma ali molekule
- Estuarij:** izlivno območje reke
- Metilacija:** vezava metilne skupine na atom ali molekulo
- Porna voda:** voda v porah sedimenta, ki se lahko glede na kemično sestavo zelo razlikuje od vodnega stolpu
- Sediment:** organski in anorganski material ki je rezultat posedanja v vodnem stolpu
- Vodni stolp:** voda nad sedimentom (od meje sediment-voda, od gladine)

1 UVOD

Raziskovalno delo je pomembno pri zagotavljanju varnosti človeka v njegovem bivalnem okolju, kjer je lahko izpostavljen mnogim nevarnostim. Ena od teh so zdravju škodljive snovi, ki se pojavljajo v okolju naravno ali pa kot posledica človekove dejavnosti. Za take snovi je potrebno izvajati nadzor prisotnosti in količine v okoljih, kjer človeku predstavljajo grožnjo. Znanost pa s svojimi raziskavami lahko pripomore k ukrepom za preprečevanje in zmanjševanje škodljivega vpliva in tudi k odstranjevanju strupenih snovi iz okolja.

Živo srebro je eden najpomembnejših globalnih onesnaževalcev. Naravno je v vodnih sistemih prisoten v zelo nizkih koncentracijah. Zaradi hlapne narave, mobilizacije ob uporabi v industriji, izkopavanju in obdelavi rude ter nalaganju metiliranih oblik vzdolž prehranjevalnih verig in spletov pa je postal velik problem, saj ima resne nevrotoksične učinke na ljudi in druga živa bitja. Eden od primerov onesnaženja velikega območja je porečje Idrije in Soče, od (danes zaprtega) rudnika živega srebra v Idriji pa do Tržaškega zaliva v katerega se reka Soča (v Italiji Isonzo) izliva. Dolgoletno rudarjenje in obdelava rude sta povzročila povečanje količine Hg v vodi ter v sedimentu in tleh ob bregovih. Posledično so kontaminirane tudi obalne in vodne živalske in rastlinske vrste. Za kopiranje Hg v živalski prehranjevalni verigi je izrednega pomena pretvorba elementnega v metilno živo srebro. Ta proces v največji meri vodijo mikroorganizmi v sedimentu, ki so odgovorni tudi za proces demetilacije. Razmerje med tem dvostrukim procesoma je pomembno za končno količino biološko dostopnega metilnega živega srebra. Aktivnost teh mikrobov in hitrosti pretvorb so odvisne od razmer v okolju. Skupina mikroorganizmov, ki ji pripisujemo procese metilacije in demetilacije so sulfat reducirajoče bakterije (SRB). Zato je metilacijska aktivnost v sedimentu pogosto povezana s hitrostjo redukcije sulfata (Choi in Bartha, 1994).

1.1 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Cilj pričujočega dela je bil razvozlati mikrobne proces metilacije Hg, demetilacije MeHg ter redukcije sulfata v sedimentu v izlivu reke Soče/Isonzo. Želeli smo pokazati povezanost vseh treh procesov. Vse procese smo spremljali v dveh različnih letnih časih, da bi ugotovili vpliv temperature na hitrost pretvorb.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KEMIJSKE LASTNOSTI ŽIVEGA SREBRA

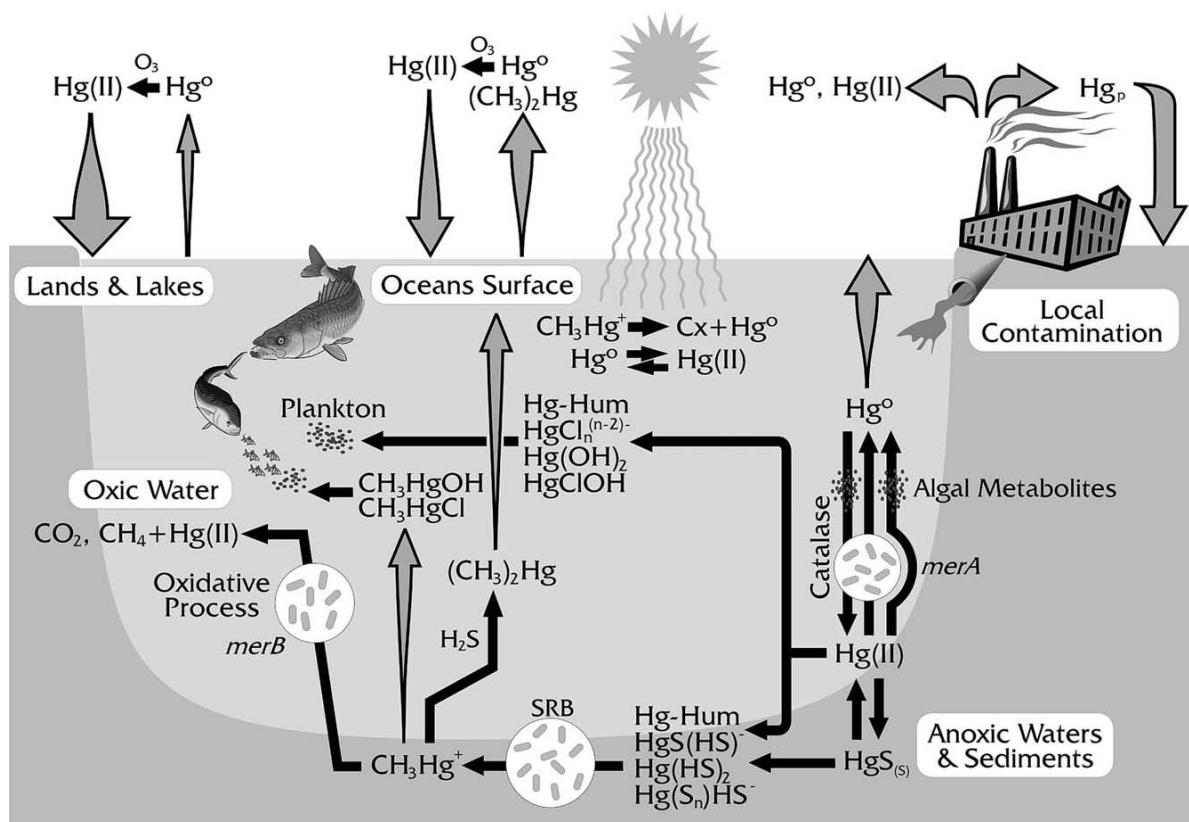
Živo srebro (Hg) je element druge stranske skupine periodnega sistema. Njegova atomska masa je 200,59 g/mol. Tališče ima pri -38,8 °C in je pri standardnih pogojih tekočina z gostoto 13,5 g/cm³. Slabo prevaja toploto, je pa dober električni prevodnik. V elementni obliki je v vodi slabo topno, vendar zelo hlapno. Ta težka kovina je srebrne barve, hlapi pa so brez barve, vonja in okusa. Najpogosteji izotopi so radioaktivni ¹⁹⁷Hg ($t_{1/2} = 2,672$ dni), ²⁰³Hg ($t_{1/2} = 46,61$ dni) ter stabilni ²⁰²Hg, ²⁰⁰Hg, ¹⁹⁹Hg, ²⁰¹Hg. Nahaja se v treh valenčnih stanjih: 0, +1 ali +2. Kot naravni element je v naravi povsod navzoč. Približno 10000 ton živega srebra v zraku izvira iz naravnega procesa razplinjevanja zemeljske skorje, k temu pa je letno dodanega približno 20000 ton kot posledica človekove dejavnosti (Hansen in Dasher, 1997).

V atmosferi živo srebro z vetrom prepotuje ogromne razdalje in se s padavinami spira v reke, jezera in oceane. V Zemeljski skorji je približno 0,08 ppm Hg, v koncentriranih nahajališčih od 0,1 do 2,5 %. Čista ruda je redka, večinoma se nahaja kot cinober (HgS). V naravi so poleg elementarnega živega srebra (Hg⁰) prisotne tudi različne anorganske (HgS, HgCl₂, ...) in

organske oblike spojin, kot so monometil živo srebro (MMHg), dimetil živo srebro (DMHg), etil živo srebro (EtHg), fenil živo srebro (PheHg).

2.2 BIOGEOKEMIČNO KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA

Kroženje živega srebra poganjajo biogene in abiogene reakcije oksidacije in redukcije ter metilacije in demetilacije. Oblike ki se pojavljajo se razlikujejo v hlapnosti, polarnosti in naboju, te razlike pa narekujejo njihovo porazdelitev med atmosfero, vodo, organizmi ter mineralnimi in organskimi delci v tleh.



Slika 1: Globalno kroženje živega srebra. (Barkay, 2003: 357). Črne puščice prikazujejo pretvorbe ali prevzem Hg, sive pa njegovo prehajanje med vodo, atmosfero in tlemi.

Fig. 1: Global biogeochemical cycling of Hg. (Barkay, 2003: 357). Black arrows represent transformations or uptake of Hg, gray arrows indicate flux of Hg between different compartments in the environment.

2.2.1 Hg v atmosferi

Atmosfera je le začasni rezervoar živega srebra. V njej se nahaja večinoma v hlapni elementni obliki. Izvor Hg^0 je tipično antropogen; iz rudnikov, industrije in z izgorevanjem fosilnih goriv. Po zraku Hg lahko prepotuje velike razdalje, kar ima za posledico močno razširjenost kontaminiranih področij na mesta ki so lahko od izvora oddaljena tudi več deset kilometrov. Pomemben proces v atmosferi je fotokemijska oksidacija Hg^0 v $Hg(II)$.

2.2.2 Hg v vodnem okolju

V vodnih sistemih je Hg naravno prisoten v zelo nizkih koncentracijah. Koncentracije pa so se od začetka industrializacije, rabe fosilnih goriv ter intenzivnega kmetijstva na določenih območjih znatno povečale. Kot ponor in tudi kot izvor Hg igra zelo pomembno vlogo sediment (Covelli in sod., 1999). Glede na kombinacijo fizikalnih, kemijskih in bioloških razmer se Hg spojine iz sedimenta lahko sprostijo v vodno fazo, lahko jih akumulirajo organizmi v vodi, lahko se izgubijo v atmosfero ali pa se kot suspendirani material prenesejo na novo lokacijo. Ko je sediment enkrat kontaminiran lahko predstavlja problem za vodna živa bitja tudi več let (Kudo, 1992).

Glavne oblike raztopljenega živega srebra so Hg^0 , $Hg(II)$ v kompleksih z različnimi organskimi in anorganskimi ligandi, ter organske oblike med katerimi prevladujeta MMHg in DMHg. Hg^0 v površinski vodi nastaja v glavnem z redukcijo $Hg(II)$ spojin. Biotsko redukcijo posredujejo vodni organizmi, abiotično pa huminske spojine (Allard in Arsenie, 1991). Hg^0 nastaja tudi z razgradnjo organskih Hg spojin (Mason in Fitzgerald, 1993). Najnovejše študije pa so kot pomemben mehanizem nastanka Hg^0 pokazale fotoredukcijo $Hg(II)$ v povezavi s huminskim materialom. Elementno živo srebro je pod zmernimi reduksijskimi ali oksidacijskimi pogoji stabilno, predvsem v prisotnosti kloridnih ionov pa se rado oksidira v $Hg(II)$. Zaradi relativno visoke hlapnosti se veliko Hg^0 iz vode, ki je z njim predvsem v

poletnem času nasičena v primerjavi z atmosfero, izgublja. Ta prehod predstavlja enega pomembnejših tokov globalnega kroženja Hg. V vodni raztopini obstaja tudi Hg(I) vendar le kot dimer (Hg_2^{2+}). Le-ta hitro disproporcionira v Hg^0 in Hg^{2+} , najstabilnejšo obliko v vodi. Do pred kratkim je veljalo splošno mnenje, da je Hg^{2+} glavni substrat za mikrobno metilacijo. Nove raziskave pa so pokazale, da bakterije mnogo verjetneje porabljam nenebitne komplekse Hg sulfidov (Benoit in sod., 2001). Kemijska oblika Hg v vodi je močno odvisna od elektrokemijskega potenciala (E_h) in pH, kot tudi koncentracij organskih in anorganskih komponent. Hg^{2+} in CH_3Hg^+ rada tvorita komplekse z žveplom in podobnimi ligandi. V odsotnosti žvepla se v sladki vodi oblikujejo predvsem nenebitni kompleksi $Hg(OH)_2$, $HgOHCl$ in $HgCl_2$, najstabilnejša metilna oblika pa je CH_3HgOH . V morski vodi je metil živo srebro večinoma prisotno kot klorid (CH_3HgCl), Hg^+ pa v glavnem tvori $HgCl_4^{2-}$ in $HgCl_3^-$ ione. Največ je kompleksov Hg z organskimi snovmi (manj v morski vodi, zaradi kompeticije s kloridnimi ioni). Posebej močne asociacije Hg tvori s tiolnimi (-RSH) skupinami huminskih snovi. Raztopljeno frakcijo Hg v sladkih, brakičnih in morskih vodah torej predstavlja predvsem organski koloidi (Ullrich in sod., 2001).

V anoksičnih pogojih je Hg večinoma povezano z žveplom. Najpomembnejša netopna oblika anorganskega Hg je HgS , pogost je tudi zmerno topen HgO . Sulfid in oksid sta bila tudi glavni oblici Hg v sedimentu zaliva Minamata (Fujiki in Tajima, 1992). V nasprotju s prvotnim mnenjem so Benoit in sod. (1999) predlagali, da je tudi HgS v anaerobnih razmerah dostopen za bakterijsko metilacijo in da so mehanizmi sulfidne inhibicije v metilaciji Hg kompleksnejši, kot so menili, ko so si z njo razlagali splošno nižje koncentracije MMHg v sulfidnih sedimentih.

Organske oblike Hg prisotne v vodi so bile v preteklosti posledica človekove aktivnosti, saj se je te spojine veliko uporabljalo npr. kot fungicide ali katalizatorje v industriji. V zadnjem času je uporaba večine teh snovi prepovedana in je glavni vir metiliranih Hg spojin transformacija anorganskega Hg. Edini naravni oblici organskega Hg v vodah sta MMHg in DMHg (slednjega je v sladkih in brakičnih vodah precej manj). Obe oblici lahko nastaneta iz $Hg(II)$ z

različnimi mehanizmi. MMHg je izredno stabilen, vendar ga uspešno razgrajujejo mikrobi, lahko pa se razgradi tudi fotokemično. Druge organske Hg spojine v okolju hitro razпадajo pri čemer nastanejo tipični organski produkti, kot je npr. etan, ter anorganska Hg^0 in Hg^{2+} (Craig, 1986). Kot difenil Hg je tudi DMHg hlapen in polaren, zato se hitro izgubi iz vodnega sistema z evaporacijo in ga vodni organizmi ne akumulirajo (Morel in sod., 1998). Po drugi strani pa je v globokomorskih vodah DMHg prevladujoča organska oblika Hg. V površinskih oceanskih vodah ne najdemo skoraj nič metiliranega Hg. Predvideni mehanizmi izgubljanja DMHg so demetilacija, evaporacija ter fotodegradacija, MMHg pa se izloča z vezavo na delce (Mason in Fitzgerald, 1993).

Transport Hg v vodi je večinoma pogojen s potovanjem suspendiranega materiala, saj imajo tako organske kot anorganske oblike visoko težnjo po vezavi na površine. Anorganski Hg se raje veže na mineralne delce in detrit, MMHg pa je močneje povezan z biogenimi delci (bakterije, alge, fitoplankton). Tako je posedanje suspendirane snovi glavni način vnosa Hg na mejo sediment/voda ter v hipoksično plast vode v oceanih, kjer so glavna mesta metilacije. Difuzija iz porne vode navzgor igra manj pomembno vlogo (Hurley in sod., 1991).

Pomembna območja nastajanja MMHg so tudi mokrišča in šotišča. V sladkovodne sisteme se MMHg nabira zaradi erozije in izpiranja kopnega, kar je predvsem značilno za deževna obdobja v tropskih predelih. V sušnih predelih pa se nivo Hg v sedimentu dvigne zaradi spiranja tal z dežjem, ki sledi gozdnim požarom, kar obenem zagotovi tudi vir ogljika za procese mikrobne metilacije (Caldwell in sod., 2000).

2.2.2.1 Vpliv okoljskih faktorjev na porazdelitev Hg

Na kroženje in razporeditev Hg med sedimentom in vodno fazo vplivajo pH, temperatura, redoks stanje in dostopnost nutrientov in delcev, ki tvorijo komplekse (Kudo in sod., 1975). V splošnem so v oksičnih razmerah Hg in MMHg vežeta v sediment. Sproščanje MMHg iz sedimenta pa se povečuje z zvišanjem temperature in dodajanjem nutrientov ter ob znižanju

pH. Nastajanje topnih huminskih kompleksov tudi lahko močno poveča topnost in mobilnost Hg v vodnih sistemih. Povišana koncentracija Cl⁻, torej povišana slanost, vodi zaradi kompeticije za vezavna mesta na suspendiranem materialu in organskih koloidih do zmanjšanja količine vezanega Hg (Ullrich in sod., 2001).

2.3 STRUPENOST ŽIVEGA SREBRA

Zavedanje in zanimanje za strupenost živega srebra se je tudi v širši javnosti okrepilo po incidentu v kraju Minamata na Japonskem, v šestdesetih letih prejšnjega stoletja, ko so se zaradi uživanja z MMHg kontaminiranih rib pokazale posledice zastrupitve pri prebivalcih te ribiške vasi. Izvor Hg je bila v tem primeru kemijska industrija, razlog za zastrupitev pa skoraj izključno ribja prehrana tamkajšnjih ljudi in živali.

