

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maša VODOVNIK

**RAZVOJ BIOLOŠKEGA SENZORSKEGA SISTEMA ZA
ZAZNAVANJE ŽIVEGA SREBRA V VODI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL SENSOR SYSTEM FOR
MERCURY DETECTION IN WATER**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije.

Opravljen je bilo na Oddelku za znanosti o okolju Inštituta Jožef Stefan v Podgorici, na Inštitutu za fizikalno biologijo v Grosuplju ter na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Biotehniške fakultete v Domžalah.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 27.5. 2005 na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Romana Marinšek Logar, za somentorja dr. Alexis Zrimec in za recenzentko prof. dr. Ines Mandič Mulec.

Mentorica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Somentor: dr. Alexis ZRIMEC

Recenzentka: prof. dr. Ines MANDIČ MULEC

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. David STOPAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Članica:	prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član:	dr. Alexis ZRIMEC Inštitut za fizikalno biologijo, Grosuplje
Članica:	prof. dr. Ines MANDIČ MULEC Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: oktober 2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maša Vodovnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
UDK	543.62 : 546.49 : 579.26.083(043) = 863
KG	biološki senzorski sistemi/živo srebro/alge/fluorescenca/zakasnjena fluorescenca/pretvorbe živega srebra/atomska absorpcijska spektrofotometrija hladnih par/atomska fluorescenčna spektrofotometrija hladnih par
AV	VODOVNIK, Maša
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentor) / ZRIMEC, Alexis (somentor) / MANDIČ MULEC Ines (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	RAZVOJ BIOLOŠKEGA SENZORSKEGA SISTEMA ZA ZAZNAVANJE ŽIVEGA SREBRA V VODI
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XI, 71 str., 6 pregl., 30 sl., 100 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Živo srebro (Hg) je močan inhibitor fotosinteze pri mnogih fotosintetskih organizmih, zaradi česar so slednji lahko uporabni kot bioprepoznalni elementi v biosenzorskih sistemih za detekcijo Hg. V diplomskem delu smo z meritvami fotosintetskih odzivov [zakasnjene fluorescence (ZF) in fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m] na različne koncentracije Hg^{2+} preizkušali primernost treh vrst alg za uporabo v biosenzorskem sistemu. Največjo občutljivost in linearnost odziva v območju od 0,8 $\mu g/l$ do 200 $\mu g/l$ Hg^{2+} smo ugotovili pri vrsti <i>C. vulgaris</i> . Z metodo merjenja ZF smo pri koncentracijah Hg^{2+} 66,7 $\mu g/l$ in 200 $\mu g/l$ izmerili velik odziv tudi pri vrsti <i>O. tenuis</i> , intenzivnost zmanjšanja ZF pa kaže na potencialno večjo ločljivost potencialnega biosenzorskega sistema s to algo v ožjem koncentracijskem območju. Pri vrsti <i>S. subspicatus</i> nismo izmerili odziva pri nobeni od koncentracij, kar kaže na to, da vrsta ni primerna za uporabo v biosenzorskem sistemu. Med uporabljenima metodama detekcije, se je metoda merjenja ZF izkazala za občutljivejšo od metode merjenja fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m . V dodatnem poskusu smo ugotavljali vpliv vrste <i>C. vulgaris</i> na pretvorbe Hg v gojišču oziroma njegovo akumulacijo v biomasi alg. Tako po 10- kot po 20-urni inkubaciji alg z 1 $\mu g/l$ Hg^{2+} , smo v algah izmerili metil-Hg, pri čemer je bila izmerjena koncentracija po 10-urni inkubaciji 4,78 ng/g, pri daljši inkubaciji pa več kot trikrat višja (17,12 ng/g). Nasprotno je bila izmerjena koncentracija celokupnega Hg v biomasi po daljši inkubaciji manjša. Zaradi intenzivnosti spontane redukcije Hg^{2+} v gojišču, vloge alg pri tem procesu nismo mogli oceniti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
UDC 543.62 : 54.49 : 579.26.08 (043) = 863
CX biological sensor systems/mercury/algae/fluorescence/delayed
fluorescence/mercury transformations/cold vapour atomic absorption
spectrophotometry/cold vapour atomic fluorescence spectrophotometry
AU VODOVNIK, Maša
AA MARINŠEK LOGAR, Romana(supervisor)/ZRIMEC, Alexis (co-advisor)/
MANDIČ MULEC, Ines (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2006
TI DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL SENSOR SYSTEM FOR MERCURY
DETECTION IN WATER
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 71 p., 6 tab., 30 fig., 100 ref.
LA sl
AL sl/en
AB As mercury (Hg) is among the most toxic elements for living cells, contamination with this metal has been an important global concern for decades. As an alternative to chemical analytical methods used in monitoring of polluted ecosystems lately are being developed biosensor systems for measuring bioavailable Hg concentrations. One of the significant targets of mercury in photosynthetic cells is known to be photosystem II (PS II), therefore bioavailable fraction of Hg in the sample could be detected by changes in photosynthetic activity. In this work we investigated the photosynthetic response of three algal species, potential biorecognition elements in PS II based biosensor, to different concentrations of Hg^{2+} . By measuring fluorescence(F) and delayed fluorescence (DF) changes we found out, that from the three tested species, *C. vulgaris* turned out to be the most sensitive. Besides, the measured response was linear in concentration range from 0,8 to 200 $\mu\text{g/l}$. *O. tenuis* showed great sensitivity at concentrations equal to or higher than 66,7 $\mu\text{g/l}$, while *S. subspicatus* turned out to be insensitive to Hg^{2+} concentrations tested. Regarding the sensitivity of the applied detection methods, we found out that the DF measurements gave earlier response than measurements of the fluorescence parameters F_0 and F_m . In additional experiment we investigated a possible role of *C. vulgaris* in Hg^{2+} transformations and accumulation. Incubation of algal culture in media with 1 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 showed that the role of algae in Hg^{2+} reduction was not significant compared to the extent of spontaneously occurring reaction. In contrary, we observed its role in Hg methylation. After 10 hours of incubation, 4,78 ng/g of methyl-Hg was detected in algal biomass. The concentration was more than threefold higher when the incubation time was doubled. In contrary, the concentration of total Hg in biomass turned out to reduce after longer incubation time, which could be a consequence of tolerance mechanisms, developed by the algae.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KROŽENJE Hg IN VLOGA (MIKRO)ORGANIZMOV PRI NJEHOVIH PRETVORBAH	3
2.2 VPLIV ŽIVEGA SREBRA NA VIŠJE ORGANIZME IN POMEN OKOLJSKEGA MONITORINGA	5
2.3 KLASIČNE ANALITIČNE METODE ZA DETEKCIJO ŽIVEGA SREBRA	6
2.4 BIOSENZORSKE METODE ZA DETEKCIJO TEŽKIH KOVIN	7
2.4.1 Beljakovinski biosenzorji	7
2.4.2 Celični biosenzorji	9
2.4.2.1 Bakterijski biosenzorji	9
2.4.2.2 Biosenzorji na osnovi fotosistema II	11
2.5 OPIS POJAVA FLUORESCENCE IN MERITVE UČINKOVITOSTI FOTOSISTEMA Z METODO PAM FLUORIMETRIJE	12
2.6 OPIS POJAVA ZAKASNJENE FLUORESCENCE IN MEHANIZEM NJEHOVEGA NASTANKA	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 GOJENJE ALG	16
3.2 MERITVE TAKOJŠNJEGA FOTOSINTETSKEGA ODZIVA ALG OB IZPOSTAVITVI Hg ²⁺	17
3.3 ANALIZA VPLIVA ALGE VRSTE <i>C. vulgaris</i> NA PRETVORBE ŽIVEGA SREBRA V GOJIŠČU	21
3.3.1 Preliminarni poskus	21

3.3.2. Postavitev popolnega sistema za spremljanje pretvorb živega srebra	22
3.3.3 Analiza nastalega Hg^0 z atomsko fluorescenčno spektrometrijo hladnih par (AFS HP)	25
3.3.4 Predpriprava in shranjevanje vzorcev alg in gojišča	27
3.3.5 Priprava vzorcev in določanje celokupnega živega srebra (Hg-T) v gojišču in biomasi alg	27
3.3.6 Priprava vzorcev in določanje metilnega živega srebra (MeHg) v gojišču in biomasi alg	31
3.3.6.1 Priprava vzorcev in ekstrakcija MeHg iz biomase alg	31
3.3.6.2 Ekstrakcija MeHg iz gojišča	32
3.3.6.3 Etilacija, GC, AFS HP	32
3.3.7 Preverjanje pravilnosti analiznih postopkov	33
3.3.8 Ukrepi za preprečevanje kontaminacije vzorcev	34
 4 REZULTATI	 35
4.1 REZULTATI MERITEV TAKOJŠNJEGA FOTOSINTETSKEGA ODZIVA ALG OB DODATKU Hg^{2+}	35
4.1.1 Preliminarni poskus	35
4.1.1 Fotosintetski odziv vrste <i>C. vulgaris</i> po 15-minutni izpostavitvi koncentracijam $HgCl_2$ od 0,8 do 200 $\mu g/l$:	37
4.1.3 Primerjava hitrih fotosintetskih odzivov treh različnih alg	39
4.1.3.1 Primerjava jakosti zakasnjene fluorescence in fluorescence	39
4.1.3.2 Kinetične relaksacijske krivulje zakasnjene fluorescence	43
4.1.4 Spremljanje fluorescence in zakasnjene fluorescence v daljšem časovnem obdobju po izpostavitvi $HgCl_2$	45
4.1 REZULTATI ANALIZE VPLIVA ALGE <i>C. vulgaris</i> NA PRETVORBE Hg	47
4.1.1 Analiza dinamike redukcije Hg^{2+} v gojišču z algami ter vpliva gojišča na ta proces	47
4.1.2 Analiza celokupnega (Hg-T) in monometiliranega (MeHg) živega srebra v gojišču in algah	49
 5 RAZPRAVA IN SKLEPI	 52
6 POVZETEK	58
7 VIRI	60
 ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pregled nekaterih beljakovinskih biosenzorjev za zaznavanje težkih kovin (Castillo in sod., 2004).	8
Preglednica 2: Nekateri biosenzorji za težke kovine z gensko spremenjenimi bakterijami (Castillo in sod., 2004).	10
Preglednica 3: Sestava in način sterilizacije gojišča za sladkovodne alge <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> in <i>Oscillatoria tenuis</i> .	16
Preglednica 4: Izmerjene jakosti zakasnjene fluorescence v intervalu 0,02-1,02 s po osvetlitvi, ki je sledila 15-minutni izpostavitvi alg različnim koncentracijam HgCl ₂ .	39
Preglednica 5: Razporeditev celokupnega živega srebra.	49
Preglednica 6: Izmerjene mase MeHg v algah in gojiščih.	50