Sladkovodni organizmi akumulirajo zaznavne količine Hg tudi v naravnih nekontaminiranih območjih. V tkivu rib iz takih lokacij so izmerili koncentracijo Hg okrog 0,2 µg g⁻¹. Craig (1986) je izmeril koncentracije Hg v ribah in školjkah iz neonesnaženih morskih okolij. Koncentracije so se gibale od 0,01 do 1,5 µg Hg g⁻¹ za ribe ter od 0,2 do 1 µg Hg g⁻¹ za školjke. V močno onesnaženem zalivu Minamata so koncentracije dosegle 15 µg Hg g⁻¹ (mokre teže) rib ter do 178 µg Hg g⁻¹ (suhe teže) školjk (Fujiki in Tajima, 1992). Človek je živemu srebru najbolj izpostavljen ravno preko uživanja kontaminiranih rib in morskih sadežev. Zaradi tega je vzpostavljenih več kakovostnih kriterijev pri različnih nadzornih organih v svetu: Environment Agency (EEC) dovoljuje 0,3 µg Hg g⁻¹, WHO 0,5 µg Hg g⁻¹ ter FDA 1 µg Hg g⁻¹ (mokre teže) rib.

2.3.1 Organizmi in njihova izpostavljenost Hg

Zastrupitev z živim srebrom povzroča nevrološke simptome, ki vključujejo ataksijo, odrevenelost dlani in stopal, splošno mišično oslabelost, zoženje vidnega polja ter okvaro

sluha in govora. V ekstremnih primerih pride do duševnih motenj, paralize, kome in smrti. Poleg raziskav v zvezi z akutno izpostavljenostjo živemu srebru so se začeli pojavljati podatki o kroničnih zastrupitvah v različnih koncih sveta zaradi izpostavljenosti vodi, zraku, hrani, farmacevtskim in kozmetičnim produktom. Med tremi oblikami živega srebra je najbolj toksična organska oblika MMHg, saj zaradi topnosti v lipidih, prehaja prek bariere med krvjo in možganskim tkivom.

V vodah se iz oddaljenih virov kopiči hlapen Hg, kjer je mikrobi pretvorjen v lipofilno organsko spojino MMHg. Ta oblika se mnogo bolj kopiči v prehranjevalni verigi (biomagnifikacija) in človeške populacije, katere prehrana je tradicionalno povezana z velikimi količinami svežih morskih rib, rakov in glavonožcev so dokazano bolj izpostavljeni Hg (Hansen in Dasher, 1997).

Tudi govedo in prašiči v okolju, kjer je voda kontaminirana z Hg, so v primerjavi s kontrolnimi živalmi v krvi in dlaki pokazali dvakratno koncentracijo Hg (Zahir in sod., 2005) V Kitajski provinci Guizou, kjer po oceni antropogeni izpust Hg v atmosfero predstavlja kar 12% celotne svetovne emisije, so tudi opazili pretvarjanje anorganskega Hg v MMHg v vodi, sedimentu in tleh. Našli so visok delež MMHg (145 µg/kg od 569 µg/kg celotnega Hg) v zrnih riža (Horvat in sod., 2003), medtem ko so Lanka in sod. (1992) ugotovili izjemno velike količine (8,9 mg/kg) akumuliranega Hg pri vodnih in kopenskih rastlinah v bližini industrije. Do zastrupitev in pojavov bolezni pri otrocih je prišlo zaradi vsebnosti Hg v konzervansih cepiv (Westphal in Hallier, 2003), izpostavljenosti PheHg v plenicah in zaužitju HgCl₂ s praški, ki jih dajejo otrokom v času rasti zob (Kazantzis, 2002). V deželah v razvoju (Indija, Kenija, Tanzanija) so izvori kronične zastrupitve z Hg tudi kreme in mila za posvetlitev kože (Harada in sod., 1999; 2001).

Vpliv strupenega Hg na živali so opazili v mnogih primerih. Pri domačih živalih se znaki zastrupitve s Hg kažejo kot izguba apetita in telesne teže, mišična nekoordiniranost, nestabilna hoja ali ohromelost. Morske ptice iz kontaminiranih področij dobijo izrazite lezije na ledvicah

(Nicholson in sod., 1983). Anorganske vrste Hg motijo del respiratornega procesa pri larvah morskih rakcev (St-Amand in sod., 1999). Teratogen učinek in embriotoksičnost Hg so opazili pri ribah, pticah in tudi sesalcih (Leonard in Jacquet, 1983).

Nizke koncentracije Hg vplivajo na živčni sistem zarodkov in otrok. Delovanje nevrotoksinov v obdobju razvoja centralnega živčnega sistema se kaže kot hitrejše in zgodnejše pojavljanje starostnih motenj (Rice in Barone, 2000). Matere, ki so med nosečnostjo uživale z MMHg kontaminirane ribe (na Japonskem) ali kruh (v Iraku), so rodile psihomotorično zaostale otroke. Grandjean in Weihe (1998) poročata o zmanjšani sposobnosti na področju govora, motorike in spomina pri otrocih, izpostavljenih koncentracijam Hg, ki so v materinih laseh razmeroma nizke, saj so dosegle 10-20 µg/g in so domnevno varne. Posledice prenatalne izpostavljenosti organskemu Hg so dokazali z nevro patološkimi preiskavami otroških možganov in so predstavljale displazije možganskega korteksa in številne druge razvojne motnje (Geelen in Dormans, 1990). Pri odraslih osebah dolgotrajnejša izpostavljenost nizkim koncentracijam Hg, kot tudi nekaterim drugim težkim kovinam, vodi do Parkinsonove in Alzheimerjeve bolezni (Olivieri in sod., 2002).

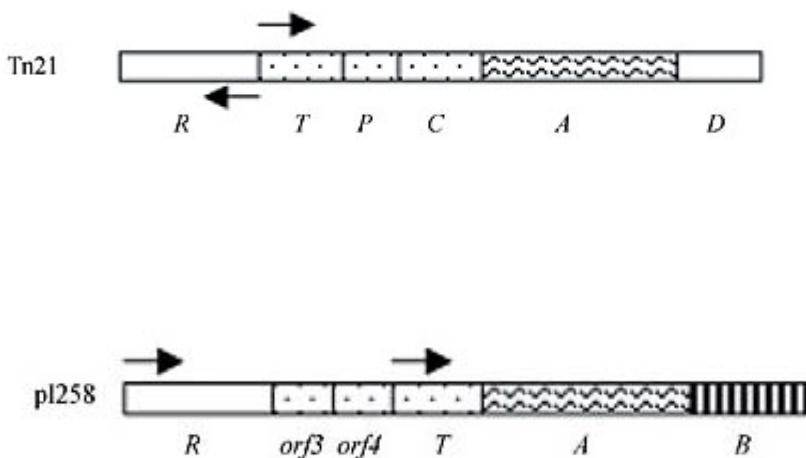
Hg se veže na sulfhidrilne skupine in disulfidne skupine proteinov. Taka blokada žvepla inaktivira encime, kofaktorje in hormone (Markovich in James, 1999) ter spremeni propustnost celičnih membran (Bapu in sod., 1994). Raznovrstne študije dolgotrajne izpostavljenosti nizkim koncentracijam Hg v primerih delavcev v klorakalni industriji, ljudi na obalah Širanjskega morja deset let po odstranitvi vira MMHg v zalivu Minamata in tudi drugod po svetu, so pokazale različne motorične motnje (nekoordiniranost, mišična ohromelost), motnje vida in sluha pa tudi zmanjšane sposobnosti govora, pomnjenja in druge nevropsihološke motnje. Poleg možganov in jeter visoke količine Hg akumulirajo tudi ledvice. Izpostavljenost nizkim dozam Hg vpliva tudi na reproduktivnost, imunski in kardiovaskularni sistem ter na sam genom (Zahir, 2005).

2.4. Hg RESISTENCA PRI PROKARIOTIH

Redukcija anorganskega Hg je bila odkrita pri Hg odpornih bakterijah, kot fenotip, vezan na odpornost proti antibiotikom na plazmidih, med organizmi iz bolnišničnega okolja (Novick in Roth, 1968). Rezistentni sevi so odstranili Hg(II) iz gojišča in producirali Hg^0 , ki se iz gojišča izgubi, kar je omogočilo celično rast. V aktivnih celičnih frakcijah so kasneje identificirali encim živosrebrovo reduktazo (MR = mercuric reductase). Encim je odvisen od FAD in za aktivnost potrebuje NADPH ter sulfhidrilne spojine (Furakawa in Tonomura, 1972). Poleg reduktaze encim organomerkurialna ligaza (OL = organomercurial lyase) transformira metilirane oblike živega srebra na organski del in Hg(II), ki je tako pripravljen za redukcijo v elementno obliko.

2.4.1 Operon *mer*

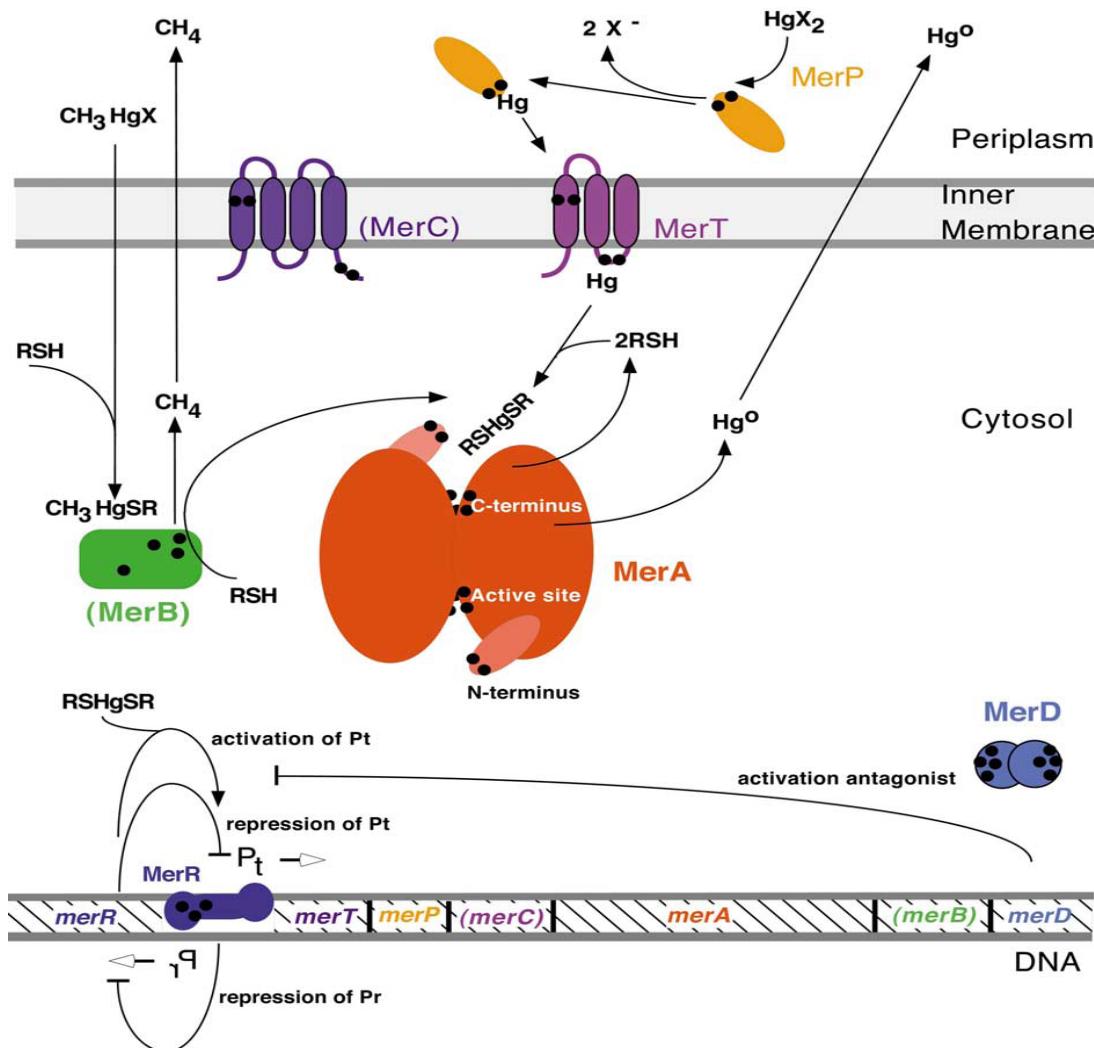
Operon *mer* je tesno reguliran genetski sistem sestavljen iz štirih do petih strukturnih genov za transport (*merP*, *merT*, *merC*, *merF*) in transformacije Hg (*merA*, *merB*) ter regulatornih genov (*merR*, *merD*).



Slika 2: Primer operona *mer* pri G- *Shigella flexneri* (Tn21) in G+ *Staphylococcus aureus* (pl258) bakterijah (Nascimento in Chartone-Souza, 2003).

Fig. 2: Example of *mer* operon in G- *Shigella flexneri* (Tn21) in G+ *Staphylococcus aureus* (pl258) bacteria (Nascimento in Chartone-Souza, 2003).

Prek zunanje membrane živo srebro prehaja z difuzijo. Transport Hg(II) v celico pa zahteva energijo. Prvi protein ki posreduje prenos Hg(II) v celico je produkt gena *merP*. To je protein v periplazmi, sestavljen iz 72 amino kislin, ki veže Hg(II) prek dveh cisteinskih ostankov (Cys). Po vezavi MerP interagira s proteinom na notranji membrani MerT. To je 116-aminokislinski polipeptid s tremi transmembranskimi heliksi in dvema Cys paroma. Bližnji par na prvem heliku prevzame Hg(II) od MerP in reagira z drugim Cys parom lociranem na prvi citoplazmatski zanki, za prenos Hg(II) prek notranje membrane (Brown in sod., 2002). Tu je Hg(II) dostopen za MR bodisi neposredno prek N-terminalnega Cys para na encimu, bodisi prek nizkomolekularnih sulfhidrilnih snovi, ki so prisotne v citoplazmi. Transport Hg(II) v celico je torej prenos prek Cys parov. V transport Hg(II) prek membrane so ponekod vključeni še proteini MerC in MerF, zapis za katere v nekaterih operonih navadno najdemo med *merP* in *merA*. Ta dva proteina sta kritična pri odpornosti proti Hg v odsotnosti MerT saj oba povečata vezavnost Hg(II) na izolirane membranske vezikle (Sahlman in sod., 1997).

Slika 3: Model za G- značilnega operona *mer*. (Barkay in sod., 2003: 360).Fig. 3: Model of G- significant *mer* operon (Barkay et al., 2003: 360).

Glavno vlogo pri rezistenci igra MR, ki je produkt gena *merA*. Encim deluje kot dimer, vsaka od podenot pa je sestavljena iz treh domen. Aktivno mesto tvori interakcija med centralno domeno ene in C-terminalnim delom druge domene (Schiering in sod., 1991). Kataliza vključuje prenos dveh elektronov iz NADPH prek FAD na Hg(II). Pomembno vlogo pri tem prenosu naboja igra redoks aktiven Cys par (na sliki označeni s črnimi pikami).

Odpornost na organske živosrebrove spojine pa je odvisna od OL, ki je produkt gena *merB*. Encim katalizira protonolizo vezi C-Hg v različnih alkilnih in arilnih živosrebrovih spojinah

pri čemer nastanejo reducirane organske skupine (npr. CH₄ v primeru MMHg) in Hg(II), ki je v naslednji stopnji reduciran s strani MR. V nekaterih operonih je prisoten gen *merG*, ki kodira periplazmatski protein, ki najverjetneje zmanjšuje propustnost celice za organske živosrebrove spojine. To sta Kiyono in Pan-Hou (1999) ugotovila na primeru herbicida PheHg. Večina študij rezistence je opravljenih ravno z uporabo fenil živega srebra kot modelno snovjo, ki pa jih zato ne moremo z gotovostjo povezati tudi z razgradnjo MMHg. Operon je reguliran s koncentracijo Hg ter regulatorjema MerR in MerD. V odsotnosti Hg je operon represiran. Že zelo nizke koncentracije Hg(II) pa aktivirajo promotor do skoraj 100% aktivnosti. MerR je glavni regulator sistema, ki zavira lastno transkripcijo in regulira (pozitivno in negativno) transkripcijo strukturnih genov operona. Kot dimer se veže na operator/promotor (O/P) regijo in povzroči, da RNK polimeraza v odsotnosti Hg(II) ne more prepisovati genov. Ob prisotnosti Hg ionov se le-ti vežejo na C konec MerR, kar povzroči konformacijsko spremembo proteina, ki se prenese na operatorsko DNA. Transkripcijski kompleks se odpre in ekspresija je tako omogočena. MerD pa je oddaljen regulator, ki ob znižani koncentraciji Hg(II) odstrani kompleks MerR-Hg iz O/P regije, pospeši nastajanje novih MerR, ki nato z vezavo ponovno onemogočijo izražanje *mer* (Champier in sod., 2004). Znanih je na stotine bakterijskih sevov odpornih proti Hg ter opisanih *mer* operonov. Operoni ozkega spektra opisujejo odpornost proti ter redukcijo Hg(II), medtem ko široko spektrovni operoni, ki nosijo *merB*, zapisujejo odpornost proti in redukcijo tako Hg(II), kot organskih Hg spojin. Operon je mobilna DNK enota podvržena intra- in intergenomskim spremembam (Barkay in sod., 2003).