KAZALO SLIK

	<i>Str.</i>
Slika 1: Biogeokemijsko kroženje živega srebra (Barkay, 2003).	4
Slika 2: Shematski prikaz fotosintetske verige in toka elektronov pri zakasneni fluorescenci (Carpentier, 2004)	14
Slika 3: Shematski prikaz poteka poskusov in analiz.	15
Slika 4: Shematski prikaz postopka merjenja zakasnjene fluorescence in hiperbolične krivulje števila izmerjenih fotonov v odvisnosti od časa.	18
Slika 5: Shematski prikaz meritev fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m .	19
Slika 6: Sistem za inkubacijo <i>C. vulgaris</i> s Hg^{2+} .	22
Slika 7: Sistem za spremljanje pretvorb Hg v gojiščih s <i>C. vulgaris</i> in kontrolnih gojiščih pri prvem poskusu.	23
Slika 8: Shema ključnih korakov priprave vzorcev in meritev različnih zvrsti Hg, nastalih pri inkubaciji <i>C. vulgaris</i> in v kontrolnih gojiščih s $HgCl_2$.	24
Slika 9: Shema aparature za merjenje AFS HP (Horvat, 1989).	25
Slika 10: Shema aparature za AAS HP(Horvat, 1989; 1991)	29
Slika 11: Jakost zakasnjene fluorescence (ZF) v odvisnosti od koncentracije $HgCl_2$ pri različnih časih izpostavitve <i>C. vulgaris</i> .	35
Slika 12: Odvisnost fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m od koncentracije $HgCl_2$ po 15-minutni izpostavitvi <i>C. vulgaris</i> .	36
Slika 13: Odvisnost fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m od koncentracije $HgCl_2$ po 24-urni izpostavitvi <i>C. vulgaris</i> .	36
Slika 14: Jakost zakasnjene fluorescence v odvisnosti od koncentracije $HgCl_2$ pri 15-minutni izpostavitvi <i>C. vulgaris</i> .	37
Slika 15: Fluorescenčna parametra F_0 in F_m v odvisnosti od koncentracije $HgCl_2$ pri 15-minutni izpostavitvi <i>C. vulgaris</i> .	38
Slika 16: F_v/F_m v odvisnosti od koncentracije $HgCl_2$ pri 15-minutni izpostavitvi <i>C. vulgaris</i>	38

Slika 17:	Jakost zakasnjene fluorescence v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri vrstah <i>S. subspicatus</i> , <i>O. tenuis</i> in <i>C. vulgaris</i> .	40
Slika 18:	Parametra F_0 in F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri <i>C. vulgaris</i> .	41
Slika 19:	Parametra F_0 in F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri <i>O. tenuis</i> .	41
Slika 20:	Parametra F_0 in F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri <i>S. subspicatus</i> .	42
Slika 21:	Količnih fluorescenčnih parametrov F_v/F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri <i>S. subspicatus</i> , <i>O. tenuis</i> , <i>C. vulgaris</i> .	42
Slika 22:	Vpliv Hg^{2+} na relaksacijsko kinetiko zakasnjene fluorescence pri vrsti <i>C. vulgaris</i> .	43
Slika 23:	Vpliv Hg^{2+} na relaksacijsko kinetiko zakasnjene fluorescence pri vrsti <i>O. tenuis</i> .	44
Slika 24:	Vpliv Hg^{2+} na relaksacijsko kinetiko zakasnjene fluorescence pri vrsti <i>S. subspicatus</i> .	45
Slika 25:	Količnik jakosti zakasnjene fluorescence pri kulturi <i>C. vulgaris</i> , izpostavljeni koncentraciji Hg^{2+} $1\mu\text{g/l}$ v daljšem časovnem obdobju.	46
Slika 26:	Količnik F_v/F_m pri kulturi <i>C. vulgaris</i> , izpostavljeni koncentraciji Hg^{2+} $1\mu\text{g/l}$ v daljšem časovnem obdobju.	46
Slika 27:	Masa izmerjenega Hg^0 v zraku na izhodu iz gojišč z algami in kontrolnim gojiščem v odvisnosti od časa pri prvem poskusu.	47
Slika 28:	Masa izmerjenega Hg^0 v zraku na izhodu iz gojišč z algami in kontrolnim gojiščem v odvisnosti od časa pri drugem poskusu.	48
Slika 29:	Primerjava hitrosti nastajanja Hg^0 v deionizirani vodi (MilliQ), gojišču in vodi iz Idrije.	48
Slika 30:	Razporeditev MeHg med gojiščem in algami po 10-urni inkubaciji.	50
Slika 31:	Razporeditev MeHg med gojiščem in algami po 10-urni inkubaciji.	51

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAS (HP)	atomska absorpcijska spektrofotometrija (hladnih par)
AES	atomska emisijska spektrofotometrija
AFS (HP)	atomska fluorescenčna spektrofotometrija (hladnih par)
<i>C. vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
CRM	certificiran referenčni material
DMHg	dimetilirano živo srebro
EtHg	etilirano živo srebro
F ₀	parameter minimalne fluorescence
F _m	parameter maksimalne fluorescence
FS	fotosistem
GC	gass chromatography (plinska kromatografija)
Hg	živo srebro
Hg-T	celokupno živo srebro
HPLC	high pressure/performance liquid chromatography (visokotlačna tekočinska kromatografija)
ICP-MS	inductively coupled plasma-mass spectrometry (induktivno sklopljena plazma z masno spektrometrijo)
IJS	Inštitut Jožef Stefan
MeHg	metilirano živo srebro
<i>O. tenuis</i>	<i>Oscillatoria tenuis</i>
OEC	oxygen evolving complex (kisikov kompleks)
PAR	photosynthetically available/active radiation (fotosintetsko aktivna svetloba)
PheHg	fenil živo srebro
<i>S. subspicatus</i>	<i>Scenedesmus subspicatus</i>
ZF	zakasnjena fluorescenca

1 UVOD

Živo srebro (Hg) je element z atomsko maso 200,59 in spada poleg kadmija in cinka v II. stransko skupino periodnega sistema. Nahaja se lahko v treh oksidacijskih stanjih: 0, +1 in +2. V naravi je poleg elementarne oblike prisoten tudi v različnih anorganskih (HgS, HgCl₂...) in organskih (monometilmetil Hg (MeHg), dimetil Hg (DMHg), etil Hg (EtHg), fenil Hg (Phe Hg)) spojinah. Vse biodostopne oblike so za žive organizme strupene.

Živo srebro je globalni onesnaževalec, ki ga najdemo povsod po svetu v najrazličnejših ekosistemih. V splošnem velja, da sta tvorba in bioakumulacija metiliranega živega srebra najbolj žgoča okoljevarstvena težava območij, onesnaženih s to težko kovino. V Sloveniji je glavni vir emisije živega srebra v okolje rudnik živega srebra v Idriji, ki je obratoval več kot pol tisočletja. Do leta 1995 so iz njega pridobili več kot 100 000 ton tega elementa, približno 37 000 ton pa ga je ušlo v naravo ter se porazdelilo po bližnjih in tudi bolj oddaljenih ekosistemih (EUROCAT..., 2003). V njih se preko biogeno in abiogeno posredovanih reakcij spreminja v različne kemijske oblike ter kroži med vodo, tlemi in atmosfero.

Klasični pristopi sledenja obremenjenosti različnih ekosistemov z živim srebrom obsegajo predvsem kemijske analize metode ugotavljanja celokupnega in metilnega živega srebra v vzorcih vode, sedimentov ter organizmov različnih trofičnih nivojev vodnih in kopenskih prehranskih verig. V zadnjem času so se poleg slednjih začele v ta namen preizkušati tudi biološke metode. Te temeljijo na spremljanju specifičnih odzivov organizmov na fiziološkem ali genetskem nivoju, katerih prednost je zmožnost relativno hitre ocene količine biodostopnega, torej organizmom nevarnega živega srebra.

Med biološke metode zaznave prisotnosti strupenih snovi v okolju spada med drugim tudi uporaba biosenzorskih sistemov. To so sistemi za zaznavanje specifičnih kemijskih spojin preko biološkega odziva. V splošnem so sestavljeni iz treh delov: *občutljivega biološkega elementa*, ki je lahko v obliki posamezne molekule (encimi, receptorji, nukleinske kisline, protitelesa), celičnih organelov ali celotnih živih celic; *detektorja*, ki zaznava fizikalni ali kemijski odziv, nastal kot posledica interakcije molekul tarčne spojine z biološkim elementom in *prevajalnega elementa (transducerja)*, ki prevaja signal oziroma povezuje obe prej omenjeni sestavini. Večina do sedaj opisanih celičnih biosenzorskih sistemov za živo srebro vsebuje kot biološki zaznavni element bakterijske celice, medtem ko se uporaba alg v tovrstnih biosenzorjih še uveljavlja.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen naloge je bil preizkusiti občutljivost ter potencialno uporabnost treh sladkovodnih vrst alg za uporabo v biosenzorskem sistemu za zaznavanje živega srebra. Odziv alg na Hg^{2+} smo merili preko sprememb fotosintetskih parametrov izbranih alg, povezanih s pojavoma fluorescence *klorofila a* (F) in zakasnjene fluorescence (ZF) .

Dosedanji poskusi so pokazali relativno veliko občutljivost alg na kemijske spojine, ki inhibirajo transport elektronov v fotosistemu II (FS II). Med slednje spada tudi živo srebro, zato smo predpostavili, da bomo z meritvami fluorescence in zakasnjene fluorescence lahko zaznali prisotnost Hg^{2+} že pri relativno nizkih koncentracijah. Nadalje smo predpostavili, da bomo lahko zaznali razlike med fotosintetskimi odzivi različnih alg na dodane koncentracije Hg^{2+} in tako ugotovili občutljivost posamezne vrste alg. Slednja je eden ključnih dejavnikov, ki določajo primernost alge za uporabo v biosenzorskem sistemu.

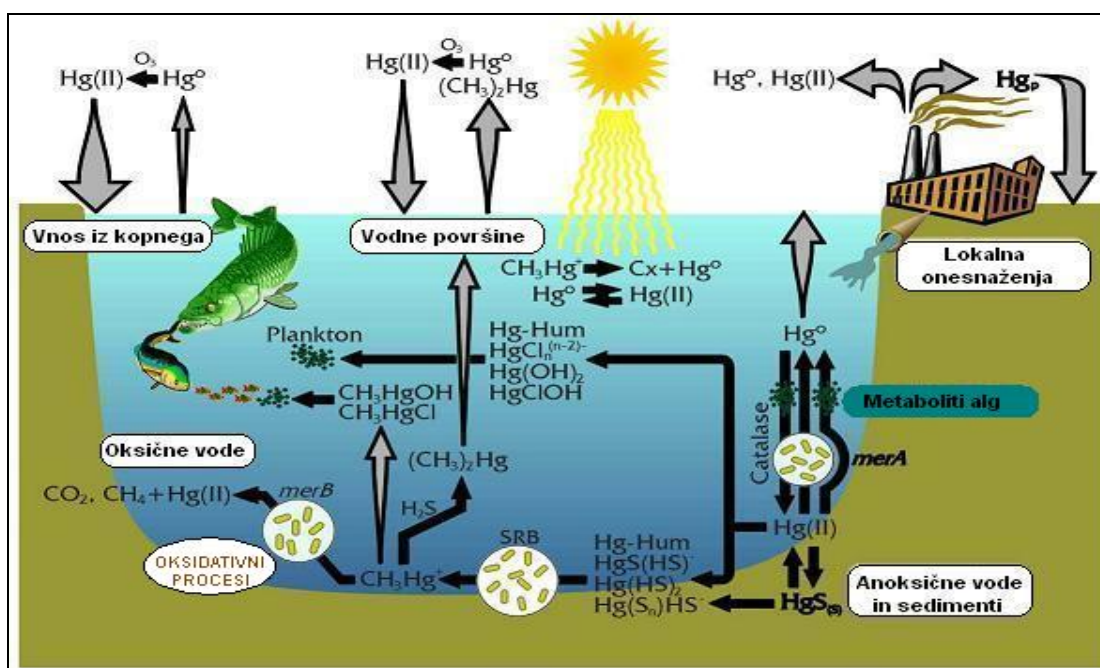
Znano je, da mnogi mikroorganizmi vplivajo na transformacije različnih težkih kovin. O povezavi med algami in nastankom različnih oblik živega srebra je v znanstveni literaturi le malo podatkov. V drugem delu naloge smo se zato odločili raziskati, kakšna je potencialna vloga alg vrste *Chlorella vulgaris* pri redukciji in metilaciji živega srebra ter v kolikšni meri ga akumulirajo v različnih časovnih obdobjih. Predpostavili smo, da bomo lahko zaznali vpliv alg na speciacijo živega srebra v gojišču ter da bo biomasa alg med inkubacijo privzela določen del celokupnega živega srebra (Hg-T).

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROŽENJE Hg IN VLOGA (MIKRO)ORGANIZMOV PRI NJEGOVIH PRETVORBAH

Kroženje živega srebra omogočajo abiogene in biogene reakcije oksidacije in redukcije ter metilacije in demetilacije, pri katerih nastajajo oblike z različno hlapnostjo, polarnostjo in nabojem. Omenjene lastnosti določajo njihovo porazdelitev med atmosfero, vodo, biotsko komponento in mineralnimi ter organskimi delci v tleh (*slika 1*).

Biogeokemijsko kroženje živega srebra v okolju je kompleksno in odvisno od mnogih fizikalnih, kemijskih in bioloških dejavnikov, ki vplivajo na lokalno stabilnost posameznih oblik Hg. V vodnih ekosistemih so ključnega pomena redoks potencial, pH in prisotnost snovi, s katerimi se Hg veže v komplekse (H_2S , huminske snovi) (Barkay in sod., 2003; Hines in sod., 2000).



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

Abiotiski procesi pretvorb vključujejo metilacijo Hg^{2+} (katalizirano s strani huminskih, fulvinskih ali karboksilnih kislin in metiliranih kositrovih spojin), kemijske in fotokemijske redoks reakcije (pretvorbe med Hg^0 in Hg^{2+}) ter fotolitsko razgradnjo MeHg (demetilacijo) (Weber, 1993; Falter, 1999; Sellers in sod., 1996; Cerrati in sod., 1992).

Pomemben prispevek pri kroženju Hg je posledica biotskih procesov. Še posebno dobro raziskana je vloga mikroorganizmov.

Pri mnogih bakterijah so tako ugotovili sposobnost metilacije Hg^{2+} , ki naj bi potekala v dveh korakih do hlapnega DMHg ($\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$). Pri tem procesu je kritična prva stopnja, ki je znatno hitrejša in vodi do nastanka bolj strupenega MeHg (HgCH_3^+). Mikroba metilacija poteka predvsem v anaerobnih rečnih, estuarijskih, ali morskih sedimentih. Ključno vlogo pri metilaciji v teh ekosistemih pripisujejo bakterijam iz skupine sulfatnih reducentov (Barkay in sod., 2003).

Druga pot mikrobne pretvorbe Hg^{2+} v hlapno obliko, je redukcija, ki jo lahko katalizirajo mikroorganizmi z encimom *Hg-reduktazo* (MerA). Poleg slednjega imajo nekateri mikrobi še dodaten encim, *organo-Hg-liazo* (MerB), ki katalizira cepitev vezi Hg-C in tako omogoča demetilacijo. Poleg zapisov za enega ali oba encima, imajo vse na Hg odporne bakterije še zapis za domnevni Hg transporter (MerT) ter regulatorno beljakovino (MerR). Vsi geni za odpornost so organizirani v *mer* operonu, ki se lahko nahaja na kromosomu, plazmidu ali transpozonu. Prepis *mer* operona inducira prisotnosti živega srebra v okolju (Barkay in sod., 2003).

Sposobnosti metilacije in redukcije Hg pa niso opazili le pri bakterijah, temveč tudi pri nekaterih glivah (Yannai in sod., 1991). Pongraz in Heumann (1997) sta ugotovila, da tudi nekatere vrste polarnih alg lahko proizvajajo znatne količine MeHg in DMHg. Razmerje med obema zvrstema je bilo specifično za posamezno vrsto alge.

2.2 VPLIV ŽIVEGA SREBRA NA VIŠJE ORGANIZME IN POMEN OKOLJSKEGA MONITORINGA

Vse živosrebrove spojine so za organizme strupene. Učinki živega srebra so v veliki meri odvisni od kemijske oblike, v kateri ta element nastopa v okolju, ter od kemijskih in fizikalnih lastnosti, ki določajo sposobnost interakcij določene oblike s spojinami v organizmu. Najbolj človeku nevarni obliki sta elementarno (Hg^0) in metilno živo srebro (MeHg).

Elementarno živo srebro (Hg^0) je pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju in tvori hlapne brezbarvne in vonjavne. Zanj je značilno, da je dobro topno v nepolarnih topilih in relativno slabo v polarnih, kar med drugim pomembno vpliva na njegovo porazdelitev v živih organizmih in mehanizme toksičnosti. Pri človeku prehaja v kri predvsem preko pljuč, se porazdeli po telesu ter lahko hitro prehaja maternično ter krvno-možgansko bariero (Hursch, 1985; Berlin, 1986).

Divalentna ionska oblika živega srebra (Hg^{2+}) je kemijsko zelo reaktivna oblika in tvori vezi z mnogimi organskimi in anorganskimi spojinami. Vzrok za strupenost te oblike živega srebra je velika afiniteta do nekaterih biološko aktivnih molekul, pri čemer so predvsem pomembne vse, ki vsebujejo $-\text{SH}$ in S-S skupine (Baldwin in Marshall, 1999).

Metilacija Hg^{2+} , vodi do nastanka organizmom najbolj toksične oblike živega srebra, CH_3Hg^+ (MeHg). Značilnost metilirane oblike je velika stabilnost in topnost v lipidih, zaradi česar se akumulira v organizmih v veliko večji meri kot anorganska oblika. Pojav, ki je povezan z bioakumulacijo živega srebra je biomagnifikacija, oziroma koncentriranje MeHg v organizmih na posameznih trofičnih nivojih prehranskih verig, katerih končni člen je pogosto tudi človek. Tako kot pri Hg^{2+} , se tudi toksični učinki MeHg povezujejo z njegovo afiniteto do $-\text{SH}$ in S-S skupin celičnih beljakovin. Posledica kovalentne vezave Hg^{2+} s temi skupinami je lahko inaktivacija encimov ali drugih, za celično delovanje pomembnih beljakovin. V primeru sinaptičnih živčnih celic je posebno pomembna vezava na membranske beljakovine, ki ima lahko za posledico spremembo v njeni propustnosti in povečano izločanje transmiterja v sinaptično špranjo, posledica česar so nevrotoksični učinki pri višjih organizmih. Živosrebrove spojine se lahko vežejo tudi na nukleinske kisline, vplivajo na njihovo sintezo in delujejo mutageno (EC Position paper..., 2001).

Zaradi dokazane velike strupenosti živega srebra je pomembno zagotavljati, da je njegova koncentracija v okolju čim nižja. Slednje še posebno velja za biodostopne oblike. Poleg ukrepov zmanjšanja emisij Hg, ki so posledica antropogene dejavnosti, je zelo pomembno tudi stalno spremljanje že obstoječih onesnaženih območij. V naravnih ekosistemih namreč prihaja do stalnega spreminjanja razmer, ki vplivajo na biogeokemijske transformacije Hg in tako na koncentracije biodostopnih oblik (Hintelmann in Wilken, 1994).

2.3 KLASIČNE ANALITSKE METODE ZA DETEKCIJO ŽIVEGA SREBRA

Med opisi klasičnih analitskih metod, ki se uporabljajo za zaznavanje in kvantifikacijo živega srebra, prevladujejo predvsem različice, ki temeljijo na končni spektrometrični ali elektrokemijski detekciji.

Med tovrstne metode za detekcijo živega srebra, spadajo takšne, ki temeljijo na principih atomske absorpcijske (Tong, 1978; Gill in Fitzgerald, 1978; Lee in sod., 1989; Horvat, 1996; Emteborg in sod., 1996) (AAS), emisijske (Nojiri in sod., 1986; Carlos de Andrade in Bueno, 1994; Jamoussi in sod., 1995) (AES) ali fluorescentne (Janjic in Kiurski, 1994; Cossa in sod., 1995; Liang in sod., 1994; Liang in sod., 1996) (AFS) spektrometrije in so pogosto sklopljene tudi s katero od kromatografij (HPLC, GC).