Na Hg odporni mikroorganizmi, s transformacijo Hg(II) v hlapni Hg⁰, pomembno vplivajo na globalno biogeokemično kroženje Hg in imajo potencialno pomembno vlogo pri bioremediaciji kontaminiranih okolij. V uporabi so biofilmci enega ali več sevov Hg rezistentnih bakterij v bioreaktorjih na iztokih odpadnih vod v kloralkalnih elektrolitskih tovarnah. Konstruirane so tudi transgene rastline z *mer* geni, ki odstranjujejo Hg iz kontaminirane prsti (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

Za potrebe določanja količin biološko dostopnega Hg in preučevanje vpliva okoljskih faktorjev na biološko dostopnost Hg ter razumevanja interakcij mikroorganizmov z živosrebrovimi spojinami raziskujejo in razvijajo tehnologijo biosenzorjev. Senzorski element običajno predstavlja MerR, reporterski geni pa so npr. gen za bakterijsko luminiscenco (*lux*), encim β-galaktozidazo (*lacZ*), zelen fluorescentni protein (GFP), ali luciferazo kresničke, ki so klonirani na mesto strukturnih genov na *mer* operonu, navzdol od O/P regije (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

V Idrijeti, Soči in Tržaškem zalivu so ugotovili prisotnost gena *merA* v izolirani DNK iz filtrata mikrobine biomase, na vseh vzorčnih mestih od rudnika navzdol, ne pa tudi nad rudnikom. V vzorcu odvzetem ob rudniku je bil prisoten tudi *merB* (Hines in sod., 2000).

2.5 PRETVORBE Hg V VODNEM OKOLJU

Metilacija anorganskega Hg je ključni korak v kroženju Hg v vodnih sistemih. Poleg tega procesa poteka tudi demetilacija, zato koncentracije MMHg prikazujejo neto hitrost metilacije in ne dejanske hitrosti sinteze MMHg. Obstaja ravnotežno stanje med nastanjem in razgradnjijo MMHg, ki ima v sedimentih zatorej neko konstantno koncentracijo, ki le redko preseže 1 do 1.5% koncentracije celotnega Hg (Benoit in sod., 1998). Metilacija v glavnem poteka v sedimentu. Manjša je metilacija v vodnem stolpu, vendar je zaradi mnogo večjega volumna vode v primerjavi s površino sedimenta ne smemo zanemariti. V tropih so pomembna področja metilacije Hg tudi koreninski sistemi lebdečih vodnih makrofitov.

2.5.1 Metilacija

Metilacija Hg poteka tako bakterijsko kot abiotično, pogoj pa je prisotnost ustreznih donorjev metilne skupine. MMHg lahko nastane iz ionskega Hg, mnogih dvovalentnih Hg spojin kot

tudi organskih Hg spojin in kovinskega Hg. DMHg pa lahko nastane iz metilnega ali ionskega Hg. Primarni produkt reakcije med metilkobalaminom in Hg^{2+} je MMHg, ki se nadalje transformira v DMHg. Pri nizkem pH prevladuje MMHg, dimetilni Hg je termodinamsko nestabilen in tvori MMHg. DMHg prevladuje v nevtralnem in alkalnem okolju, to je v morju in estuarijih. Biometilacija anorganskega Hg lahko poteka encimsko, kar zahteva metabolno aktivne organizme. Sami metilirani produkti aktivnega metabolizma pa zadostujejo za neencimsko metilacijo. V vodnem okolju obstaja več potencialnih donorjev metilne skupine. Vendar je metilkobalamin (derivat vitamina B₁₂) edini naravni metilirajoči dejavnik, ki je sposoben prenesti metilno skupino kot karbanion (CH_3^-) (Ridley in sod., 1977).

Metilkobalamin je pogost v anaerobnih sistemih in v živih organizmih in je sposoben v vodnem okolju spontano metilirati Hg^{2+} . Mikrobnna metilacija poteka znotraj bakterijske celice s prenosom metilne skupine metilkobalamina na dvovalentni Hg, kar sta na primeru seva LS *Desulfovibrio desulfuricans* pokazala Choi in Bartha (1993). Proces metilacije pa v nasprotju z mikrobnno redukcijo Hg ni detoksifikacijski mehanizem, pač pa naj bi bil zgolj naključen proces. Pomembno vlogo igra proces celičnega prevzema Hg iz okolja. Organizme, ki so sposobni metilirati Hg, najdemo med obligativnimi in fakultativnimi anaerobi kot tudi med aerobi. V splošnem pa velja mnenje, da metilacija v večji meri poteka pod anaerobnimi pogoji ter da so sulfat reducirajoče bakterije glavni metilatorji Hg v anaerobnih sedimentih (Compeau in Bartha, 1985). Učinkovitost mikrobnne metilacije Hg je odvisna od mikrobnne aktivnosti in biološke dostopnosti Hg. Ta dva faktorja pa sta pogojena s fizikalnimi in kemijskimi parametri (temperatura, pH, redoks potencial, organske in anorganske spojine) in njihovim kompleksnim sinergističnim ali antagonističnim vplivom.

2.5.1.1 Abiotska metilacija

V prisotnosti ustreznih metilirajočih reagentov je mogoča popolnoma kemijska metilacija Hg. Spojine, ki reagirajo z Hg so npr. vodotopni metilsilikon, organosilosani in sorodne organosilicijeve spojine. Možno je tudi fotokemijsko inducirano alkiliranje Hg z metanolom,

etanolom, ocetno in propionsko kislino. Viri za tovrstno metilacijo so industrijske in mestne odpadne vode. MMHg je lahko tudi produkt transmetilacije med Hg in svinčevimi in kositrovimi alkili, ki so bili kot aditivi prisotni v bencinu. Učinkovite so tudi organske Pb, Sn in As spojine. Pomembna metilirajoča snov v okolju so tudi huminske spojine, vendar so nastanek MMHg opazili le pri temperaturah višjih, kot so v naravi ter pri znižanem pH (Ullrich in sod., 2001).

2.5.2 Demetilacija

Razpad DMHg je v glavnem abiotski. MMHg razgrajujejo mnoge bakterijske vrste. Med njimi najdemo anaerobe, ki so odgovorni tudi za metilacijo, čeprav večinoma ta proces poteka pod aerobnimi pogoji (visok E_h). Mikrobnna demetilacija poteka tako v sedimentu kot v vodnem stolpu in je karakterizirana kot samo-očiščevalen proces. Bakterijska demetilacija Hg je v glavnem redukcijski proces, ki ga izvajajo mikroorganizmi odporni proti Hg. Zapis za odpornost nosijo na *mer* operonu. Mehanizem vključuje cepitev vezi med C in Hg z encimom OL, pri čemer nastaneta CH_4 ter Hg^{2+} , ki ga Hg reduktaza reducira v Hg^0 . Gena *merA* in *merB*, na katerih sta zapisa za ta dva encima, vsebujejo bakterije s širokim spektrom odpornosti proti Hg. Novejša odkritja pa kažejo na to, da *mer* detoksifikacija ni edini način demetilacije MeHg.

Aerobno v sedimentih sladkih vod, anaerobno pa v sedimentih sladkih vod in estuariev pa pri demetilaciji nastaja predvsem CO_2 , kar kaže na oksidativno pot razgradnje MMHg. V oksidativno demetilacijo so vključeni sulfatni reducenti, metanogeni in verjetno tudi drugi anaerobi. Ali se Hg^{2+} , ki nastane, reducira kot pri reduktivni poti ni znano. Možno je da se remetilira, se veže na žveplove spojine ali izhlapi kot DMHg (Baldi in sod., 1993). Trenutno tudi ni znano, katera od omenjenih poti (organomerkurialna liaza, ali oksidativna demetilacija s SRB ali metanogeni) prevladuje v določenih pogojih okolja. Prisotnost teh poti ima velik pomen za kroženje Hg v naravi in v končni fazì lahko določa njegov zadrževalni čas v sedimentu.

Sposobnost bakterij da razgrajujejo MMHg je mogoče uporabiti pri čiščenju odplak. Na področju remediacije kontaminiranih vodnih ekosistemov poskušajo stimulirati bakterijsko pretvorbo MMHg v manj škodljivo elementno živo srebro. V zadnjem času so bile narejene transgene rastline, ki izražajo bakterijske *mer* gene in so zelo odporne proti organskemu Hg. V prihodnosti bi jih lahko uporabili za razgrajevanje MMHg v onesnaženih področjih, kjer bi akumulirale Hg za kasnejšo varno odstranitev.

2.5.2.1 Abiotska demetilacija

Edini pomemben način abiotskega razpada metiliranega živega srebra je fotoliza. V atmosferi DMHg fotolitično razpade na Hg^0 in ogljikovodike (Craig, 1986). PheHg in S vezane oblike MMHg fotolitično hitro razpadajo, vendar je foto razpad CH_3Hg^+ in CH_3HgOH zaradi nizke stopnje absorpcije sončne svetlobe zanemarljiv. Je pa Suda s sod. (1993) dokazal, da MMHg in EtHg razpadeta v morski vodi s singlet kisikom, ki poleg hidroksilnega radikala nastane v vodi pod vplivom svetlobe valovne dolžine 280 do 800 nm. Tudi Sellers in sod. (1996) poudarjajo pomembnost fotolitičnega razpada MMHg v površinskih vodah kot dela vodnega kroženja Hg.

2.5.3 Abiotska redukcija

$Hg^{(II)}$ se lahko reducira fotokemijsko ali v temni reakciji. Fotoredukcijo v glavnem povzročijo organski prosti radikali, ki s fotolizo nastanejo iz DOC, raztopljenega kisika in organskih ogljikovih kompleksov ter $Fe^{(III)}$ organskih kislin. V temi $Hg^{(II)}$ reducirajo s fulvinskimi in huminskimi kislinami vezani prosti radikali. Celo šibki reducenti, ki jih zasledimo tudi v destilirani vodi lahko disproporcionirajo $Hg^{(I)}$ ion v Hg^0 in $Hg^{(II)}$ (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

2.5.4 Oksidacija Hg

Oksidacija Hg^0 v Hg(II) poteka v atmosferi, vodah in prsti. Mehanizmov oksidacije vodi in prsti ne poznamo dobro, vemo pa da so lahko kritični za nastajanje MMHg (Barkay in Wagner-Döbler, 2005).

2.6 MIKROORGANIZMI IN PRETVORBE Hg

Živosrebrove spojine so za vse organizme toksične. Mnoge bakterije pa so razvile mehanizme odpornosti. Opazna je korelacija med razporeditvijo Hg v sedimentu ter prisotnostjo odpornih mikroorganizmov. Bakterijska odpornost je inducibilna in je regulirana z *mer* operonom.

Veliko število mikroorganizmov metilira Hg *in vitro*, v naravnih vodnih sistemih pa tega procesa ne moremo pripisati tako raznolikim bakterijam. Zadnje študije (Compeau in Bartha, 1985) so nakazale, da so glavni metilatorji Hg v sedimentih sladkih vod in estuariev SRB, precej manj pomembni so metanogeni. Obe skupini bakterij sta v glavnem odgovorni tudi za razgradnjo MMHg. Metilacijska aktivnost v sedimentu je pogosto značilno povezana s hitrostjo sulfatne redukcije in porazdelitvijo populacij SRB, čeprav niso vse sulfat reducirajoče bakterije sposobne Hg metilacije. Veliko študij je bilo usmerjenih v *Desulfovibrio*, pred kratkim pa je King s sod. (2000) ugotovil, da so SRB, ki izkoriščajo acetat, npr. predstavniki *Desulfobacteriaceae*, veliko učinkovitejši metilatorji Hg kot nepopolni oksidatorji, ki oksidirajo piruvat in laktat do acetata. Hitrost metilacije se spreminja s časom. Razlike so opazne med stacionarno in logaritemsko fazo rasti, vendar končnih zaključkov glede vpliva aktivnosti celic še ni.

2.6.1 Dejavniki ki vplivajo na mikrobne procese

Učinkovitost nastajanja MMHg je zelo odvisna od aktivnosti in strukture bakterijske združbe, dostopnosti Hg, nutrientov in akceptorjev elektronov, kot je na primer sulfat. Pri nizkih

koncentracijah dodajanje sulfata stimulira redukcijo sulfata in metilacijo. Nizke koncentracije sulfata so limitirajoče za SRB, vendar ti, v razmerah ki so značilne za sladkovodne sisteme, uspešno tekmujejo z metanogeni za skupna substrata vodik in acetat. Metilacijski potencial SRB je največji, ko je sulfat limiten in je na razpolago dovolj drugih organskih snovi. Pri visokih koncentracijah sulfata sulfid, ki se nabira kot produkt respiracije, omejuje produkcijo MMHg. Za inhibicijo so odgovorni nabiti Hg-S kompleksi in ne obarjanje HgS, kot so prvotno menili. Gilmour in Henry (1991) sta predlagala optimalne koncentracije sulfata za metilacijo in sicer od 0,2 do 0,5 mM SO_4^{2-} . Visoka koncentracija anorganskega Hg naj bi ali zavrla produkcijo MMHg ali pa favorizirala demetilacijo. To obrazloži dejstvo, da se povečuje razmerje metilnega proti celotnemu Hg z oddaljenostjo od vira onesnaženja.

Metilacija in redukcija sulfata sta hitrejši v zgornjih delih sedimenta, kjer sta zaloga nutrientov in mikrobnna aktivnost največji, ter na suspendiranem organskem materialu.

Dostopnost Hg za metilacijo naj bi bila določena s koncentracijo Hg^{2+} , vendar pa je za bakterijski prevzem Hg potrebna difuzija prek membrane, ki pa favorizira nenabite delce. Ključna oblika Hg za celični prevzem naj bi zatorej bila HgCl_2 v oksičnih, ter HgS^0 , $\text{Hg}(\text{SH})_2^0$ ali polisulfidni kompleks v anoksičnih vodah. Poleg difuzije pa se predvideva tudi obstoj drugačnih mehanizmov za prevzem Hg, saj njegova biološka dostopnost s povezovanjem v organske komplekse ni popolnoma izključena (Ullrich in sod., 2001).

2.6.1.1 Vpliv temperature

Pogosto so opazili, da je hitrost metilacije v vodnih sistemih najvišja v poletnih mesecih. Temperatura najverjetneje vpliva na metilacijo predvsem prek vpliva na splošno mikrobnno aktivnost. Povečana neto metilacija pri zvišani temperaturi pa je verjetno posledica zmanjšanja demetilacije in ne dejansko povečane metilacije. Večkrat je bilo pokazano, da demetilacija poteka bolje pri nižjih temperaturah (Ullrich in sod., 2001).

2.6.1.2 Vpliv pH

Kislost ne vpliva nujno na hitrosti metilacije pač pa sta od pH odvisni topnost in mobilnost Hg in MMHg. Nizek pH na splošno pospešuje sproščanje težkih kovin iz sedimentov in suspendirane snovi. Pri nizkem pH je favorizirana metilacija Hg^{2+} , med tem ko višji pH povečuje razmerje Hg^0/Hg^{2+} ter izgubo Hg z izhlapevanjem. Pri višjih pH vrednostih se tudi raje formira hlapni DMHg. Na splošno se v jezerskih vodah koncentracija MMHg poveča z znižanjem pH, v anaerobnih kot tudi v vrhnjih aerobnih plasteh sedimenta pa se neto produkcija MMHg z nižanjem pH manjša. Tudi za demetilacijo je bilo pokazano, da se z nizkim pH manjša vendar ne tako močno kot metilacija. Zato pa je pomen demetilacije v kislem okolju večji (Gillmour in Henry, 1991).

2.6.1.3 Vpliv organske snovi

Splošno velja, da povečane količine organske snovi stimulativno vplivajo na mikrobne procese metilacije. Včasih dodatno vlogo igra izpiranje (metil)živosrebrovih kompleksov z DOC v vodo. Možno je, da v jezerih bogatih z organsko snovjo pomembnejšo vlogo igra abiotična metilacija s huminskimi in fulvinskimi kislinami. Te niso metilatorji, pač pa so odgovorne za transport MMHg. Sposobne so tudi redukcije Hg^{2+} v Hg^0 . DOC negativno vpliva na biološko dostopnost Hg^{2+} , predvsem pri nevtralnem pH in ne toliko v kislem (Barkay in sod., 1997). Do mobilizacije in eventualne metilacije anorganskega Hg lahko prihaja tudi zaradi porabe kisika med intenzivno razgradnjo organske snovi. DOC tudi pospešuje topnost HgS.

2.6.1.4 Redoks razmere

Metilacija Hg poteka v aerobnih, predvsem pa v anaerobnih razmerah. V anaerobnih pogojih se poveča tudi stabilnost in topnost MMHg. Večina študij pa dokazuje, da je razpad MMHg hitrejši v razmerah visokega E_h . Mogoče so za Hg metilacijo pri različnih pogojih odgovorni

različni mehanizmi. Aerobno najverjetneje poteka abiotska metilacija, ki jo v nasprotju z mikrobnim zavirajo velike količine organskih snovi. Redoks razmere v sedimentu vplivajo tudi na razporeditev Hg med vodno in trdno fazo.

2.6.1.5 Sulfid

Sulfid igra v biogeokemiji anaerobnih sedimentov pomembno vlogo, kjer je produkt bakterijske redukcije sulfata. Veliko ga nastaja v anoksičnih s sulfatom in organsko snovjo bogatih sedimentih. Povezava med visoko koncentracijo sulfidov (S^{2-} , FeS ali FeS_2) in zmanjšano količino MMHg je bila dokazana z veliko raziskavami. Sulfid očitno zmanjša dostopnost Hg^{2+} za metilacijo. V prisotnosti sulfida Hg tvori netopen HgS , ki je v anaerobnih razmerah nedostopen za metilacijo, se pa v oksičnem okolju oksidira v sulfid in dostopno ionsko obliko Hg. Proces zmanjšanja organskega Hg v sedimentih je tudi lahko rezultat povišane koncentracije sulfida, ki z MMHg tvori nestabilen kompleks $(CH_3Hg)_2S$, ki razпадa v HgS in $DMHg$. Slednji se nato izgubi z izhlapevanjem (Compeau in Bartha, 1985; 1987).