V zadnjih letih je bila, predvsem za študij speciacije Hg, pogosto uporabljena metoda induktivno sklopljene plazme z masno spektrometrijo (ICP-MS), ki med drugim omogoča tudi sledenje izotopsko označenih zvrsti Hg (Leemakers in sod., 2005).

Omenjene metode se ponašajo z veliko občutljivostjo in selektivnostjo, vendar so delovno zahtevne, za njihovo izvajanje pa je potrebna draga oprema, ki v splošnem ni primerna za analitiko na terenu.

Alternativa že omenjenim so elektrokemijske metode, ki pa jih redkeje uporabljajo za meritve Hg v okoljskih vzorcih (Bontidean in sod., 2004). Mednje spada uporaba ionsko selektivnih elektrod (Shatkin in sod., 1995) (ISE), različne metode z inverznimi (stripping) tehnikami (Turyan in Mandler, 1993; Wang in Tyan, 1993) ter nekatere druge.

2.4 BIOSENZORSKE METODE ZA DETEKCIJO TEŽKIH KOVIN

Potreba po selektivnih in občutljivih metodah, ki bi bile hkrati tudi hitre in poceni ter primerne za okoljski monitoring, je privedla do prvih poskusov razvoja biosenzorskih sistemov za zaznavanje težkih kovin.

Ena najpogostejše navedenih prednosti biosenzorskih pred klasičnimi metodami za detekcijo težkih kovin, je zmožnost neposredne zaznave biodostopne frakcije živega srebra. V nasprotju s kompleksiranimi in tako nedostopnimi kovinskimi ioni, se namreč za organizme dostopne oblike lahko vežejo na prepoznavno molekulo biosenzorja in sprožijo odziv (Castillo in sod., 2004).

2.4.1 Beljakovinski biosenzorji

V literaturi je opisano mnogo različnih biosenzorjev, ki za zaznavanje ionov težkih kovin neposredno izkoriščajo specifično reakcijo med izolirano beljakovino ter kovinskimi ioni. Kot bioprepoznavni elementi so bili že uporabljeni encimi (Zhylyak in sod., 1995; Preininger in Wolfbeis, 1996; Shekovtsova in sod., 1994), apoencimi (Satoh in sod., 1989, 1990, 1992), metalotionini (Bontidean in sod., 2000), fitokelatini (Hilpert in sod., 1989; Bontidean in sod., 2003), protitelesa (Khosraviani in sod., 1998) ter celice v celoti (Roberto in sod., 2002; Roda in sod., 2001; Ivask in sod., 2002). Slednji so bili sklopljeni z amperometričnimi (Preininger in Wolfbeis, 1996), konduktometričnimi (Zhylyak in sod., 1995), optičnimi (Durieau in Tran-Minh, 2002) in drugimi prevodnimi elementi (transducerji). Nekaj predstavnikov tovrstnih senzorjev in njihovih lastnosti je navedenih v *Preglednici 1* (Castillo in sod., 2004).

Za zaznavanje živega srebra so Bontidean in sod. (2000) kot biološki del senzorjev uporabili cianobakterijske metalotionine (SmtA) in Hg^{2+} vezavno regulatorno beljakovino MerR, ki sicer sodeluje pri izražanju bakterijskih genov odpornosti na živo srebro. Oba tipa beljakovin so imobilizirali na površino zlate elektrode in merili spremembe v kapacitivnosti ob vezavi kovinskih ionov. Na enakem principu zaznavanja kovinskih ionov temelji tudi biosenzor z imobiliziranimi fitokelatinskimi peptidi, ki so ga pripravili Bontidean in sod. (2003).

Mnogi od opisanih beljakovinskih biosenzorjev dosegajo precejšnjo občutljivost, vendar pa razen senzorja z regulatorno beljakovino MerR, nobeden od njih ni specifičen le za kovinske ione enega elementa. Rešitev te pomankljivosti bi morda lahko bila uporaba kombinacije odzivov, nastalih pri vzporednih meritvah z več različnimi senzorskimi sistemi. Tovrstne meritve koncentracije posameznih kovinskih ionov v kompleksnih vzorcih je trenutno še v fazi preizkušanja (Bontidean in sod., 2003).

Preglednica 1: Pregled nekaterih beljakovinskih biosenzorjev za zaznavanje težkih kovin (Castillo in sod., 2004). Z debelim tiskom so označeni biosenzorji za živo srebro.

Bioprepoznavni element		Prevajalni element (transducer)	Tarčni kovinski ioni	Razpon linearnega odziva	Viri:
Encim	ureaza	konduktometrični	Hg²⁺	1-50 μ M	Zhylyak in sod., 1995
			Cu ²⁺	2-100 μ M	
			Cd ²⁺	5-200 μ M	
			Pb ²⁺	20-500 μ M	
			Co ²⁺	10-500 μ M	
			Cu ²⁺	22-39 μ M	
Apoencim	ureaza	ampermetrični	Hg²⁺	3,9-5,6 μM	Preininger in Wolfbeis, 1996
			Zn ²⁺	2,8-3,9 mM	
			Pb ²⁺	5,6-19,6 mM	
	hrenova peroksidaza	spektrofotometrični	Hg²⁺	5,6-5000 mM	Shekovtsova in sod., 1994
	Alkalna fosfataza	spektrofotometrični	Co ²⁺	0,1-10 μ M	Satoh in sod., 1989, 1992
			Zn ²⁺	1-200 μ M	
Peptid	Askorbatna oksidaza	amperometrični	Cu ²⁺	0,5-2 μ M	Satoh in sod., 1990
	Apofitokelatin	UV-spektrofotometrični	Cd ²⁺	55,6-333,6 μ M	Hilpert in sod, 1989
		UV-spektrofotometrični	Cd ²⁺	55,6-444,8 μ M	Hilpert in sod, 1989
Protitelo	Protitelo proti Cd-EDTA kompleksu	spektrofotometrični	Cd ²⁺	0,5 -111 μ M	Khosraviani in sod., 1998

2.4.2 Celični biosenzorji

Celični biosenzorji kot prepoznavne elemente vsebujejo celice različnih mikroorganizmov. Najpogosteje opisani biosenzorji za zaznavanje težkih kovin vsebujejo kot prepoznavne elemente bakterijske celice, opisani pa so bili tudi že primeri uporabe kvasovk (Lehmann in sod., 2000), alg (Pandard in sod., 1993) in lišajev (Ramos in sod., 1993).

Prednosti uporabe celotnih celic v primerjavi z drugimi bioprepoznavnimi elementi je predvsem manjša občutljivost na merilne pogoje, saj so encimi in druge celične komponente v naravnem okolju. Poleg tega lahko v celičnih biosenzorjih potekajo sklopljene večstopenjske reakcije, saj so različni encimi ter reaktanti ustrezno blizu ter ločeni od okolja.

Slabost celičnih biosenzorjev je v mnogih primerih relativno nizka stopnja selektivnosti, kar bolj ali manj uspešno rešuje gensko prilagajane tarčnih sevov mikroorganizmov, ki so namenjeni uporabi v biosenzorskih sistemih (Castillo in sod., 2004).

2.4.2.1 Bakterijski biosenzorji

Za zaznavanje ionov težkih kovin, med drugim tudi živega srebra, je bilo pripravljenih precejšnje število biosenzorjev z rekombinantnimi bakterijskimi sevi, ki se med seboj razlikujejo po specifičnosti in občutljivosti (*Preglednica 2*). Specifičen odziv na molekule težkih kovin je dosežen s fuzijo promotorja, občutljivega na prisotnost tarčne kovine, z vnešenimi reporterskimi geni. Ob aktivaciji promotorja pride do izražanja reporterskih genov, pri čemer nastanejo beljakovine, ki posredno ali neposredno omogočijo nastanek zaznavnega signala, sorazmernega koncentraciji tarčnih ionov. Pogosto uporabljeni reporterski geni kodirajo encime, ki v ustreznih pogojih proizvedejo bioluminiscentni signal, luciferaze (*lux*, *luc*), ali β -galaktozidaze, katerih aktivnost je mogoče zaznati luminometrično ali kolorimetrično. Od neencimskih reporterskih molekul je najbolj znan zeleni fluorescentni protein (GFP), ki vsebuje kovalentno vezan fluorofor in zato ne potrebuje kofaktorjev ali substratov za oddajanje signala.

Preglednica 2: Nekateri biosenzorji za težke kovine z gensko spremenjenimi bakterijami (Castillo in sod., 2004). Z debelim tiskom so označeni biosenzorji za živo srebro.

Promotor/ reporterski gen	Vrsta gensko spremenjene bakterije	Tarčni kovinski ioni	Razpon linearnega odziva	Metoda zaznavanja signala	Viri
<i>arsR46/gfp</i>	<i>Escherichia coli</i>	As ³⁺	nM-μM	fluorescenčna	Roberto in sod., 2002
<i>arsR773/lacZ</i>	<i>Escherichia coli</i>	As ³⁺ , Sb ³⁺	μM-mM	kemiluminiscenčna	Ramanthan in sod., 1998
<i>Ars/luc</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	As ³⁺	fM-μM	bioluminiscenčna	Flyn in sod., 2002
<i>cad/luc</i>	<i>Streptococcus aureus</i>	Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Sb ²⁺	10 nM-10 μM	bioluminiscenčna	Tauriainen in sod., 1998
<i>chrB/luc</i>	<i>Ralstonia metallidurans</i>	CrO ₄ ²⁻ , Cr ₂ O ₇ ²⁻	33-330 nM	bioluminiscenčna	Ivask in sod., 2002
<i>cnrYXH/luxCDABE</i>	<i>Ralstonia metallidurans</i>	Ni ²⁺ , Co ²⁺	0,1-60 μM	bioluminiscenčna	Tibazarwa in sod., 2001
<i>copSRA/luxCDABE</i>	<i>Ralstonia metallidurans</i>	Cu ²⁺	9-400μM	bioluminiscenčna	Leth in sod., 2002
mer/luc	<i>Escherichia coli</i>	Hg²⁺	0,016-167 nM	bioluminiscenčna	Roda in sod., 2001
<i>pbr/luxCDABE</i>	<i>Ralstonia metallidurans</i>	Pb ²⁺	mM	bioluminiscenčna	Corbisier in sod., 1999
<i>zntR/luc</i>	<i>Escherichia coli</i>	Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺	nM-μM	bioluminiscenčna	Ivask in sod., 2002
<i>zntA/lacZ</i>	<i>Escherichia coli</i>	Cd ²⁺	0-10μM	elektrokemična	Biran in sod., 2000

2.4.2.2 Biosenzorji na osnovi fotosistema II

Poleg bakterijskih v skupino celičnih biosenzorjev spadajo tudi takšni, katerih bioprepoznavne elemente predstavljajo fotosintetsko aktivne celice alg ali cianobakterij. Tovrstni biosenzorji koncentracijo tarčnih molekul v splošnem zaznavajo preko sledenja njihovega vpliva na fotosintetsko aktivnost organizmov.

Fotosistem II (FS II) je kompleks beljakovinskih, pigmentnih ter nekaterih drugih organskih molekul, ki sestavlja prvi del fotosintetske verige oksigenih fototrofnih organizmov. Omogoča prenos elektronov iz molekule vode do molekul plastokinona (PQ), od koder preko *kompleksa citokrom b_6f* potujejo naprej na reakcijski center fotosistema I (*slika 2*). Prenos elektronov po fotosintetski verigi je sklopljen z črpanjem protonov v lumen kloroplasta, nastali elektrokemijski gradient pa predstavlja vir energije za sintezo molekul ATP. Tako kot ostali elementi fotosintetskega aparata, se tudi FS II nahaja pri evkariontih v kloroplastih, pri cianobakterijah pa na citoplazmatskih fotosintetskih membranah.

Cepitev vode in sproščanje kisika poteka na posebnem katalitičnem kompleksu (OEC, angl. oxygen evolving complex), tesno povezanim s FS II. V ciklični štiristopenjski reakciji (S_1 - S_4), pri kateri imajo ključno vlogo manganovi ioni, se elektroni posamično prenesejo od reakcijskega centra (molekula *klorofila a* z absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini 680 nm), preko feofitina na kinonske prenašalce (Q_A , Q_B).

Znano je, da FS II veže nekatere skupine herbicidov, težkih kovin in nekaterih drugih kemičnih spojin, ki nato vplivajo na njegovo delovanje. Slednje omogoča uporabo fotosintetskih organizmov ali izoliranih kloroplastov v biosenzorskih sistemih. Koncentracije biodostopnega deleža strupenih snovi, predvsem herbicidov, so tako že določali z elektrokemičnimi meritvami nastajajočega kisika, ali z meritvami fluorescence klorofila (Pandard in sod., 1993; Campanella in sod., 2000).

2.5 POJAV FLUORESCENCE KLOROFILA IN MERITVE UČINKOVITOSTI FOTOSISTEMA II Z METODO PAM FLUORIMETRIJE

Energija, ki se absorbira v fotosintetskih membranah, se sprošča na tri načine. Večina se uporabi v fotosintezi, del se odda v obliki toplote, približno 1-2 % pa se izseva v obliki svetlobnih fotonov ob vračanju elektronov klorofila *a* iz vzbujenega nazaj v osnovno stanje – ta pojav imenujemo fluorescenca. Glavni izvor fluorescence je fotosistem II oziroma pripadajoči antenski kompleks (Schreiber in sod., 1994).

Ko se svetloba absorbira v antenskem kompleksu fotosistema II, se ekscitacija preko resonančnega prenosa energije prenese na reakcijski center FS II. V primeru, da je kinon Q_A oksidiran, lahko pride do ločitve naboja in prenosa elektronov – pravimo, da je reakcijski center odprt in elektroni lahko stečejo po fotosintetski verigi. V primeru, da je Q_A reduciran (Q_A^-), ne more priti do ločitve nabojev (zaprt reakcijski center), energija pa se preko klorofilnih molekul v antenskem kompleksu izseva kot fluorescenca. Te lastnosti fotosistema II lahko izkoristimo za meritve njegove učinkovitosti z metodo fluorometrije PAM (PAM, ang. pulse amplitude modulation):

- pri rastlinah, ki so adaptirane na temo in v fotosintetski verigi nimajo elektronov, je večina reakcijskih centrov odprtih in lahko izmerimo minimalno fluorescenco, F_0
- po osvetlitvi rastlin z močnim pulzom svetlobe so fotosintetske verige zasičene z elektroni, zato je večina reakcijskih centrov zaprtih in lahko izmerimo maksimalno fluorescenco, F_m .

Razliko med F_0 in F_m imenujemo variabilna fluorescenca F_v . Razmerje F_v/F_m predstavlja potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema II. Zmanjšanje tega parametra kaže na poškodbe ustreznega deleža reakcijskih centrov (Schreiber in sod., 1995).

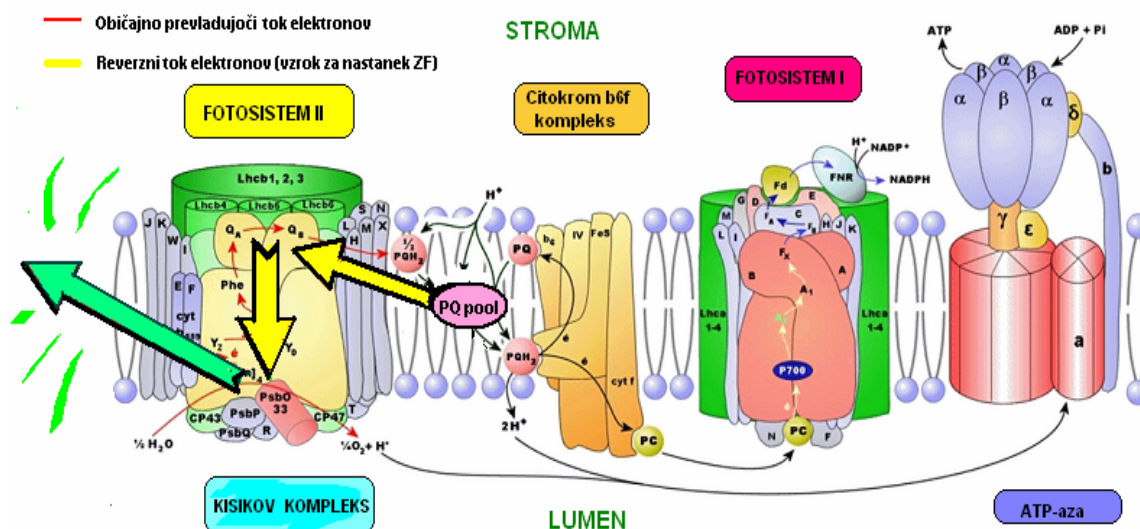
2.6 POJAV ZAKASNJENE FLUORESCENCE IN MEHANIZEM NJEGOVEGA NASTANKA

Zakasnjena fluorescenca (ali zakasnjena luminiscenca) je pojav dolgožive svetlobne emisije po kratkotrajni osvetlitvi rastlin in cianobakterij (Strehler in Arnold, 1951). Spektralna sestava svetlobe pri zakasnjeni fluorescenci se ujema s sevalnim spektrom klorofila *a* (Arnold in Davidson 1954; Van Wijk s sod., 1999; Hideg s sod., 1990) z močnejšim vrhom pri 690 in šibkejšim pri 730 nm.

Medtem ko običajno fluorescenco zaznamo v nanosekundnem časovnem območju, zakasnjena fluorescenca predstavlja emisijo v milisekundnem do sekundnem časovnem območju. Jakost zakasnjene fluorescenca je zelo majhna in zato zahteva uporabo primerne fotopomnoževalke za detekcijo svetlobe (Mieg s sod., 1992).

Vzrok za nastanek zakasnjene fluorescenca je v povratnih redoks reakcijah znotraj fotosistema II (*slika 2*). Med osvetlitvijo kloroplastov pride na FS II namreč do ločitve naboja, pri čemer je pozitiven naboj zbran na kisikovem kompleksu (OEC), negativni pa na kinonskih prenašalcih Q_A in Q_B , od koder se prenese naprej po fotosintetski verigi.

Po koncu osvetljevanja se določen del elektronov nahaja na prenašalcih med PS II in PS I. Ker reakcijski center PS I zaradi odsotnosti svetlobe ne more biti več vzbujen, pride pred drugim delom fotosintetske verige do blokade elektronskega transporta ter prerazporeditve naboja na razpoložljivih prenašalcih. Povečanje koncentracije reduciranih plastokinonov vodi do nastanka povratnega toka elektronov do kinonskih prenašalcev Q_B in Q_A . Slednja lahko ob sklopitvi s kisikovimi kompleksi PS II nanj preneseta energijo, kar omogoča ponovno vzbujenje reakcijskih centrov. Ob vračanju iz vzbujenega v osnovno stanje pride do fluorescenca, ki jo v tem primeru imenujemo zakasnjena fluorescenca (Jursinic, 1986; Rutherford in Inoue, 1984; Robinson in Crofts, 1983).