2.6.1.6 Slanost

Metilacijska aktivnost je v morskih in estuarijskih sedimentih običajno nižja kot v sedimentih sladkih voda. Inhibitoren učinek slanosti na metilacijo Hg je predvsem izrazit v redukcijskem okolju. Visoka slanost pa ugodno vpliva na proces demetilacije. Poleg sulfata na speciacijo Hg in metilacijo vplivajo tudi drugi morski anioni. Hidrogenkarbonat ima negativen vpliv na metilacijo v oksičnih in anoksičnih pogojih, verjetno zaradi tvorbe $HgCO_3$. Splošno lahko trdimo, da so nabiti sulfidni in kloridni kompleksi odgovorni za znižano metilacijsko aktivnost v slanih vodah (Barkay in sod., 1997).

2.7 Hg V IDRIJCI, SOČI IN TRŽAŠKEM ZALIVU

Reka Idrijca izvira v zahodnem delu Slovenije in se po približno 40-ih kilometrih izliva v Sočo. Pred sotočjem se vanjo izteka potok Bača. Na Soči, ki se v Italiji preimenuje v Isonzo, so tri zajezitve. Približno 120 km od sotočja se Soča izliva v Tržaški zaliv. Povprečni pretok reke Soče pred izlivom v morje je približno $190 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ z dolgotrajnimi obdobji nižjih in občasnimi kratkimi obdobji visokih pretokov v pozni pomladi in jeseni, ki so povezani z visokimi koncentracijami suspendirane snovi (TSM).

Živosrebrovo rudo so v Idriji izkopavali približno 500 let. To je bil za španskim Almadénom drugi največji rudnik živega srebra na svetu, saj ocenjujejo, da je proizvedel 13% celotne svetovne proizvodnje. V njem je bilo izkopanih dvanajst milijonov ton rude, od katere pa se je več kot četrtina izgubila v okolico. Kljub temu, da so izkopavanja postopoma ustavili med leti 1987 in 1994, ko so rudnik dokončno zaprli, so v Idrijci, Soči in Tržaškem zalivu koncentracije Hg še vedno izredno visoke (Hines in sod., 2000; 2006; Horvat in sod., 1999; 2002; Faganeli in sod., 2003). To je posledica žganja in odlaganja obdelane rude v okolici rudnika. Glavni transportni medij za prenos Hg v raztopljeni in predvsem v suspendirani obliki je rečni tok (Covelli in sod., 2006; 2007).

Koncentracija $\text{Hg}_{(\text{tot})}$ v rečni vodi se od vzorčnega mesta nad rudnikom do mesta tik pod njim poviša več kot 100-krat. S tokom nato pada, predvsem opazno ob pritokih in izlivih v Sočo. Poveča se zopet ob večjih zajezitvah ter v izlivu. Kljub temu je povprečni letni vnos Hg s Sočo najmanj 1,5 tone. Delež MMHg v $\text{Hg}_{(\text{tot})}$ se nizvodno povečuje. V povprečju je delež MMHg nizek v zelo kontaminiranih področjih (Hines in sod., 2000). Površinske vode v zalivu ob izlivu Soče vsebujejo visoke koncentracije $\text{Hg}_{(\text{tot})}$. Ker je vsebnost raztopljenega Hg podobna kot v drugih zalivih in estuarijih, je torej večina Hg in le v manjši meri tudi MeHg v Tržaškem zalivu vezana na suspendirani material. Pomembna povezava med raztopljenim in totalnim Hg kaže, da imata obe zvrsti Hg isti izvor in enako porazdelitev. Večji del raztopljenega Hg je reaktiv in je vključen v biogeokemijske pretvorbe. Povišane koncentracije totalnega Hg v

vodnih plasteh pri dnu so posledica remobilizacije iz sedimenta. Resuspenzijo potrjuje visoka hitrost sedimentacije Hg, ki je povezana z visoko sedimentacijo TSM. Iz masne bilance je razvidno, da je sediment zaliva učinkovita past za totalni Hg in izvor MeHg. Povprečni zadrževalni čas $Hg_{(tot)}$ je približno 10 dni in MeHg približno 1,6 dneva v odvisnosti od izmenjave vode v zalivu. V sedimentu Tržaškega zaliva ob ustju Soče je koncentracija Hg višja od $30 \mu\text{g g}^{-1}$, kar je najvišje v celotnem Sredozemskem morju, in nato skoraj eksponentno pada v smeri proti jugu (Covelli in sod., 2001). V sedimentu je Hg večinoma je prisoten v detritični obliki kot HgS in HgO (Biester in sod., 2000).

2.7.1 Hg v organizmih

V dveh študijah (Hines in sod., 2000; Major, 2001) so pokazali, da se raznovrstnost malih nevretenčarjev v reki zmanjša pri Idriji, ter se ob toku navzdol do izliva v Sočo, ponovno okrepi. V predelih z zmanjšanim številom vrst značilno prevladuje en sam takson. Pri merjenju $Hg_{(tot)}$ in MMHg v perifitonu se je ponovil vzorec izmerjenih koncentracij v vodi in naplavinh. Enak trend so zasledili pri merjenju koncentracij v združbi nevretenčarjev.

Vsebnost Hg pri živalih pa je odvisna tudi od mesta, ki ga posamezna vrsta zaseda v prehranjevalni verigi. Tudi delež MMHg od $Hg_{(tot)}$ se povečuje v skladu s trofičnimi nivoji. Največjo koncentracijo in predvsem delež organskega Hg so seveda izmerili v ribah (Žižek in sod., 2007).

Variacije vsebnosti Hg in MMHg v morskem mesozooplanktonu so posledica sprememb v biomasi in vrstni sestavi ter prehranjevanja (Faganeli in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ORIS PODROČJA RAZISKAVE

Območje ob izlivu Soče je zaščiteno kot naravni park in naseljeno z mnogimi ptičjimi vrstami kot tudi drugimi živalmi. Dostop do našega vzorčevalnega mesta I 6 je najlažje po strugi iz zaliva. Nivo gladine v tem delu z oseko in plimo močno niha.

Na osnovi vertikalne porazdelitve slanosti, temperature, raztopljenega kisika in celotne suspendirane snovi (TSM ang.: total suspended matter) v vodnem stolpu, lahko v estuariju Soče ločimo tri plasti vod: rečno na površini, vmes brakično in pri dnu morsko (preglednica 1). Stratificirani vodni stolp je prisoten večji del leta in le ob velikem pretoku reke je siceršnja oslajena plast pri dnu potisnjena v Tržaški zaliv. Čeprav je območje visoke turbidnosti (HTZ ang.: high turbidity zone) navadno prisotno ob zgornjem robu pridnene oslajene plasti, so visoke koncentracije TSM pogosto prisotne tudi ob izlivu reke v morje. V splošnem so visoke koncentracije TSM omejene na slano plast pri dnu. Zadrževalni čas te plasti je običajno dolg, kar je razvidno iz zmanjšane koncentracije kisika (podatki niso prikazani).

Preglednica 1: Temperatura, slanost in celotna suspendirana snov (TSM) v vodnem stolpu na mestu vzorčenja I 6 v estuariju Soče, novembra 2006 in marca 2007.

Table 1: Temperature, salinity and total suspended matter (TSM) in the water column at I 6 in Soča estuary, sampled in November 2006 and March 2007.

	I 6	november 2006	marec 2007
temperatura (°C)	Površina	19,6	6,7
	Sredina	23,0	7,3
	Dno	24,6	7,3
slanost	Površina	1,8	3,1
	Sredina	3,9	21,4
	Dno	37,8	30,7
TSM (mg/l)	Površina	3,6	2
	Sredina	6,1	5,4
	Dno	16,4	6,4

Višje koncentracije celotnega Hg (preglednica 2) so spomladi omejene na brakično plast zaradi flokulacije suspendiranih delcev in v jesenskem obdobju na plast pri dnu zaradi resuspenzije sedimenta (vzporedno s povišano koncentracijo TSM). Najvišje koncentracije MeHg so tudi vidne v brakičnem segmentu.

Preglednica 2: Koncentracije celotnega živega srebra (Hg_{tot}) in celotnega metilnega živega srebra (MeHg_{tot}) v vodnem stolpu na mestu vzorčenja I 6 v estuariju Soče, novembra 2006 in marca 2007 (Horvat, 2007).

Table 2: Concentrations of total Hg (Hg_{tot}) and total methylmercury (MeHg_{tot}) at I 6 in Soča estuary, sampled in November 2006 and March 2007 (Horvat, 2007).

	I 6	november 2006	marec 2007
Hg_{tot} (ng/l)	Površina	24,12	31,57
	Sredina	35,99	36,44
	Dno	71,53	16,61
MeHg _{tot} (ng/l)	Površina	85	119
	Sredina	106	115
	Dno	68	n.v.

Sediment v ustju Soče na odvzemnem mestu I 6 je peščeni melj, ki vsebuje 35,1% peska, 46,2% melja in 18,6% gline (Viso, 2004). Vsebnost totalnega Hg v površinskem sedimentu na odvzemnem mesto I 6 je $12,58 \mu\text{g/g}$, MeHg pa $1,93 \text{ ng/g}$ in slednji obsega le $0,015\% \text{ Hg}_{\text{tot}}$. (Viso, 2004).



Slika 4: Izliv Soče v Tržaški zaliv z označenima mestoma vzorčenja I 6 v estuariju ter točkami D6, AA1 in CZ v zalivu.

Fig. 4: The Soča/Isonzo river mouth with sampling site I 6 and sites D6, AA1 and CZ in the Gulf of Trieste

3.2 VZORČENJE IN OBDELAVA SEDIMENTA

Vzorce sedimenta za naše raziskave smo odvzeli v sredini struge reke Soče/Isonzo 6,7 km po toku navzgor od izliva v Jadransko morje (Slika 4) na postaji I 6 (Covelli in sod., 2006). Do točke smo dostopili z ladjo in vzorčili s palube z gravitacijskim jedrnikom. Dostop v estuarij je sicer možen po daljši poti z avtomobilom, hitrejši pa je dostop z ladjo z zaliva po plovнем kanalu. Odvzeli smo po tri jedra sedimenta višine 15 do 20 cm in premera 20 cm. Sočasno z odvzemom vzorca je bil izmerjen globinski profil slanosti, temperature in turbidnosti vode. Z Niskinovim vzorčevalnikom za vodo s termometrom smo odvzeli tudi vodo z dna struge za merjenje vsebnosti kisika in nutrientov. Vzorci sedimenta so bili shranjeni na temperaturi *in situ* (22°C za novembridske in 9°C za marčne vzorce). Tako po prihodu v laboratorij smo odstranili supernatant in v vreči v dušikovi atmosferi sediment horizontalno razdelili na šest delov po globini in sicer 0 – 1,5 cm (A), 1,5 – 3 cm (B), 3 – 4,5 cm (C), 4,5 – 6 cm (D), 6 – 8 cm (E) in 8 – 12 cm (F). Posamezne globinske odseke sedimenta iz treh valjev smo združili in dobro premešali v plastičnih posodicah. Za določitev mokre in suhe mase smo z brizgami del sedimenta (5 ml za novembridske in 3 ml za marčne vzorce) prenesli na aluminijaste ladjice. Za redukcijo sulfata smo s sedimentom napolnili po tri 5 ml brizge in jih zamašili z gumijastimi zamaški. Za merjenje demetilacije smo v 13 ml serumske stekleničke dali po 3 ml sedimenta in 3 ml porne vode pridobljene z 10 do 15 minutnim centrifugiranjem vzorcev na 8000 obratih na minuto. Za merjenje metilacije so bili vzorci shranjeni v neprodušno zaprtih posodicah in poslani na analizo v laboratorij na UML (University of Massachusetts Lowell). Porno vodo smo filtrirali skozi filtre Millipore HA ($0,45 \mu\text{m}$ pore) in v njej določili koncentracije sulfida, raztopljenega Fe in Mn, alkalnosti ter N in P anorganskih spojin.

Pri merjenju hitrosti redukcije sulfata smo uporabili substrat $^{35}\text{SO}_4$. Radioaktivni izotop žepla je beta sevalec z razpolovno dobo 87 dni. Pri merjenju demetilacije MeHg smo kot substrat dodali $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}$ kjer je ^{14}C tudi sevalec beta z razpolovno dobo 5730 let. Za merjenje hitrosti metilacije Hg pa smo uporabili $^{203}\text{HgCl}_2$. Izotop ^{203}Hg ima razpolovno dobo 47 dni in je gama in beta sevalec.

3.3 MERJENJE HITROSTI MIKROBNIH PRETVORB

3.3.1 Metilacija živega srebra

Za ugotavljanje hitrosti metilacije Hg je bilo v 13 ml stekleničke razdeljenega po 3 ml sedimenta, homogeniziranega s 3 ml porne vode (angl. slurry). Vse reakcijske posodice so bile zaprte z gumijastimi čepi in teflonskimi pokrovčki. V stekleničke je bilo injicirane 0,2 μ l raztopine, ki je vsebovala 0,2 - 0,5 μ Ci $^{203}\text{HgCl}_2$. Količina je ustrezalo približno 40 – 100 ng Hg(II) na ml sedimenta, kar je do 1000-krat nižja koncentracija od koncentracije Hg v sedimentu. Stekleničke smo inkubirali en dan v temi pri temperaturi *in situ* (22°C za novembrsko in 9°C za marčno serijo). Po inkubaciji smo reakcijski mešanici s siringo postopoma dodali majhne količine HCl, kar je ustavilo reakcijo, raztopilo karbonate in shranilo vzorce pri nizkem pH. Neizrabljen $^{203}\text{HgCl}_2$ in radioaktivno označen MeHg sta bila ločena s postopkom, ki so ga opisali Guimaraes in sod. (1995). Okisani mulj smo prenesli v steklene epruvete. Dodali smo 0,5 ml nasičenega CuSO₄, ter 5,0 ml nasičenega KCl v 0,6M H₂SO₄. Zmes smo dobro pretresli, segreli v vodni kopeli na $70 - 75^\circ\text{C}$ ter po 15 minutah centrifugirali. Odstranili smo supernatant, sediment zmešali s 5,0 ml toluena in homogenizirali. Po odstranitvi plasti toluena smo postopek ponovili z enakim volumnom toluena in nato oba ekstrakta združili. Toluen smo dehidrirali z dodajanjem presežka Na₂SO₄. Nato smo toluen odpipetirali in dodali scintilacijsko tekočino. Podvzorce za kontrolo smo z dodatkom kisline pred poskusom inhibirali.

3.3.2 Demetilacija metil živega srebra

Po 3 ml sedimenta smo z brizgo razdelili v 13 ml stekleničke. Dodali smo 3 ml porne vode, stekleničke začepili z gumijastimi zamaški in vsebino pretresli, da smo dobili homogeno blato (slurry). Vzorčke smo 25 minut prepričevali z N₂ in nato vanje injicirali po 5 μ l $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}$. Inkubirali smo jih en dan na temperaturi *in situ* (22°C za novembrsko in 9°C za marčno serijo) nato pa reakcijo ustavili tako, da smo vzorcem dodali 1 ml 3M NaOH. Kontrole smo pripravil

tako, da smo vzorcem dodali bazo 10 minut preden smo vbrizgali substrat za demetilacijo. Stekleničke smo prepihalo s stisnjениm zrakom in atmosferski plin nad muljem, v katerem smo želeli izmeriti CH_4 , speljali preko peči, segrete na 850°C . Plin smo najprej dehidrirali in sicer tako, da smo ga speljali prek 3 ml plastične brizge napolnjene s silikagelom. Ta je po izpostavljenosti vlagi v plinu postal rožnat. Kolona v pečki je vsebovala CuO_2 in v njej se je ves CH_4 pretvoril v CO_2 . Ogljikov dioksid smo nato ulovili v past v steklenički na koncu kolone. Past je bila sestavljena iz 6 ml scintilacijske tekočine AQUASOL-2, 3 ml CH_3OH , ter 3 ml feniletanolamina. Prepihanje smo izvajali približno 15 minut, kar naj bi zadostovalo za odstranitev vsega CH_4 iz zraka nad vzorcem, ki se je nato oksidiral v CO_2 . Po 15 minutah smo vzorce pretresli v večje stekleničke in v njih ugotavljali še količino CO_2 . Vzorcem smo dodajali 6M HCl postopoma večkrat po 1 ml, da so se raztopili tudi karbonati in da smo iz vzorca izločili ves CO_2 . Tokrat smo s stisnjениm zrakom preprihovali vzorec, plin pa smo lovili v scintilacijski tekočini, CH_3OH in feniletanolaminu. Aktivnost raztopin v stekleničkah smo izmerili s scintilacijskim števcem Packard Tri-Carb 3100TR LSC.

3.3.3 Redukcija sulfata

S sedimentom, v katerem smo merili hitrost redukcije sulfata, smo napolnili 5 ml plastične brizge in jih zaprli z gumijastimi zamaški. V sediment smo nato z jekleno iglo vbrizgali substrat $^{35}\text{SO}_4$. Količina substrata, ki smo ga vbrizgali, je bila taka, da je aktivnost glede na starost izotopa, ustrezala 2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$. Vzorce smo nato inkubirali na temperaturi *in situ* približno 24 ur (zabeležili smo čas začetka in konca inkubacije) in nato reakcijo ustavili z zamrznjenjem na -20°C . Količino sulfida v vzorcih smo določili s pomočjo destilacije.