Slika 2: Shematski prikaz fotosintetske verige in toka elektronov pri zakasnjeni fluorescenci.
(Joly, 2004)

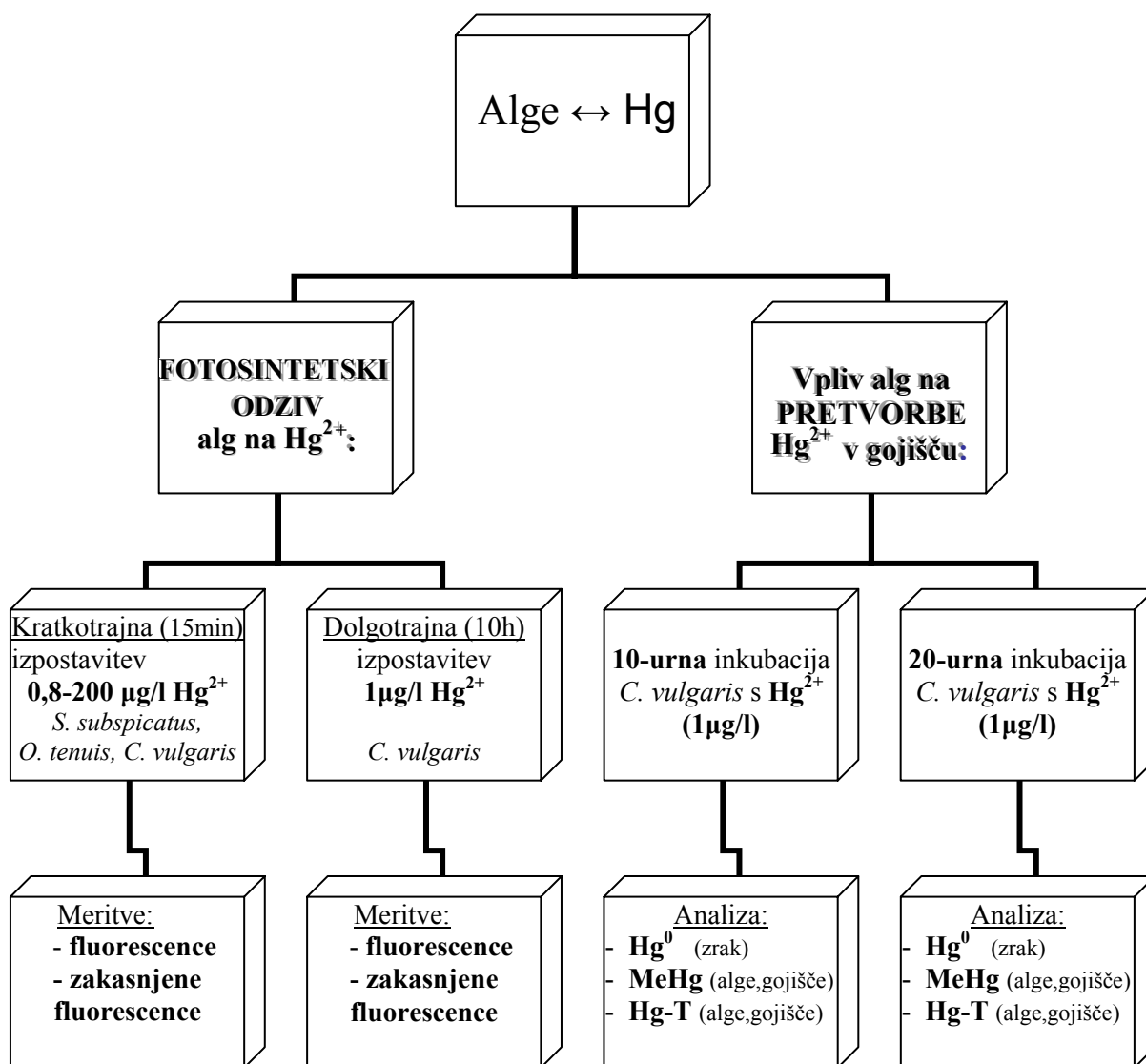
Relaksacijska kinetika zakasnjene fluorescence se dobro ujema s hiperbolično krivuljo:

$$I(t) = I_0 / (t - t_0)^m,$$

kjer predstavlja I jakost izsevane svetlobe, t je čas po osvetlitvi rastline, I_0 , t_0 in m pa so parametri krivulje (Ho s sod., 1998; Scordino s sod., 1996). V nekaterih primerih so ugotovili, da hiperbolični kinetiki v prvih nekaj sekundah sledi bolj ali manj izražen vrh (Milani in sod., 2003; Zrimec in sod., 2005). Sprememba oblike kinetične krivulje ob prisotnosti snovi, ki vplivajo na fotosintetske reakcije, lahko pokaže mesto delovanja te snovi na fotosistemu posamezne vrste alge (Prokowski in sod., 1993).

3 MATERIALI IN METODE

Laboratorijsko delo je zajemalo dva dela (*slika 3*). V prvem delu smo merili fotosintetski odziv na Hg^{2+} pri treh različnih algah, pri čemer smo ugotavljali primernost posamezne vrste za uporabo v biosenzorju ter primerjali občutljivost metod zakasnjene fluorescence in meritev fluorescenčnih parametrov (F_0 in F_m). V drugem delu smo ugotavljali vpliv alge *C. vulgaris* na pretvorbe Hg v gojišču. Natančnejšo shemo postopkov tega dela prikazuje *slika 8*.



Slika 3 : Shematski prikaz poteka poskusov in analiz.

3.1 GOJENJE ALG

Laboratorijske kulture sladkovodnih alg *Chlorella vulgaris* (sev: CCAP 211/11 B), *Scenedesmus subspicatus* (sev: CCAP 276/22) in *Oscillatoria tenuis* (sev: CCAP 1459/4) smo nacepili v sterilizirano mineralno gojišče (ISO 8692..., 2004), pripravljeno z deionizirano (MilliQ) vodo (sestava v *preglednici 3*). Steklenice, v katerih je bilo pripravljeno gojišče, smo očistili s 5% raztopino KMnO_4 v 0,5 M H_2SO_4 , da bi odstranili kakršnokoli obliko živega srebra, ki bi lahko predstavljala kontaminacijo pri kasnejših meritvah. Z avtoklaviranjem smo zagotovili sterilnost oziroma preprečili morebitne okužbe kultur z drugimi mikroorganizmi in virusi.

Preglednica 3: Sestava in način sterilizacije gojišča za sladkovodne alge *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* in *Oscillatoria tenuis*. Ustrezne koncentracije hranil v gojišču smo dosegli s pripravo koncentriranih založnih raztopin, ki smo jih nato zmešali v pravih razmerjih in razredčili do končne koncentracije v gojišču.

Založna raztopina:	Sestavina:	Koncentracija v gojišču:	Način sterilizacije:
1	NH_4Cl	15 mg/l	avtoklaviranje
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12 mg/l	
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18 mg/l	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15 mg/l	
	KH_2PO_4	1,6 mg/l	
2	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 $\mu\text{g/l}$	avtoklaviranje
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 $\mu\text{g/l}$	
3	H_3BO_3	185 $\mu\text{g/l}$	avtoklaviranje
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 $\mu\text{g/l}$	
	ZnCl_2	3 $\mu\text{g/l}$	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 $\mu\text{g/l}$	
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 $\mu\text{g/l}$	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 $\mu\text{g/l}$	
4	NaHCO_3	50 mg/l	filtracija

Alge so rastle v inkubatorju pri definiranih pogojih osvetlitve: 12 ur hladna fluorescentna svetloba ($35 \mu\text{mol fotonov m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 12 ur tema. Temperatura gojišča je bila $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Za poskuse smo uporabili alge v pozni eksponentni fazi (večinoma 6-10 dni od nacepitve, odvisno od hitrosti rasti posamezne vrste ter časovnega obsega eksperimenta).

3.2 MERITVE TAKOJŠNJEGA FOTOSINTETSKEGA ODZIVA ALG OB IZPOSTAVITVI Hg^{2+}

V prvi fazi smo z vrsto *C. vulgaris* naredili preliminarni test fotosintetskega odziva na dve višji koncentraciji Hg^{2+} (v obliki HgCl_2) v širšem razponu, 200 $\mu\text{g/l}$ ($1 \mu\text{M}$) in 20 $\mu\text{g/l}$ ($0,1 \mu\text{M}$). Na ta način smo dobili informacije o tem, v kakšnem koncentracijskem območju je smiselno pripraviti redčitveno vrsto ter o optimalnih časih in jakostih osvetlitve ter času temne adaptacije pred meritvami.

V naslednji fazi smo preiskusili odziv s celotno redčitveno vrsto. Prvič smo uporabili - enako kot v predposkusu - kulturo alg *C. vulgaris*, v drugi seriji poskusov pa smo poleg slednje preizkusili še odziv pri vrstah *O. tenuis* in *S. subspicatus*. Primerne gostote kultur alg smo določili s predhodnimi poskusnimi meritvami fluorescence.

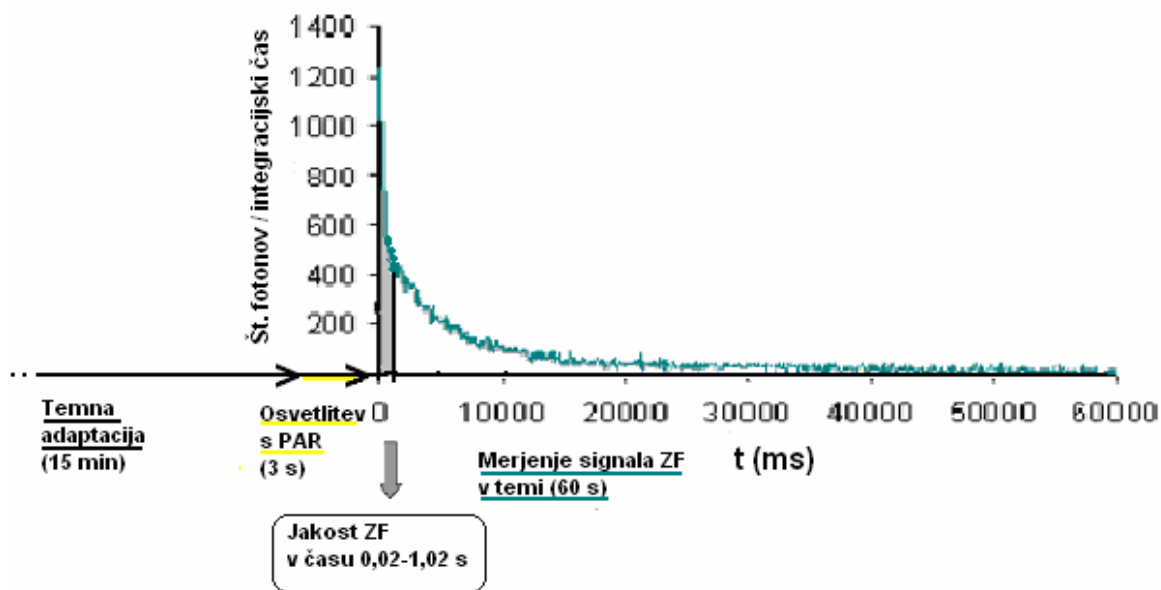
V plastičnih kivetah smo pripravili raztopine padajočih koncentracij HgCl_2 (geometrična redčitvena vrsta s faktorjem 3) ter čisto deionizirano vodo, ki je služila kot negativna kontrola. Pred začetkom meritev smo v 800 μl kulture alg dodali 200 μl posamezne raztopine HgCl_2 oziroma deionizirane vode tako, da so bile končne koncentracije Hg^{2+} v kivetah: 200 $\mu\text{g/l}$; 66,7 $\mu\text{g/l}$; 22,2 $\mu\text{g/l}$; 7,4 $\mu\text{g/l}$; 2,5 $\mu\text{g/l}$; 0,8 $\mu\text{g/l}$ in 0 $\mu\text{g/l}$. Tako pred meritvami zakasnjene fluorescence kot fluorescence smo kivete z algami v raztopinah različnih koncentracij Hg^{2+} adaptirali na temo.