Za redukcijo S spojin iz vzorca smo uporabili raztopino CrCl_3 , ki smo jo pripravili s titracijo s cinkom. Kolono za titracijo smo pripravili z amalgamiranjem cinkovih zrnec z HgCl_2 raztopljenim v vodi. Kolono smo najprej sprali z 0,1M HCl pri čemer se je Zn obarval svetlo sivo. Pri titraciji CrCl_3 se je ta iz oksidirane oblike +3 spremenil v reducirano +2 in pri tem spremenil barvo iz temno zelene v modro. Po 40 ml reducirane Cr smo shranili v predhodno

prepihanih stekleničkah z N₂ zaprtih z gumijastimi zamaški. Do uporabe so bile stekleničke s CrCl₃ shranjene v temi.

Za destilacijo smo v destilacijske bučke vlili 10 ml 96% etanola, 20 ml 37% HCl, 40 ml pripravljene raztopine CrCl₃ ter vzorec sedimenta inkubiranega s ³⁵SO₄(5ml). Past za destirani H₂S je bil 6% Zn-acetat. Destilacija posameznega podvzorca je potekala približno 15 minut. Dobljene vzorce smo razdelili na pol v dve stekleni števni kiveti in jim dodali enake količine scintilacijske tekočine Ultima Gold. Nato smo s tekočinskim scintilacijskim števcem Packard Tri-Carb 3100TR LSC izmerili aktivnost. Glede na število razpadov na minuto v dobljenih vzorcih in količino radioaktivnega substrata vbrizganega pred 24-urno inkubacijo smo lahko določili hitrost redukcije sulfata v vzorcih.

3.4 ANALIZE PORNIH VOD

Alkalnost v porni vodi smo določili titrimetrično s HCl (Gieskes in Rogers, 1973), sulfid, nitrat, amonij in fosfat pa kolorimetrično (Grasshoff in sod., 1983). Celotno živo srebro v porni vodi so določili s CV AAS po predhodni BrCl/UV oksidaciji in SnCl₂ redukciji ter amalgamiraju z zlatom (Bloom in Crecelius, 1983). Določanje celotnega metilnega živega srebra pa je potekalo z ekstrakcijo s topilom, etilacijo vodne faze, ločevanjem s plinsko kromatografijo, pirolizo in detekcijo s CV AFS (Horvat in sod., 1993a; b). Koncentracije raztopljenega Fe in Mn smo določili z ICP-AES.

3.5 ANALIZE TRDNE FAZE

Količino celotnega reduciranege žvepla (TRS) v vzorcih, v katerih smo merili aktivnost ujetega ZnS, smo določili kolorimetrično (Hines in sod., 2001). N_{tot}, S_{tot} in C_{org}, v trdni fazi slednjega po nakisanju s HCl (Hedges and Stern, 1984), smo določili z uporabo elementnega analizatorja Carlo Erba 1108 EA pri sežigni temperaturi 1020 °C.

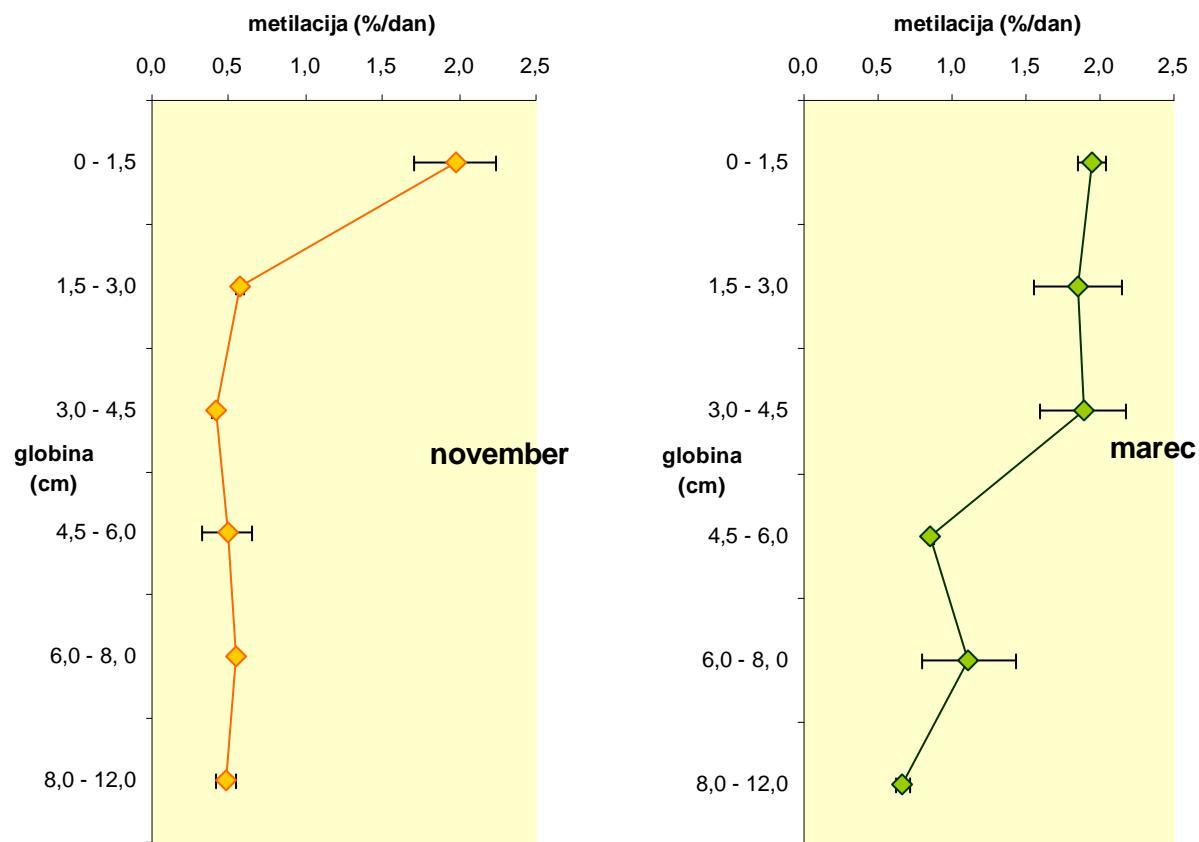
4 REZULTATI

4.1 HITROSTI PRETVORB ŽIVEGA SREBRA

Aktivnost pretvorb smo podali s konstantami reakcij prvega reda (% na dan), kar predstavlja odstotek radioaktivnega substrata, ki se je pretvoril v produkt v času 24 ur. Pri rezultatih moramo upoštevati dejstvo, da je bil dodan radioaktivni substrat v poskusnih posodicah veliko bolj biološko dostopen kot pa naravno prisoten substrat. Zato hitrosti pretvorb niso absolutne (so potencialne), uporabne pa so za primerjavo med vzorci z različnih globin ter različnimi vzorčevalnimi obdobji in lokacijami.

4.1.1 Hitrost metilacije

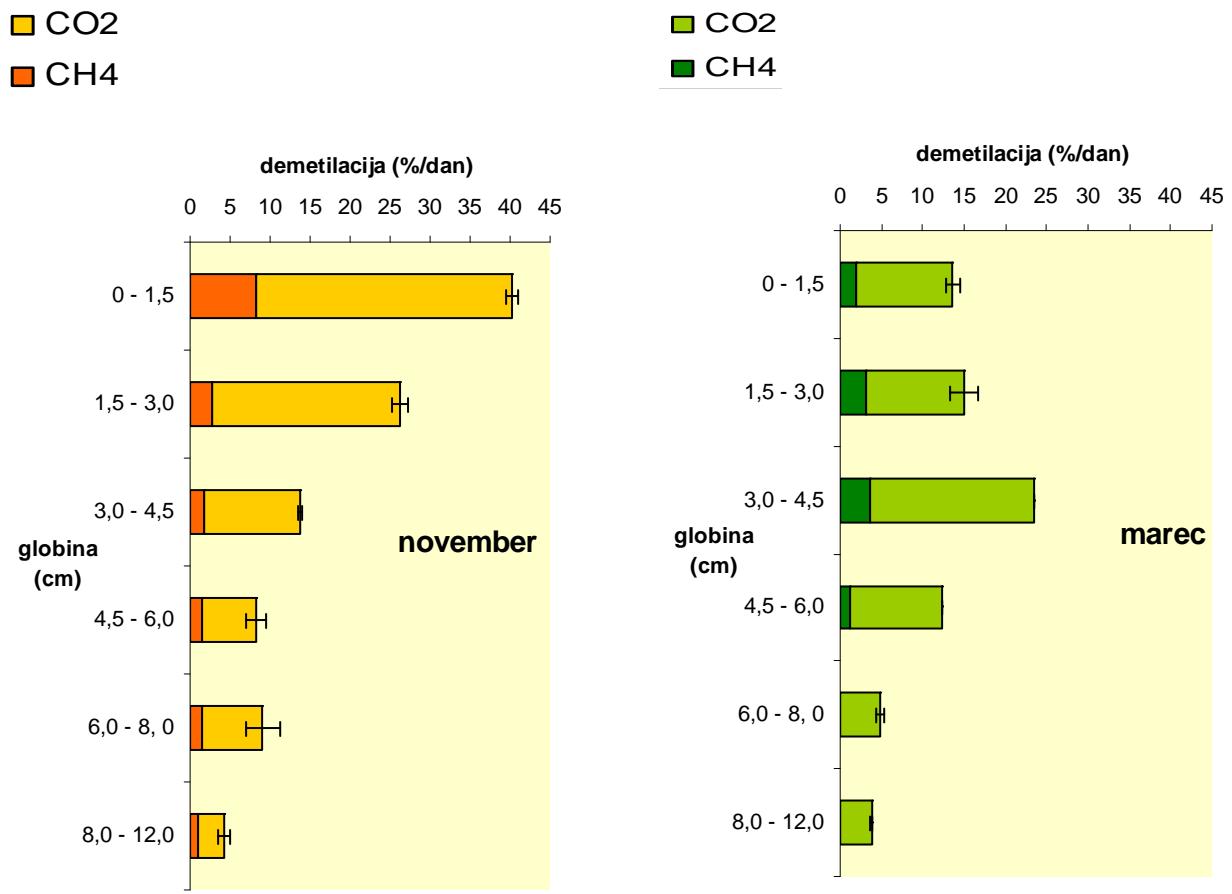
Rezultati meritev hitrosti metilacije (slika 5) nam kažejo bistveno razliko med obema vzorčevalnima obdobjema predvsem v globljih predelih sedimenta. Na površini sta hitrosti v obeh mesecih enaki in sicer $2\% \text{ dan}^{-1}$. V novembру je opazen hiter padec aktivnosti takoj v drugem sloju sedimenta t.j. globlja od 1,5cm. Marčni sediment kaže nezmanjšano hitrost mikrobnih pretvorb Hg v metilno živo srebro vse do globine 4,5cm, kjer hitrost pade na 1% dnevno, kar pa še vedno presega hitrost v novembrskem poskusu, ki se že tik pod površino ustali na 0,5%.



Slika 5: Globinski profil hitrosti metilacije Hg v vzorcih sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče. Hitrosti so podane kot konstante reakcije prvega reda. Intervali napak predstavljajo standardne odklone treh ponovitev.
 Fig. 5: Depth profiles of Hg methylation rates in sediments from I 6 in Soča estuary. Activities reported are first-order rate constants. Errors bars are standard deviations of triplicates.

4.1.2 Hitrost demetilacije

Pri meritvah hitrosti demetilacije MeHg smo ločeno upoštevali produkt reduktivne demetilacije CH_4 in produkt oksidativne demetilacije CO_2 . Na sliki 6 je lepo razvidno, da je v obeh vzorčevalnih obdobjih v sedimentu prevladovala oksidativna demetilacija, ki jo večinoma pripisujemo SRB. Lahko pa opazimo, da je relativen delež reduktivne demetilacije večji v zimskih vzorcih. Novembrski profil se od marčevskega razlikuje predvsem v zgornjih plasteh, kjer je v toplejšem obdobju mikrobna aktivnost demetilacije mnogo višja. V površinskem sloju iz jesenskega obdobja opazimo tudi izjemno povišan delež proizvedenega CH_4 . Aktivnost na globini 3 do 4,5 cm je tudi izjema, saj je hitrost demetilacije v marcu višja kot v novembru, kar je ravno v nasprotju z razmerami v drugih globinah. Globlje v sedimentu v spomladanskih vzorcih produkcije CH_4 nismo zaznali.



Slika 6: Globinski profil hitrosti demetilacije MeHg v vzorcih sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče (temneje obarvan del stolpa predstavlja CH₄, svetlejši pa CO₂). Intervali napak predstavljajo standardni odklon treh ponovitev.

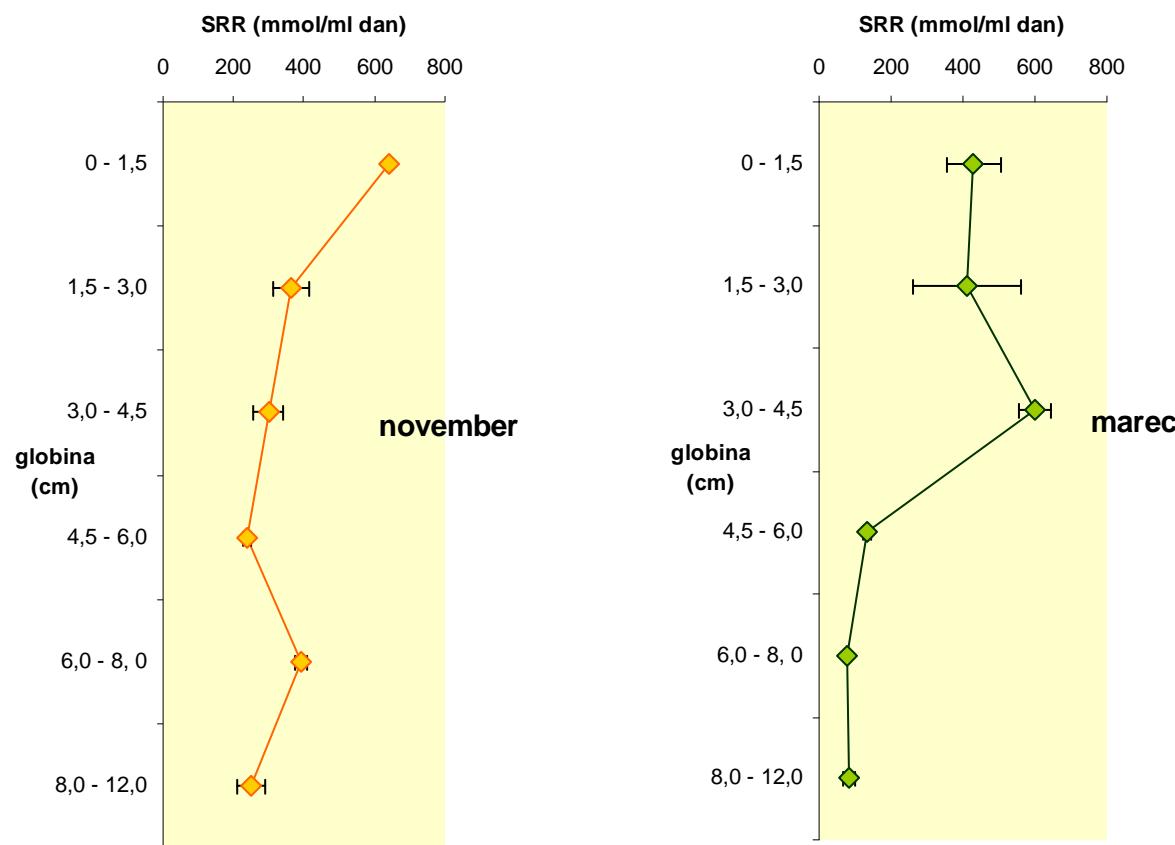
Fig. 6: Depth profiles of MeHg demethylation rates in sediments from I 6 in Soča estuary (dark and light profiles indicate CH₄ and CO₂ formation, respectively). Errors bars are standard deviations of triplicates.

4.2 HITROST REDUKCIJE SULFATA

Redukcija sulfata (slika 7) je bila najhitrejša v površinskem delu sedimenta v novembru.

Jesenski sediment kaže tudi v splošnem višjo redukcijsko aktivnost v primerjavi z marcem.

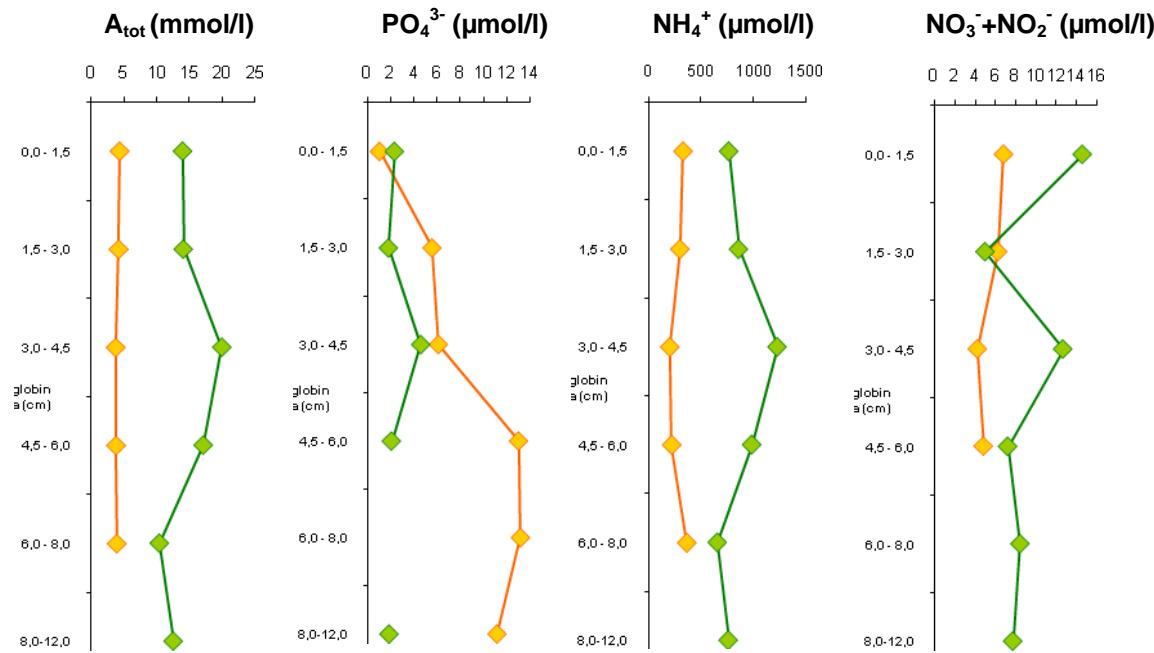
Tudi padec aktivnosti z globino je v novembру zgolj 50 odstoten, medtem ko marca aktivnost v globini pade na 20 % površinske vrednosti. Spomladanski sediment kaže maksimum aktivnosti malo pod površino sedimenta in sicer na globini 3 do 4,5cm.



Slika 7: Globinski profil hitrosti redukcije sulfata v vzorcih sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče, vzorčenega novembra 2006 in marca 2007. Intervali napak predstavljajo standardni odklon treh ponovitev.

Fig. 7: Depth profiles of sulphate reduction in sediments from I 6 in Soča estuary, collected in November 2006 and March 2007. Errors bars are standard deviations of triplicates.

4.3 ANALIZE PORNIH VOD



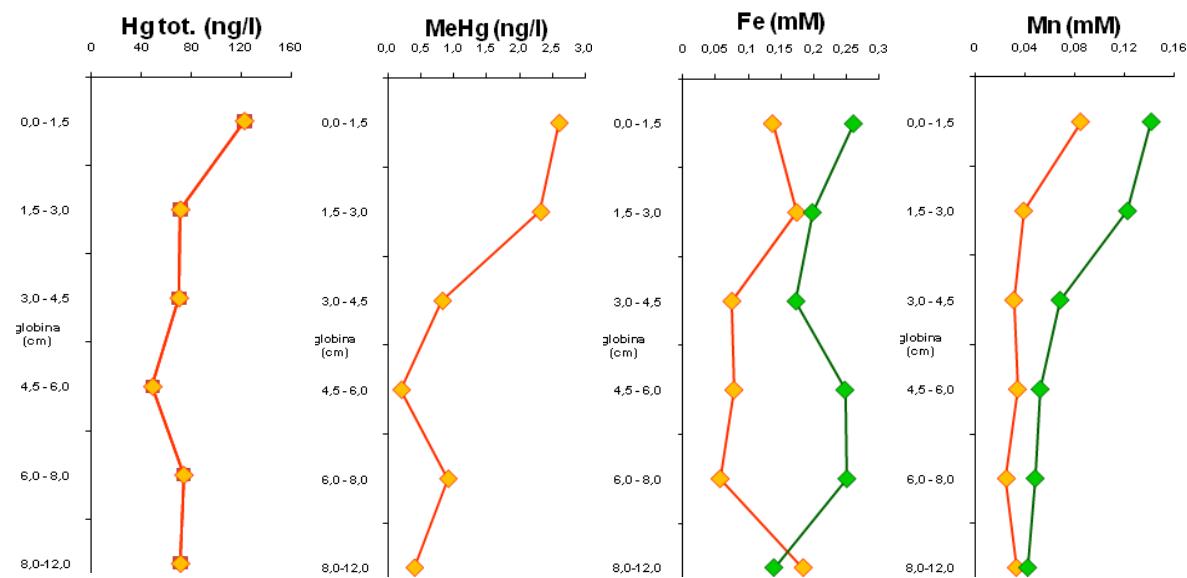
Slika 8: Globinski profil alkalinosti, vsebnosti PO_4^{3-} , NH_4^+ in $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ v porni vodi sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče. Oranžna barva predstavlja novembske, zelena pa marčne vzorce.

Fig. 8: Depth profiles of alkalinity, PO_4^{3-} , NH_4^+ and $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ in sediment pore waters from I 6 in Soča estuary. Orange and green lines represent samples collected in November 2008 and March 2007, respectively.

Vse koncentracije izmerjenih parametrov so bile v supernatantu nižje kot v pornih vodah.

Vertikalni profil alkalinosti kaže porast koncentracij z globino v hladnejšem obdobju. Fosfata smo v porni vodi zaznali več v globljih vzorcih pod 4,5cm, posebej še v novembriskih vzorcih. V splošnem je bilo v pornih vodah le malo fosfata (visoko razmerje $\text{NH}_4^+/\text{PO}_4^{3-}$), kar je tipično za karbonatne sedimente (Hines in Lyons, 1982; Ogrinc in Faganeli, 2006). Nasprotno smo izmerili višje koncentracije amonija v pornih vodah v marčnih globljih vzorcih. Koncentracija nitrata je izrazito padala z globino sedimenta. Velik padec smo opazili v marčnih vzorcih že pod globino 1,5cm. Vse koncentracije sulfida so bile pod 5 μM , zato teh rezultatov grafično ne prikazujemo. Koncentracije raztopljenega Fe in Mn so bile najvišje v površinski plasti (0-2,5cm). Koncentracije Hg v pornih vodi smo uspeli dobiti samo za novembriske vzorce

(Horvat, 2007). Količna porne vode v marčnih vzorcih je bila premajhna. Koncentracije raztopljenih Hg_{tot} in $MeHg$ z globino sedimenta padajo.

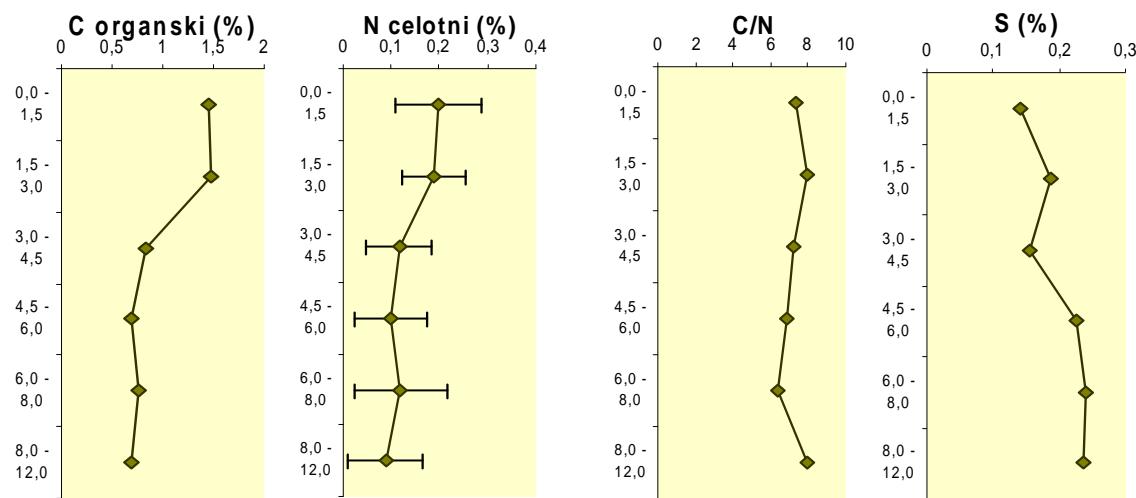


Slika 9: Globinski profil Hg_{tot} in $MeHg$ (Horvat, 2007), ter Fe^{2+} in Mn v poreni vodi sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče. Oranžna barva predstavlja novembarske, zelena pa marčne vzorce.

Fig. 9: Depth profiles of Hg_{tot} and $MeHg$ (Horvat, 2007), and Fe^{2+} and Mn in sediment pore waters from I 6 in Soča estuary. Orange and green lines represent samples collected in November 2008 and March 2007, respectively.

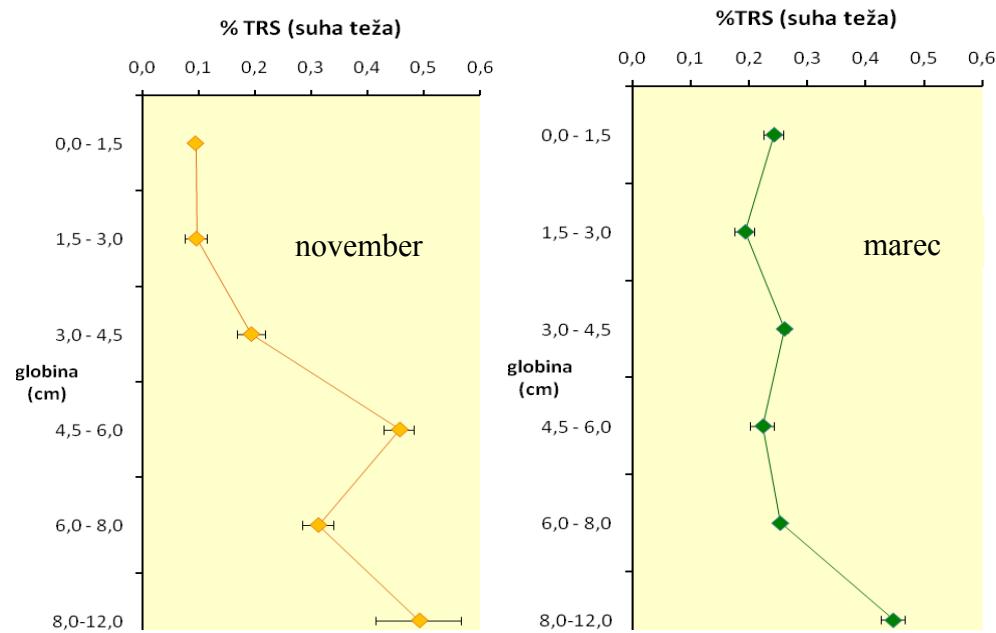
4.4 ANALIZE TRDNE FAZE

Vsebnosti organskega ogljika v sedimentu se znižujejo z globino od 1,5% na površini do 0,5% na 4,5cm. Vsebnosti celotnega dušika so na površini višje (0,2%) in z globino padajo (0,1%). intervali napak so pri teh rezultatih večji, ker smo prikazali srednjo vrednost dveh meritev, opravljenih v dveh vzorčevalnih terminih. Ker so standardni odkloni skoraj konstantni lahko privzamemo dobljeni trend za pravilen. Razmerja C/N (molska) so nizka (6-8) in tipična za morsko organsko snov. Vsebnosti celotnega S so dokaj visoke (0,1% na površini) in naraščajo z globino (0,2%). Vsebnosti TRS tudi naraščajo z globino, pri čemer so vidne višje površinske koncentracije pozimi, globlje v sedimentu pa jeseni.



Slika 10: Globinski profil C_{org} , N_{tot} . (srednje vrednosti novembrske in marčne meritve ter standardni odklon), razmerje C/N ter profil S v trdni fazi sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče.

Fig. 10: Depth profiles of C_{org} , N_{tot} . (mean value of november and march sampling and standard deviation), C/N ratio and S in sediment solid phase from I 6 in Soča estuary.



Slika 11: Globinski profil celotnega reduciranega žvepla (TRS) v trdni fazi sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče. Intervali napak predstavljajo standardni odklon treh ponovitev.

Fig. 11: Depth profile of TRS in sediment solid phase from I 6 in Soča estuary. Errors bars are standard deviations of triplicates.

5 RAZPRAVA

5.1 MIKROBNI PROCESI Hg V USTJU SOČE

Na lokaciji I 6 v ustju Soče sta aktivno potekali metilacija Hg in demetilacija MeHg. Hitrosti potencialne metilacije in demetilacije sta bili višji v jesenskem obdobju ob višji temperaturi, čeprav sta bili aktivnosti dokaj visoki tudi pozimi. Najvišja hitrost metilacije jeseni je bila v površinski plasti (do globine 1,5cm), prav tako demetilacije. Globinska profila sta dokaj dobro sledila profilu redukcije sulfata. V globinskih profilih zimskih hitrosti metilacije in demetilacije je vidna najvišja aktivnost v plasti do 4,5cm. Obe aktivnosti se tudi dobro ujemata z globinskimi profilom hitrosti redukcije sulfata in vsebnosti TRS. Opisano nakazuje, da je redukcija sulfata odgovorna za metilacijo Hg (Compeau in Bartha, 1985; Gilmour in sod., 1992; Benoit in sod., 1999; King in sod., 1999). Tudi koncentracije MeHg v porni vodi v jeseni kažejo povišane vrednosti v zgornji 4,5cm plasti, kar je posledica višje metilacijske aktivnosti. Izmerjene koncentracije sulfida v porni vodi ugodno vplivajo na nastanek biološko razpoložljivega nevtralnega kompleksa HgS, ki hitro prehaja skozi bakterijsko membrano in se nato metilira.

Demetilacija MMHg na I 6 je bila prvenstveno oksidativna, saj je kot produkt večinsko nastajal CO₂. Ta proces poteka pretežno v anaerobnih okoljih (Hines in sod., 2000; Barkay in sod., 2003), medtem ko reduktivni proces prevladuje v aerobnih okoljih. V plasti pri dnu v izlivu Soče redno zasledimo nižje koncentracije raztopljenega kisika in višje hitrosti redukcije sulfata in vsebnosti TRS v sedimentu. Redoks razmere v površinskem sedimentu tako določajo pot razgradnje MMHg. Oksidativna demetilacija MMHg je analogna razgradnji spojin C₁ (metanol, metilamini, metil sulfid) in nastali Hg(II) se lahko ponovno metilira v MeHg (Barkay in sod., 2003). Demetilacija na I 6 se zdi značilno povezana z redukcijo sulfata, ki je sicer dominanten mikroben proces v razgradnji sedimentirane organske snovi v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod., 1997) in zasenči ostale anaerobne procese (redukcija NO₃⁻, Fe(III), Mn(IV)).

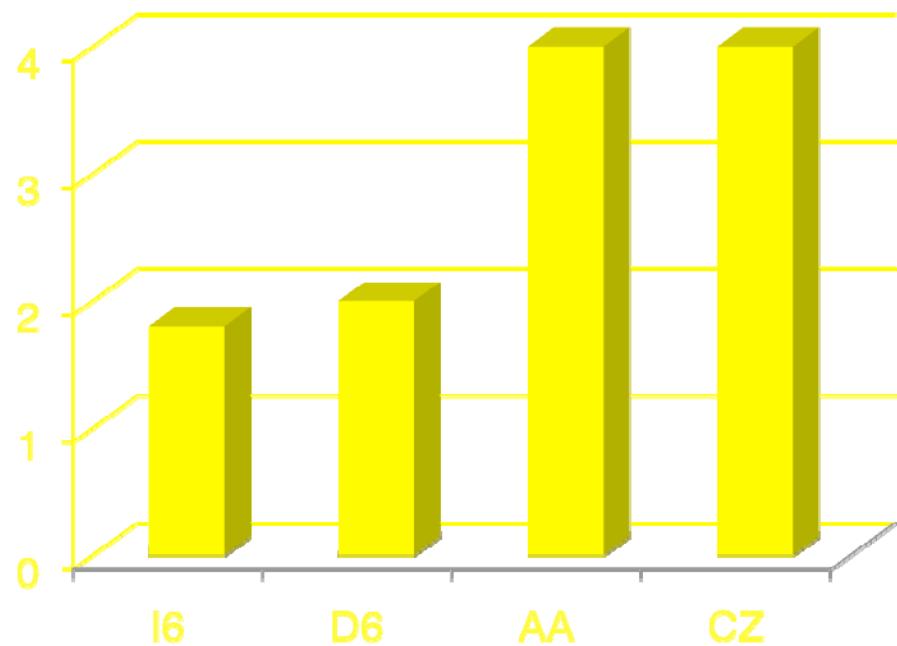
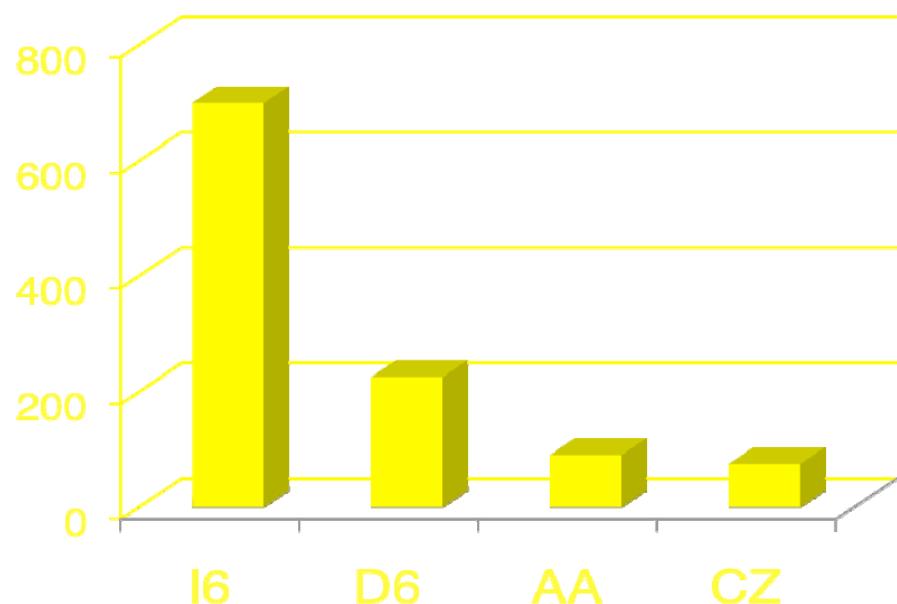
Razlike med hitrostmi metilacije jeseni in pozimi niso velike in če jih primerjamo lahko ugotovimo, da so v zimskem obdobju hitrosti celo nekoliko večja. Podobno je pri redukciji sulfata. Tudi vsebnosti TRS so višje v zimskem obdobju. To je presenetljivo, saj so bile temperaturne razlike med obema obdobjema precejšnje in znano je, da temperatura pomembno vpliva na preučevane mikrobne procese (Hines in sod., 2006). Vpliv temperature je bil bolj izrazit pri hitrosti demetilacije, kjer smo izmerili nižje hitrosti pozimi.