Meritve zakasnjene fluorescence smo izvedli v luminometru (IFB, Slovenija), sestavljenem iz treh ključnih delov: komponente za osvetlitev, ki je vir fotonov za fotoekscitacijo (vzbujanje fotosistemov); termostatirane komore za kiveto z vzorcem ter svetlobnega detektorja. Kot vir osvetlitve smo uporabili 20 W halogensko žarnico. Komora za vzorčne kivete je bila med merjenjem regulirana na temperaturo $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Za detekcijo izsevanih fotonov, smo uporabili na rdečo svetlobo občutljivo fotopomnoževalko (PerkinElmer CPM Channel Photomultiplier C 1353 P), sledilo je preoblikovanje signala in zajem podatkov z merilno kartico (National Instruments DAQPad-6016) (Zrimec in sod., 2005).

Pred vsako meritvijo zakasnjene fluorescence smo izmerili signal ozadja, ki smo ga na koncu odšteli od izmerjene vrednosti zakasnjene fluorescence.

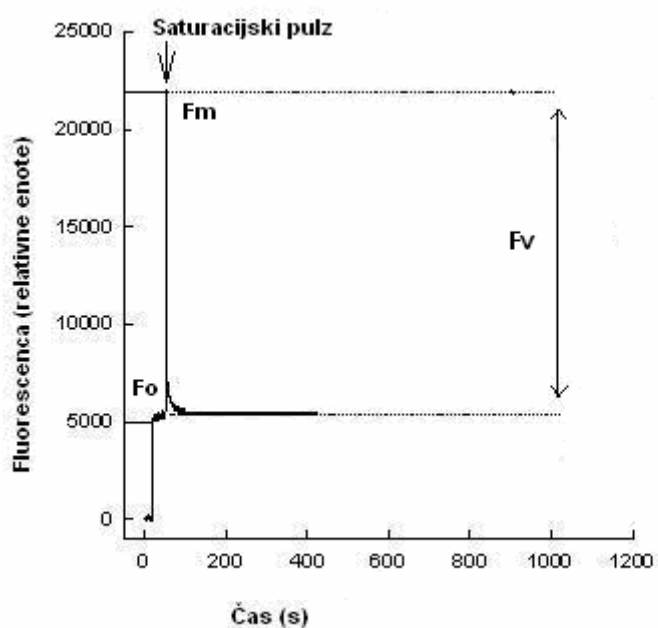
Kivete z vzorci smo po adaptaciji na temo v luminometru najprej osvetlili za 3 sekunde s fotosintetsko aktivno svetlobo (PAR) valovne dolžine 450 nm in intenzitete $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nato smo spremljali upadanje signala 0,02-60 sekund po osvetlitvenem pulzu z integracijskim časom 100 milisekund (Drinovec in sod., 2004). Integracijski čas je čas, v katerem detektor zbira fotonske signale, ki jih nato pretvori v enoten signal. Na krivulji je ta predstavljen kot posamezna točka. Shematski prikaz postopka prikazuje *slika 4*.

Jakost zakasnjene fluorescence predstavlja število zaznanih fotonov v določenem času oziroma površino pod relaksacijsko krivuljo. Izračunali smo jo kot vsoto fotonov, zaznanih v času med 0,02 s in 1,02 s po osvetlitvi vzorca.



Slika 4: Shematski prikaz postopka merjenja zakasnjene fluorescence in hiperbolične krivulje števila izmerjenih fotonov v odvisnosti od časa. Posamezna točka grafa predstavlja število fotonov, izmerjenih v intervalu 100 milisekund (integracijskem času). Jakost zakasnjene fluorescence predstavlja ploščino pod krivuljo (število zaznanih fotonov v določenem času, v našem primeru v prvi sekundi).

Fluorescenco klorofila alg po dodatku Hg^{2+} smo izmerili s fluorimetrom PAM (OS5-FL, Opti-Sciences) po navodilih proizvajalca pri sobni temperaturi. Po adaptaciji alg na temo fluorimeter pri šibki osvetlitvi najprej izmeri bazični nivo fluorescence (F_0). Sledi osvetlitev vzorcev z vzbujevalno svetlobo velike jakosti ($\lambda = 400\text{-}690\text{ nm}$), s čimer dosežemo nasičenje večine fotosintetskih centrov ter meritev maksimuma fluorescence (F_m) (slika 5).



Slika 5: Shematski prikaz meritev fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m .

Celoten postopek inkubacije s Hg in meritev smo izvedli v štirih ponovitvah.

Iz rezultatov posameznih ponovitev smo izračunali aritmetično sredino ter vzorčni standardni odklon od povprečne vrednosti. Domneve o razlikah med aritmetičnimi sredinami posameznih vzorcev smo preverili s *t-testom*.

t-statistike so bile izračunane po formuli, ki ne predpostavlja enakosti vzorčnih varianc:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - \delta_0}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \dots(1)$$

v kateri $\bar{x}_1$ in $\bar{x}_2$ predstavljata aritmetični sredini vzorcev; δ_0 razliko povprečij v ničelni domnevi (v našem primeru enaka 0), s_1^2 in s_2^2 vzorčni varianci, n_1 in n_2 pa velikosti vzorcev. Vse domneve smo preverjali pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$.

Izračune obeh opisnih statistik in *t-test* smo naredili v programu Microsoft Office Excel 2003.

3.3 ANALIZA VPLIVA ALGE VRSTE *C. vulgaris* NA PRETVORBE ŽIVEGA SREBRA V GOJIŠČU

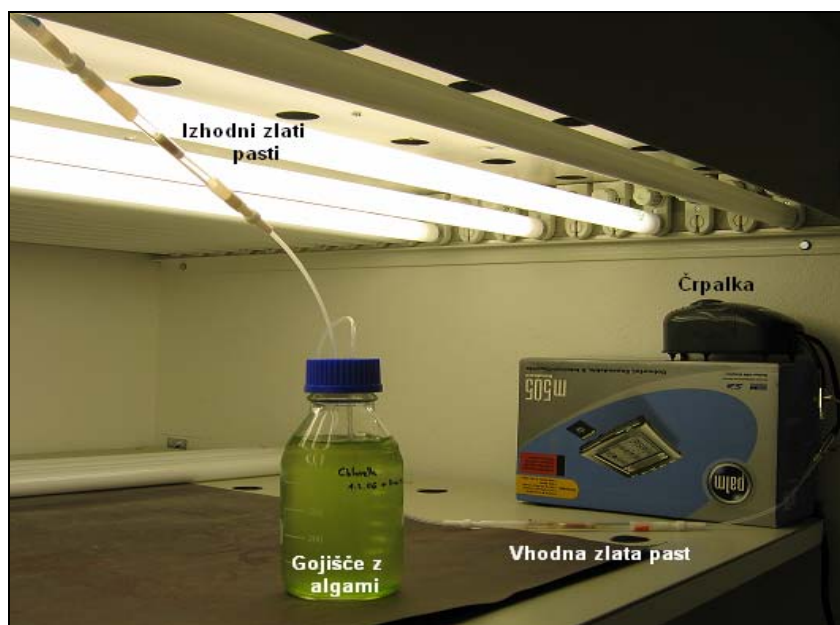
3.3.1 Preliminarni poskus

Ker tovrstni poskus še ni bil opisan v literaturi, postopki analize pa so časovno in cenovno zahtevni, smo se odločili pred večjim poskusom približno oceniti količine različnih zvrsti živega srebra, ki nastanejo po večurni inkubaciji alg s Hg^{2+} (v obliki HgCl_2). Dobljene informacije so nam koristile za kasnejšo prilagoditev sistema in optimizacijo meritev.

Sistem za inkubacijo alg s Hg^{2+} je bil v preliminarnem poskusu sestavljen iz 500 ml steklenice s 6 dni staro kulturo *C. vulgaris*, v katero sta bili skozi pokrov napeljani teflonski cevki za prepihanje z zrakom (slika 6). Tega je iz vhodne smeri poganjala črpalka, pretok pa smo naravnali z manometrom, tako da je bil zračni tlak v cevkah 65 mmHg. Na izhodu iz gojišča smo na teflonsko cevko pritrdili zaporedno dve zlati pasti. Na slednjih se preko procesa amalgamacije ujame nastali plinasti Hg^0 (deamalgamacijo oziroma sproščanja ujetega Hg^0 nato kontrolirano dosežemo s segrevanjem pasti na 500-600°C tik pred meritvami (Fitzgerald in Gill, 1979)). Tudi pred vhomom v gojišče, za manometrom in črpalko, smo namestili zlato past, v tem primeru z namenom preprečevanja kontaminacije preko vhodnega zraka.

Pred dodatkom Hg^{2+} (v obliki HgCl_2) v gojišče smo tega eno uro prepihovali, da bi preverili ali tudi samo po sebi predstavlja vir Hg. Prav tako smo s prepiranjem preverili manometer in črpalko.

V drugi fazi smo v gojišče z algami dodali Hg^{2+} tako, da je bila končna koncentracija v gojišču 1 µg/l ter sistem prepihovali vsega skupaj 20 ur, pri čemer smo zlate pasti na izhodu iz gojišča menjavali na približno 2 uri. Po odvzemu in analizi zadnjih zlatih pasti smo gojišče z algami prefiltrirali ter vzorce alg in gojišča pripravili za analize celokupnega (Hg-T) in metilnega (MeHg) živega srebra po postopkih, ki so opisani v poglavjih 3.3.4 do 3.3.6.



Slika 6: Sistem za inkubacijo *C. vulgaris* s Hg^{2+} . Vhodna zlata past je služila preprečevanju vnosa Hg^0 iz okoljskega zraka oziroma črpalke v gojišče. Na izhodni zlati pasti smo lovili Hg^0 , ki je nastal z redukcijo v gojišču.