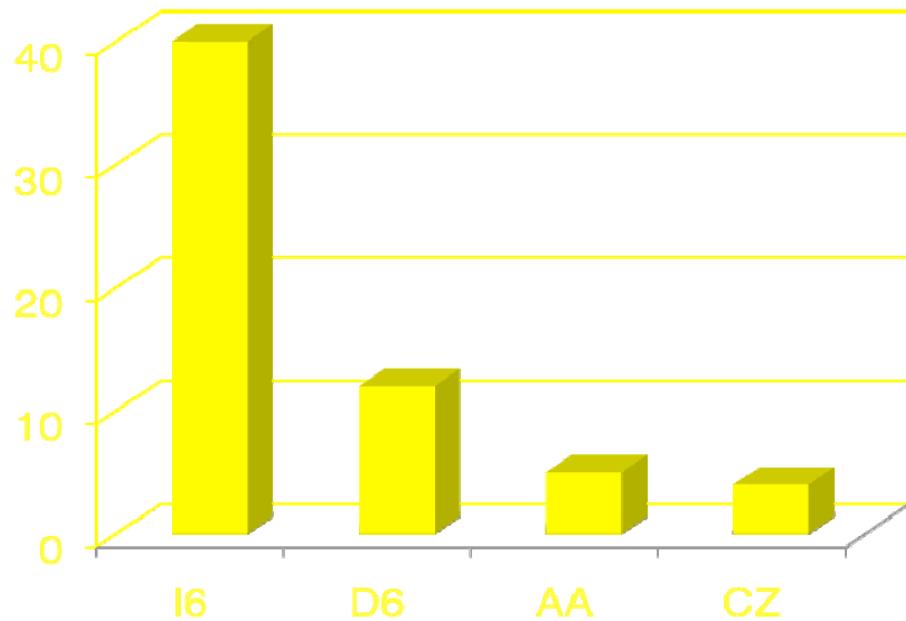
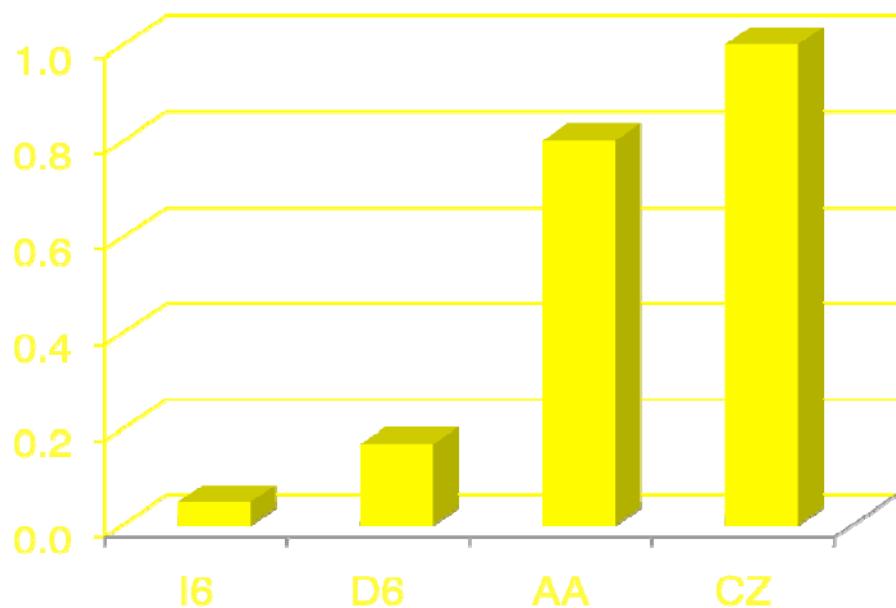
5.2 MIKROBNE PRETVORBE Hg

Za boljše ovrednotenje mikrobnih pretvorb Hg moramo konstante reakcijskih hitrosti pretvoriti v hitrosti reakcij (procesov) z upoštevanjem koncentracij Hg kemijskih zvrsti (Hines in sod., 2006). Pri tem se soočamo s težavo, saj kemijske analize ne nudijo podatkov o razmerju med biološko dostopnim in inertnim Hg oz. o vsebnostih zvrsti Hg, ki so substrat za metilirajoče in demetilirajoče bakterije. Izmerjene količine zvrsti Hg namreč vključujejo velik delež živega srebra, ki je zaradi interakcij z ligandi in površinami, nedostopen za mikrobne pretvorbe. Tudi označene Hg zvrsti, uporabljene v poskusih, so bile po vsej verjetnosti bolj biološko dostopne kot »naravno« prisotne. Za izračun hitrosti procesov metilacije in demetilacije smo torej uporabili koncentracije celotnega in pa raztopljenega substrata. V prvem primeru smo ugotovili, da je hitrost metilacije izredno visoka, skoraj 10-krat višja kot v drugem primeru, in močno presega izmerjene koncentracije MMHg v sedimentu. Ker hitrost demetilacije ne prispeva dovolj k tej raziski, sklepamo, da je le manjši del celotnega Hg na razpolago metilaciji (Gilmour in Riedel, 1995). V drugem primeru so hitrosti metilacije podobne vsebnostim MMHg v sedimentu in podobne bentoškemu toku MMHg na bližnjem odvzemnem mestu AA1 (Covelli in sod., 1999) ter tako bolj realne. Sklepamo torej lahko, da predstavlja raztopljeni Hg zadovoljivo oceno mikrobnograzpoložljivega Hg za metilacijo v sedimentu Tržaškega zaliva.

Primerjave med opisanimi izmerjenimi procesi na štirih odvzemnih mestih (I 6, D6, AA1 in CZ) v Tržaškem zalivu (slika 4) omogočajo, da izluščimo dejavnike, ki uravnavajo procese

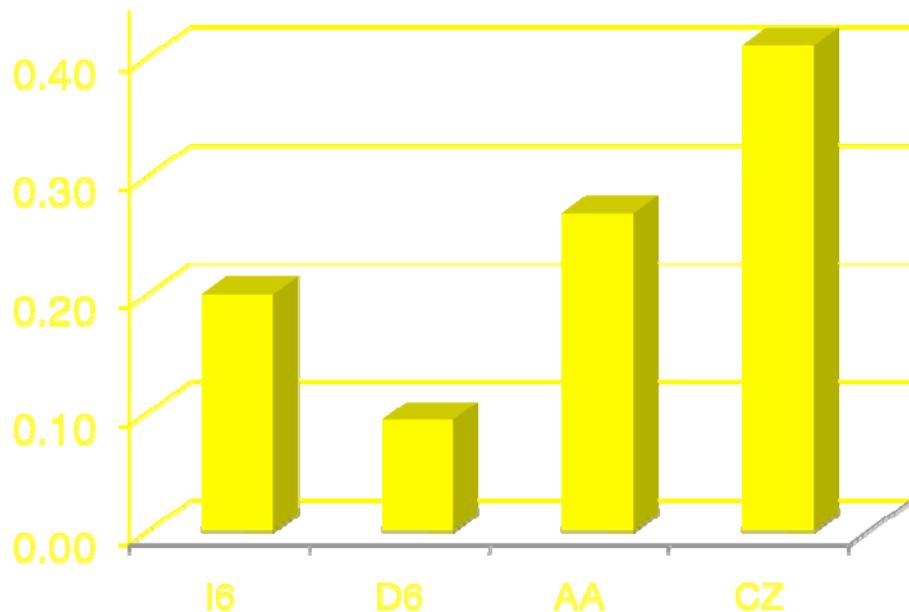
metilacije in demetilacije v Tržaškem zalivu. Hitrosti metilacije naraščajo z oddaljenostjo od izliva reke Soče in so najvišje v sredini zaliva in se dobro ujemajo z naraščanjem razmerja med metilacijo in demetilacijo ter deležem MMHg v Hg_{tot} . Nasprotno, hitrosti demetilacije in redukcije sulfata padata proti sredini zaliva. Opisano nakazuje, da je demetilacija povezana z redukcijo sulfata in da so pretežno SRB odgovorne za ta proces, kar pa bo dokazal šele načrtovani poskus z dodajanjem različnih akceptorjev elektronov, inhibitorjev procesov (n.pr. molibdata za redukcijo sulfata) in organskih spojin. Vzrok za nižje hitrosti metilacije v ustju Soče (I 6, D6) v primerjavi z osrednjim zalivom (AA1, CZ) ostaja odprto in ga trenutno lahko razložimo z udeležbo tudi drugih bakterij, npr. Fe reducentov, v metilaciji Hg. To hipotezo podpira povisana koncentracija raztopljenega Fe v pornih vodah I 6 v primerjavi z ostalimi odvzemnimi mesti (Hines in sod., 2001). Druga (dodatna) razloga pa vključuje visoko redukcijo sulfata, kar vodi do povisane koncentracije sulfida, in posledično nastanek HgS , ki je manj dostopen za metilacijo. To hipotezo podpira povisana vsebnost TRS na I 6 v primerjavi z drugimi odvzemnimi mesti (Hines in sod., 2006), kjer redukcija sulfata pomembno prispeva k intenzivni razgradnji pretežno morske sedimentirane organske snovi (Hines in sod., 1997). Intenzivnost razgradnje dokazujejo povisane koncentracije NH_4^+ , PO_4^{3-} , Fe in Mn v pornih vodah I 6 (in D6) glede na odvzemna mesta v zalivu (Hines in sod., 2006) ob povisanih vsebnosti C_{org} in predvsem N_{tot}. Znano je, da se različne frakcije sedimentirane organske snovi različno razgrajujejo v oksičnem in anoksičnem vodnem okolju (Hedges in Keil, 1995; Hopkinson in sod., 1998; Kristensen, 2000). Izstopajo tri karakteristične frakcije: popolnoma razgradljiva oz. popolnoma refraktorna frakcija v vseh okoljih in pa adsorbirana frakcija, ki se počasi razgrajuje v oksičnem a hitro v anoksičnem okolju. Očitno poteka v izlivu Soče hitra razgradnja morske organske snovi v oksičnem in anoksičnem okolju.

Slika 12: Hitrosti metilacije (% dan⁻¹) v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod.2006).Fig. 12: Hg methylation rates (% day⁻¹) in sediments of the Gulf of Trieste (Hines et al., 2006).Slika 13: Hitrost redukcije sulfata (mmol ml⁻¹ dan⁻¹) v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod. 2006).Fig. 13: Sulphate reduction rates (mmol ml⁻¹ day⁻¹) in sediments of the Gulf of Trieste (Hines et al., 2006).

Slika 14: Hitrost demetilacije (% dan⁻¹) v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod. 2006).Fig. 14: MeHg demethylation rates (% day⁻¹) in sediments of the Gulf of Trieste (Hines et al., 2006).

Slika 15: Razmerje med metilacijo in demetilacijo v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod. 2006).

Fig. 15: Methylation/demethylation ratios in sediments of the Gulf of Trieste (Hines et al., 2006).

Slika 16: Delež MeHg v $\text{Hg}_{\text{tot.}}$ v sedimentu Tržaškega zaliva (Hines in sod. 2006).Fig. 16: The % of MeHg as $\text{Hg}_{\text{tot.}}$ in sediments of the Gulf of Trieste (Hines et al., 2006).

6 SKLEPI

Pri meritvah metilacije Hg smo ugotovili razliko v hitrosti pretvorb med jesenskimi in zimskimi vzorci. Opazen je večji padec hitrosti metilacije z globino sedimenta v novembrskih vzorcih.

Demetilacija, ki poteka v vzorcih sedimenta je prvenstveno oksidativna. Delež reduktivne demetilacije MMHg je bil večji v vzorcih odvzetih v zimskem obdobju. Razlika v demetilacijski aktivnosti med obema obdobjema je opazna predvsem v višjih slojih sedimenta.

Redukcija sulfata je bila najhitrejša v vrhnjih plasteh sedimenta, hitrejša je bila v jesenskih vzorcih. Izmerjene aktivnosti redukcije sulfata, kot tudi izmerjene količine TRS zelo lepo sovpadajo z izmerjenimi hitrostmi demetilacije.

Hitrost metilacije z upoštevanjem izmerjenih koncentracij Hg vrst v sedimentu so pokazale, da je Hg_{tot} v pornih vodah tisti, ki je razpoložljiv za proces metilacije v sedimentu estuarija.

Med tem ko demetilacijo lahko povežemo z mikrobnou redukcijo sulfata, so za metilacijo poleg SRB najbrž odgovorni tudi drugi mikroorganizmi, na primer Fe reducenti.

7 POVZETEK

Idrijski rudnik, drugi največji rudnik živega srebra na svetu je bil dokončno zaprt leta 1995. Kljub temu pa še vedno prispeva k velikemu vnosu Hg v okolje po toku Idrijce, Bače in Soče vse do Tržaškega zaliva v severnem Jadranskem morju, dobrih 100 kilometrov stran od izvora. V sedimentu v ustju reke Soče so bile izmerjene pretvorbe Hg z namenom oceniti sposobnost sistema za pretvarjanje in mobilizacijo Hg, ter produkcijo in razgradnjo MMHg. Vzorci iz vzorčnega mesta I 6 v stratificiranem estuariju Soče so bili odvzeti anaerobno. Hitrosti metilacije Hg in demetilacije MMHg so bile izmerjene z radioaktivno označenim ^{203}Hg za metilacijo in $^{14}\text{C-MMHg}$ za demetilacijo. Določena sta bila raztopljeni Hg in MMHg kot tudi drugi geokemijski parametri, vključno z alkalnostjo in raztopljenimi NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , S^{2-} , Fe^{2+} in Mn^{2+} . Hitrosti redukcije sulfata so bile določene z uporabo radioaktivnega $^{35}\text{SO}_4^{2-}$. Metilacijsko in demetilacijsko aktivnost smo zlahka zaznali. Sedimenti iz zaliva vzorčeni tako v jesenskem kot v zimskem obdobju so kazali korelacijo med hitrostjo transformacij Hg in hitrostjo redukcije sulfata, z najvišjimi vrednostmi v površinskih plasteh sedimenta. V jeseni

so bile najvišje hitrosti večinoma izmerjene v najvišjih površinskih plasteh sedimenta, med tem ko so bile v zimskem obdobju najvišje hitrosti izmerjene v debelejšem površinskem sloju. Temperatura je opazno pozitivno vplivala na demetilacijo MMHg in redukcijo sulfata, ne pa toliko na metilacijo Hg. Demetilacija MMHg je primarno potekala po oksidativni poti ki je bolj značilna za reduktivna okolja in pri njej iz MMHg nastane CO₂, nastali Hg(II) pa se v ugodnih razmerah lahko ponovno metilira v MMHg. Za nadaljnje raziskave pretvorb živega srebra v sedimentih so bile konstante hitrosti reakcij pomnožene s koncentracijo posameznih Hg oblik, da so bile ocenjene resnične hitrosti pretvorb Hg. Hitrosti so bile izmerjene z upoštevanjem celotnih in raztopljenih Hg in MMHg, saj ni še znano kakšen delež v sedimentu prisotnega Hg izrabljajo metilirajoče in kakšen del demetilirajoče bakterije. Poleg tega so bile radioaktivno označene Hg vrste v dodatku najverjetneje boj biodostopne kot okoljski Hg, dodanega Hg(II) pa je bilo vedno občutno manj kot Hg_{tot}. Ugotovljeno je bilo da so izmerjene hitrosti ob uporabi Hg_{tot} več velikostnih razredov prevelike da bi jih lahko povezali z in situ koncentracijam MMHg. Hitrosti izmerjene z uporabo Hg_{tot} so bile visoke tudi v primerjavi s količinami MMHg prisotnimi v sedimentu. Ker izmerjene hitrosti demetilacije niso bile zadostne za razlago tolikšne razlike, smo sklepali, da je bil le majhen delež Hg_{tot} dostopen za metilacijo. Ko so bile za izračunavanje hitrosti metilacije uporabljeni podatki o Hg_{tot} v porni vodi, se je te dalo primerjati s koncentracijami MMHg v pornih vodah. Z globino povezane vrednosti metilacije pretvorjene za demetilacijo so bile podobne hitrostim toka MMHg izmerjenega v bližini vzorčnega mesta AA1. Od tu lahko zaključimo, da lahko Hg_{tot} v pornih vodah enačimo z biodostopnim Hg v sedimentu.

Primerjanje vzorčnih mest v estuariju (I 6) z mesti v zalivu (D6, AA1 in CZ), ki so morska nam omogoča razbrati osnovne dejavnike ki vplivajo na potek metilacije in demetilacije. Hitrosti metilacije se povečujejo od estuarija proti točkam v zalivu, medtem ko pri demetilaciji in redukciji suofata opazimo obraten trend. Enak trend se izraža tudi v razmerju MMHg/Hg_{tot}, ki se veča v smeri sredine zaliva. Ker je opaziti da je demetilacija povezana z redukcijo sulfata, lahko metilacijo najverjetneje pripisemo poleg sulfat reducirajočim tudi drugim bakterijam, na primer reducentom železa. To je v skladu z visokimi koncentracijami Fe v porni vodi, ki smo jih izmerili na mestu I 6. Poleg tega velike hitrosti redukcije sulfata na

mestu I 6 lahko vodijo do nastanka dovolj velikih količin sulfida, da se precejšen delež Hg veže kot HgS, kar se odraža v visoki vsebnosti TRS. Tako je Hg manj dostopen za metilacijo.

7.1 SUMMARY

The Idrija Mine, the second largest Hg mine in the world, was definitely closed in 1995, but still delivers large quantities of Hg downstream through the Idrijca, Bača and Soča rivers into the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea) about 100 km away (Fig. 4). Transformation of Hg species in sediment in the Soča river mouth was measured to determine the ability of the estuarine system to transform and mobilize Hg, and to produce and degrade MMHg (Figs. 5, 6). Cores from site ISO 6 in a stratified Soča estuary were sectioned anaerobically, and Hg methylation and MMHg demethylation activities measured using radio-labelled techniques with ^{203}Hg for methylation and ^{14}C -MMHg for demethylation. In addition, rates of sulphate reduction were determined in sediments using the $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ technique (Fig. 7). Dissolved Hg and MMHg pore waters were determined as well as other geochemical parametres including alkalinity and dissolved NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , S^{2-} , Fe and Mn (Fig. 8), and C_{org} , N_{tot} , S_{tot} (Fig. 9) and TRS in sediment solid phase (Fig. 10). Hg was readily methylated and MMHg demethylated. Marine sediments investigated in autumn and winter showed that both Hg transformation rates covaried with sulphate reduction rates with the highest values encountered in the surface layer. In autumn higher rates were mostly localized in the top surface layer whereas the winter rates were higher in a thick surface layer. The temperature had a clear positive effect on MMHg demethylation and sulphate reduction but less on Hg methylation. MMHg demethylation occurred primarily via the oxidative pathway, being more typical of reducing environments, producing CO_2 from MMHg. The Hg(II) produced can be remethylated to MMHg if conditions are appropriate. To further investigate the Hg transformations in sediment, the reaction rates constants were multiplied by the concentrations of Hg species to estimate the real Hg transformation rates. Rates were calculated using both

total and dissolved Hg and MMHg since it is not clear yet what proportion of the Hg present in sediment is utilized by methylating and demethylating bacteria. In addition, the Hg species present in the radiolabelled amendments were probably more bioavailable than ambient Hg species but, we the amended Hg(II) was always considerably less abundant than Hgtot. It was found that the rates using Hgtot. yielded values that appeared to be orders of magnitude too large to account for the in situ MMHg concentrations. Moreover, rates calculated using Hgtot. were high relative to the amount of MMHg present in sediment. Since the demethylation rates was not sufficient to account for this difference we assumed that only a very small fraction of the Hgtot. was available for methylation. When pore water Hgtot. data were used for calculating methylation rates, they were similar to pore water MMHg concentrations, and the depth integrated methylation values corrected for demethylation were similar to MMHg efflux rates measured at nearby site AA1. Hence, we can assume that pore water Hgtot. can be an appropriate approximation for bioavailable Hg in sediment.

Comparing the estuarine site ISO 6 with marine sites D6, AA1 and CZ in the Gulf of Trieste it is possible to decode the principal factors governing the methylation and demethylation reactions. The methylation rates (Fig. 12) increase from estuarine towards gulf sites while demethylation and sulphate reduction exhibit an opposite behaviour (Figs. 13, 14). This behaviour is reflected also in methylation/demethylation (Fig. 15) and MMHg/Hgtot. ratios (Fig. 16) increasing towards the centre of the gulf. It seems, therefore, while the demethylation seems to be linked to sulphate reduction, the methylation can be, in addition to sulphate reduction, also conducted by other bacteria perhaps Fe reducers. This could be indicated by higher pore water Fe concentrations observed at ISO 6. In addition, the high rates of sulphate reduction at ISO 6 may lead to pore water sulphide production sufficient to bind a significant portion of Hg as HgS, reflected in higher TRS contents, making it less available for methylation.

8 VIRI

- Allard B., Arsenie I. 1991. Abiotic reduction of mercury by humic substances in aquatic systems – an important process for the mercury cycle. *Water, Air and Soil Pollution*, 56: 457 – 464.
- Baldi F., Pepi M., Filipelli M. 1993. Methylmercury resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* strains in relation to methylmercury degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2479 – 2485.
- Bapu T.C., Purohit R.C., Sood P.P. 1994. Fluctuation of trace elements during methylmercury intoxication, and chelation therapy. *Human and Experimental Toxicology*, 13, 12: 815 – 823.
- Barkay T. 1987. Adaptation of aquatic microbial communities to Hg^{2+} stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2725 – 2732.
- Barkay T., Gillman M., Turner R.R. 1997. Effects of dissolved organic carbom and salinitiy on bioavailability of mercury. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4267 – 4271.
- Barkay T., Miller S.M., Summers A.O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 355 – 384.
- Barkay T., Wagner-Döbler I. 2005. Microbial transformations of mercury: potentials, challanges and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Advances in Applied Microbiology*, 57: 1 – 52.
- Beister H., Gosar M., Covelli S. 2000. Occurence and fractionation of mercury species from dumped mining residues in sediments of the Idrija mining area. *Environmental Science and Technology*, 34: 3330 – 3336.

Benoit J.M., Gilmour C.C., Mason R.P. 2001. The influence of sulfides on soil-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus*.

Environmental Science and Technology, 35: 127 – 132.

Benoit J.M., Gilmour C.C., Mason R.P., Heyes A. 1999. Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. Environmental Science and Technology, 33: 951 – 957.

Benoit J.M., Gilmour C.C., Mason R.P., Riedel G.S. 1998. Behavior of mercury in the Patuxent River estuary. Biogeochemistry, 40: 249 – 265.

Bloom N.S., Creelius E.A. 1983. Determination of mercury in seawater at subnanogram per liter levels. Marine Chemistry, 14: 49 – 59.

Brown N.L., Shih Y.C., Leang C., Glendinning K.J., Hobman J.L., Wilson J.R. 2002. Mercury transport and resistance. Biochemical Society Transactions, 30: 715 – 718.

Caldwell C.A., Canavan C.M., Bloom N.S. 2000. Potential effects of forest fire and storm flow in total mercury and methylmercury in sediments of arid-lands reservoir. Science of the Total Environment, 260: 125 – 133.

Champier L., Duarte V., Michaud-Soret I., Coves J. 2004. Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: A possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of *mer* operon. Molecular Microbiology, 52: 1475 – 1485.

Choi S.C., Bartha R. 1993. Cobalamin-mediated mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. Applied and Environmental Microbiology, 59: 290 – 295.

Choi S.C., Bartha R. 1994. Environmental factors affecting mercury methylation in estuarine sediments, 53: 805 – 812.

Compeau G.C., Bartha R. 1985. Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 498 – 502.

Compeau G.C., Bartha R. 1987. Effect of salinity on mercury-methylating activity of sulfate-reducing bacteria in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 265 – 265.

Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Brambati A. 1999. Porewater distribution and benthic flux measurements of mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 48: 415 – 428.

Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Brambati A. 2001. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Applied Geochemistry*, 16: 541 – 558.

Covelli S., 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., Piani R., Acquavita A., Predonzani S., Faganeli J. 2007. Transport and dispersion of particulate Hg associated with a river plume in coastal Northern Adriatic environments. *Marine Pollution Bulletin*, 55: 436-450.

Craig P.J. 1986. Occurrence and pathways of organometallic compounds in the environment – general considerations. V: Organometallic compounds in the environment: Principles and reactions. Craig P.J. (ed.). Harlow, Longman: 1 – 64.

Faganeli J., Horvat M., Covelli S., Fajon V., Logar M., Lipej L., Cermelj B. 2003. Mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *Science of the Total Environment*, 304: 315 – 326.

Fujiki M., Tajima S. 1992. The pollution of Minamata Bay by mercury. *Water Science and Technology*, 25: 133 – 140.

Furakawa K., Tonomura K. 1972. Induction of metallic mercury-releasing enzyme in mercury-resistant bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36: 2441 – 2448.

Geelen J.A., Dormans J. 1990. The early effects of methylmercury on developing rat brain. *Acta Neuropathologica*, 80: 432-438.

Gieskes J.M., Rogers W.C. 1973. Alkalinity determination in interstitial waters of marine sediments. *Journal of Sedimentary Research*, 43: 272-277.

Gillmour C.C., Henry E.A. 1991. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution*, 71: 131 – 169.

Granjean P., Weihe P., White R.F., Debes F. 1998. Cognitive performance of children prenatally exposed to ‘safe’ levels of methylmercury. *Environmental Research*, 77: 165-172.

Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. 1983. Methods of seawater analysis. Wenheim, Verlag Chemie: 419 - 419.

Guimaraes J.R.D., Malm O., Pfeiffer W.C. 1995. A simplified radiochemical technique for measurements of net mercury methylation rates in aquatic systems near gold mining areas, Amazon, Brazil. *Science of the Total Environment*, 175: 151 – 162.

Hansen J.C., Dasher G. 1997. Organic mercury: an environmental threat to the health of dietary exposed societies? *Reviews on Environmental Health*, 12, 2: 107 – 116.

Harada M., Nakachi S., Cheu T., Hamada H., Ono Y., Tsuda T., Yanagida K., Ohno H. 1999. Monitoring of mercury pollution in Tanzania: relation between head hair mercury and health. *Science of the Total Environment*, 227: 249 - 256.

Harada M., Nakachi S., Tasaka K., Sakashita S., Muta K., Yanagida K., Doi R., Kizaki T., Ohno H. 2001. Wide use of skin-lightening soap may cause mercury poisoning in Kenya. *Science of the Total Environment*, 269: 183 - 187.

Hedges, J.I., Keil, R.G. 1995. Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis. *Marine Chemistry*, 49: 81-115.

Hedges J.I., Stern J.H. 1984. Carbon and nitrogen determinations in carbonate-containing solids. *Limnology and Oceanography*, 29: 657 – 663.

Hines M.E., Lyons W.B. 1982. Biogeochemistry of nearshore Bermuda sediments. I. Sulfate reduction rates and nutrient generation. *Marine Ecology Progress Series*, 8: 87 – 94.

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

Hines M.E., Visscher P.T., Devereux R. 20002. Sulfur cycling. V: Manual of environmental microbiology. 2nd ed. Hurst C.J., Crawford R.L. (eds.). Washington, American Society for Microbiology Press: 427 – 438.

Hines M.E., Horvat M., Faganeli J., Bonzongo J.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., Adatto I., Horvat M. 2006. Microbial mercury transformations in marine, estuarine and freshwater sediment downstream of the Idria mercury mine, Slovenia. Applied Geochemistry, 21: 1924 – 1939.

Hopkinson, C.S., Buffam, I., Hobbie, J., Vallino, J., Perdue, M., Eversmeyer, B., Prahl, F., Covert, J., Hodson, R., Moran, M.A., Smith, E., Baross, R., Crump, B., Findlay, S., Foreman, K. 1998. Terrestrial inputs of organic matter to coastal ecosystems: an intercomparison of chemical characteristics and bioavailability. Biogeochemistry, 43: 211-234.

Horvat M., Bloom N.S., Liang L. 1993a. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples: part 1. Sediments. Analitica Chimica Acta, 281: 135 – 152.

Horvat M., Liang L., Bloom N.S. 1993b. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples: part 2. Water. Analitica Chimica Acta, 281: 153 – 168.

Horvat M., Covelli S., Faganeli J., Logar M., Mandic V., Rajar R., Sirca A., Zagar D. 1999. Mercury in contaminated coastal environments, a case study: the Gulf of Trieste. Science of the Total Environment, 238: 43 – 56.

Horvat M., Jereb V., Fajon V., Logar M., Kotnik M., Faganeli J., Hines M.E., Bonzongo J.J. 2002. Mercury distribution in water, sediment and soil in the Idrijca and Soča river systems. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*, 2: 287 – 296.

Horvat M., Nolde N., Fajon V., Jereb V., Logar M., Lojen S., Jacimovic R., Falonga I., Liya Q., Faganeli J., Drobne D. 2003. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *Science of the Total Environment*, 304: 231-256.

Horvat M. 2007. Meritve Hg_{tot} in $MeHg$ v porni vodi sedimenta s točke I 6 v estuariju Soče. Osebna komunikacija. Ljubljana, Institut "Jožef Stefan".

Hurley J.P., Watras C.J., Bloom N.S. 1991. Mercury cycling in a northern Wisconsin seepage lake: The role of particulate matter in vertical transport. *Water, Air and Soil Pollution*, 56: 543 – 551.

Kazantzis G. 2002. Mercury exposure and early effects: an overview. *Medicina del Lavoro*, 93: 139-147.

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: 2430 – 2437.

Kiyono M., Pan-Hou H. 1999. The *merG* gene product is involved in phenylmercuri resistance in *Pseudomonas* strain K-62. *Journal of Bacteriology*, 181: 726 – 730.

Kristensen, E. 2000. Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal amrine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrobiologia*, 426: 1-24.

Kudo A. 1992. Natural and artificial mercury decontamination – Ottawa River and Minamata Bay (Yatsushiro Sea). *Water Science and Technology*, 26: 217 – 226.

Kudo A., Mortimir D.C., Hart J.S. 1975. Factors influencing desorption of mercury from bed sediments. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 12: 1036 – 1040.

Lanka M., Panda K.K., Panda B.B. 1992. Monitoring and assessment og mercury pollution in the vicinity of chloralkali plant. Bioconcentration of mercury in situ aquatic and terrestrial plants at Ganjam, India. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22: 195-202.

Léonard A., Jacquet P., Lauwerys R.R. 1983. Mutagenicity and teratogenicity of mercury compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 114: 1-18.

Major E.B. 2001. Responses of macroinvertebrates to mercury in the Idrija River, Slovenia. RMZ –Materials and Geoenvironment = Materiali in geokolje, 48: 116 – 124.

Markovich D., James K.M. 1999. Heavy metals mercury, cadmium and chromium inhibit the activity of the mammalian liver and kidney sulfate transporter sat-1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154, 2: 181 – 187.

Marvin-DiPasquale M.C., Agee J., McGowan C., Oremland R.S., Thomas M., Krabbenhoft D., Gilmour C.C. 2000. Methylmercury degradation pathways: a comparison among three mercury-impacted ecosystems. *Environmental Science and Technology*, 34: 4908 – 4917.

Gilmour C.C., Riedel G.S. 1995. Measurements of Hg methylation in sediments using high specific activity ^{203}Hg and ambient incubation. *Water, Air and Soil Pollution*, 80: 747 – 756.

Mason R.P., Fitzgerald W.F. 1993. The distribution and biogeochemical cycling of mercury in the equatorial Pacific Ocean. Deep Sea Research, 40: 1897 – 1924.

Morel F.M.M., Kraepiel A.M.L., Amyot M. 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. Annual Review of Ecology and Systematics, 29: 543 – 566.

Nascimento A.M.A., Chartone-Souza E. 2003. Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. Genetics and Molecular Research – Online Journal, 2: 92 – 101.

http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0005_full_text.htm (december 2009).

Nicholson J.K., Kendall M.D., Osborn D. 1983. Cadmium and mercury nephrotoxicity. Nature, 304: 633-635.

Novick R.P., Roth C. 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 95: 1335 – 1342.

Ogrinc N., Faganeli J. 2006. Phosphorus regeneration and burial in near-shore marine sediments (the Gulf of Trieste, northerh Adriatic Sea). Estuarine, Coastal and Shelf Science, 67: 579-588.

Olivieri G., Novakovic M., Savaskan E., Meier F., Baysang G., Brockhaus M., Müller-Spahn F. 2002. The effect of β-estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cells during heavy metal induced oxidative stress, neurotoxicity and β-amylid secretion. Neuroscience, 113: 849-855.

Rice D., Barone Jr. S. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. Environmental Health Perspective, 108: 511-513.

Ridley W.P., Dizikes L.J., Wood J.M. 1977. Biomethylation of toxic elements in the environment. *Science*, 197: 329 – 332.

Sahlman L., Wung W., Powlowski J. 1997. A mercuric ion uptake role for the integral inner membrane protein, MerC, involved in bacterial mercuric ion resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 29518 – 29526.

Sellers P., Kelly C.A., Rudd J.W.M., MacHutchon A.R. 1996. Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature*, 380: 694 – 697.

Schiering N., Kabsch W., Moore M.J., Distefano M.D., Walsh C.T., Pai E.F. 1991. Structure of the detoxification catalyst mercuric ion reductase from *Bacillus* sp. strain RC607. *Nature*, 352: 168 – 172.

St-Amand L., Gagnon R., Packard T.T., Savenkoff C. 1999. Effects of inorganic mercury on the respiration and the swimming activity of shrimp larvae, *Pandalus borealis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122: 33-43.

Suda I., Suda M., Hirayama K. 1993. Degradation of methyl and ethyl mercury by singlet oxygen generated from sea water exposed to sunlight or ultraviolet light. *Archives of Toxicology*, 67: 365 – 368.

Ullrich S.M., Tanton T.W., Abrashitova S.A. 2001. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31: 241 – 293.

Viso, Y. 2004. Meccanismi di trasporto e dispersione del mercurio di provenienza isontina nel Golfo di Trieste. Trst, Universitá degli Studi di Trieste, Facoltá di Scienze Matematiche, Fisiche e naturali: 119 - 119.

Westphal G., Hallier E. 2003. Mercury in infants given vaccines containing thiomersal. Lancet, 361: 698 - 699 .

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.

Žižek S., Horvat M., Gibičar D., Fjon V., Toman M.J. 2007. Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining. Science of the Total Environment, 377: 407 – 415.

ZAHVALA

Moja zahvala velja v prvi vrsti mentorju prof. dr. Faganeliju, za nadzor in vodstvo pri pisanju te diplomske naloge, ter prof. dr Mark E. Hinesu in Isaacu za pomoč pri praktičnem delu.

Hvala staršema in teti za podporo v času študija.

Med vsemi prijatelji, ki so mi nudile tehnično, materialno in moralno oporo, pa se moram posebej zahvaliti Katarini, Klavdiji in Martini.