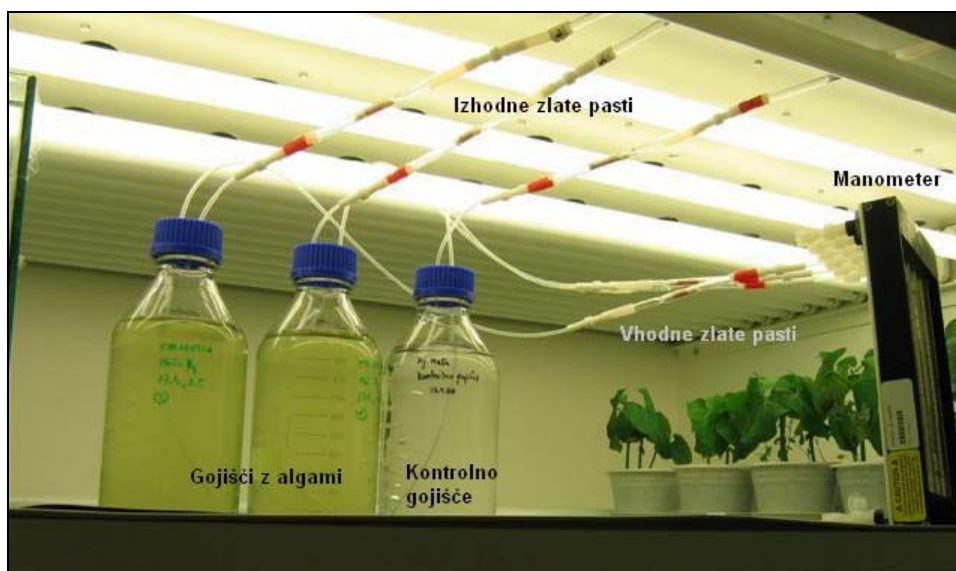
3.3.2. Postavitev sistema za spremljanje pretvorb živega srebra

V nadaljnjih dveh poskusih je bila postavitve sistema enaka kot v preliminarjem poskusu, le da so bile celice *C. vulgaris* nacepljene paralelno v dve enolitrski steklenici, poleg tega pa smo kot kontrolo abiotskih reakcij transformacij živega srebra uporabili še tretjo steklenico s samim gojiščem (slika 7). V vse tri steklenice smo sočasno dodali Hg^{2+} do koncentracije 1 $\mu\text{g/l}$ ter zagotovili, da so bile ves čas inkubacije izpostavljene enakim razmeram.

V prvem poskusu smo alge izpostavili Hg^{2+} enako kot v preliminarjem poskusu za približno 20 ur. Zlate pasti smo menjavali ter analizirali količino ujetega Hg^0 (po postopku v poglavju 3.3.1) prvih 8 ur na približno dve uri, zadnje pasti pa smo pustili preko noči (11 ur).

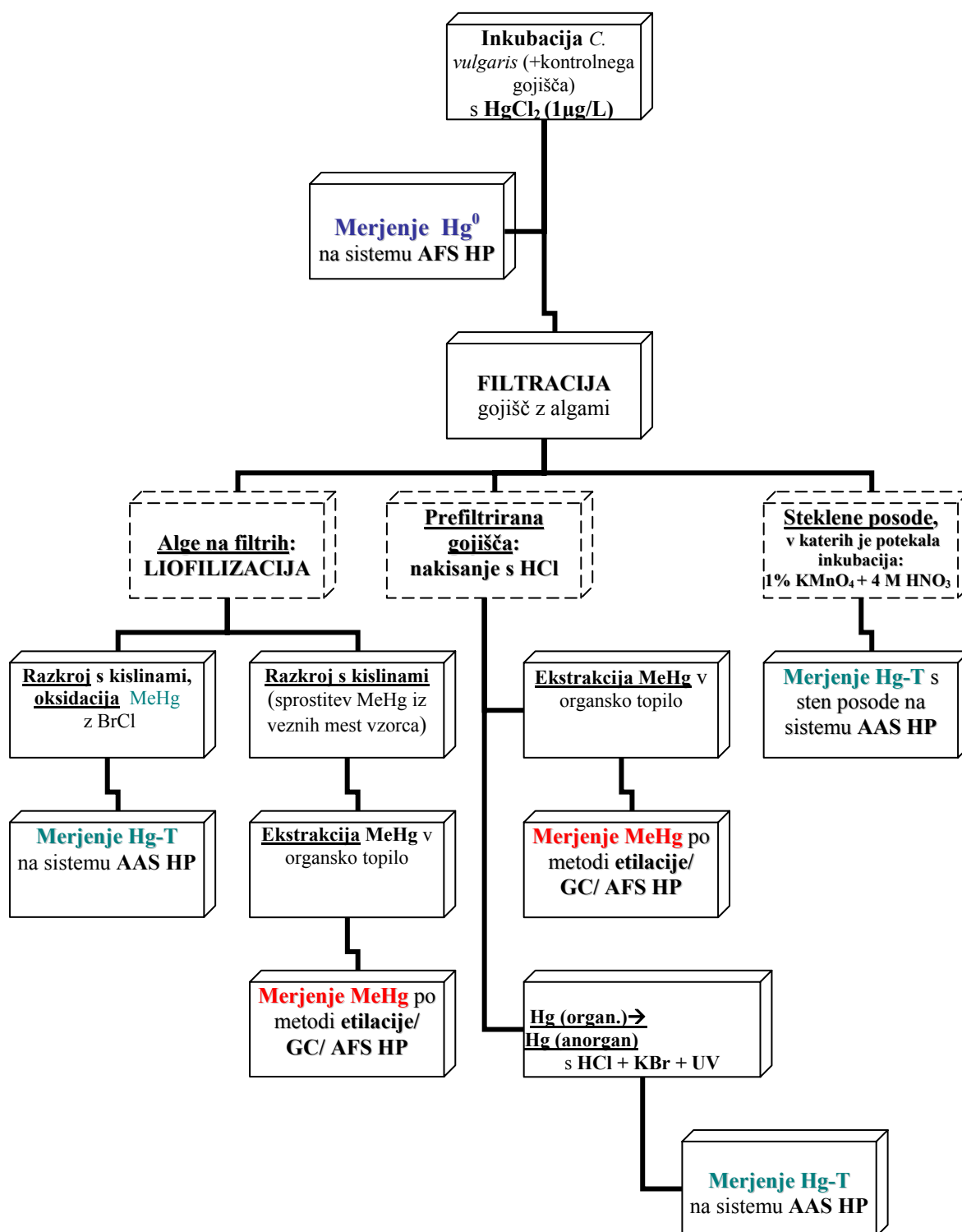
V naslednji seriji je poskus potekal po enakem postopku, le da smo alge izpostavili Hg^{2+} le za približno 10 ur. Dodatno smo poleg treh steklenic, namenjenih meritvam speciacije živega srebra, pri enakih pogojih inkubirali še dve steklenici z algami (od katerih je ena predstavljala negativno kontrolo brez Hg^{2+} - za sočasno spremljanje fotosintetskega odziva na dodani Hg^{2+}).

Na koncu smo želeli preveriti še, kakšen je potencialni vpliv gojišča na pretvorbo Hg^{2+} v Hg^0 v primerjavi z deionizirano vodo (Milli Q) in filtrirano vodo iz Idrije, zato smo v treh steklenicah sočasno dodali enako količino Hg^{2+} kot pri prejšnjih poskusih ter na zlate pasti 8 ur po enakem postopku lovili nastali Hg^0 .



Slika 7: Sistem za spremljanje pretvorb Hg v gojiščih s *C. vulgaris* in kontrolnih gojiščih pri prvem poskusu. V drugem poskusu je bila postavitev enaka, le da smo dodali še eno dodatno gojišče z algami in eno kontrolno, ki sta služili za sočasne meritve fotosintetskega odziva.

Ključne korake celotnega poskusa in analize živosrebrovih zvrsti, nastalih v gojiščih z algami oziroma kontrolnih gojiščih, prikazuje slika 8.

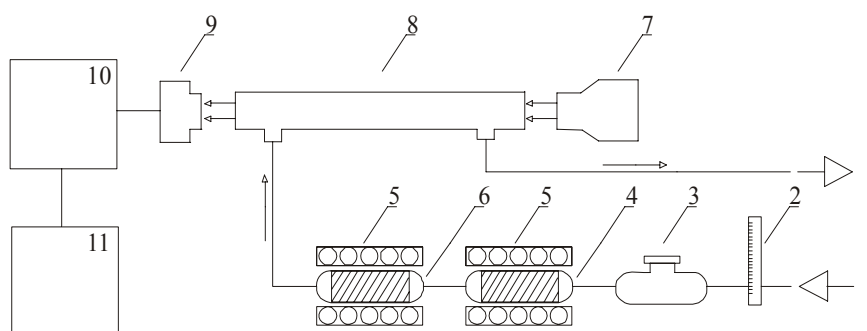


Slika 8: Shema ključnih korakov priprave vzorcev in meritev različnih zvrsti Hg, nastalih pri inkubaciji *C. vulgaris* in v kontrolnih gojiščih s HgCl₂.

3.3.3 Analiza nastalega Hg^0 z atomsko fluorescenčno spektrometrijo hladnih par (AFS HP)

Nastali Hg^0 ki se je med preprihovanjem gojišč z algami, samih gojišč, deionizirane vode, oziroma vode iz Idrijece ujel na zlate pasti, smo analizirali v najkrajšem možnem času (manj kot eno uro po menjavi), do analize pa so bile vse pasti zaprte s teflonskimi zamaški, s čimer smo preprečili kontaminacije.

Pasti smo analizirali po redukcijsko-amalgamacijski metodi s sistemom dvojnega amalgamiranja (*slika 9*). Postopek je sledeč: zlata past, na kateri se je ulovil Hg^0 pri poskusu in je nameščena na sistem tik pred meritvijo, se najprej segreje na temperaturo 500-600°C, pri kateri poteče deamalgamacija. Sproščeni Hg^0 nato s tokom inertnega plina potuje do druge, permanentne zlate pasti, na kateri poteče vnovična amalgamacija. Sledi druga termična deamalgamacija, s permanentne zlate pasti sproščeni Hg^0 pa nato potuje v merilno celico UV-detektorja. Tu se atomi Hg^0 vzbujajo s svetlobo valovne dolžine 253,7 nm, ki jo oddaja nizkotlačna Hg žarnica. Vzbujeni atomi se po nekaj nanosekundah vrnejo nazaj v osnovno stanje, pri čemer oddajo odvečno energijo v obliki fotonov, ki jih zazna detektor (Fitzgerald in Gill, 1979; Bloom in Fitzgerald, 1988).



- | | |
|-------------------------|--------------------|
| 1 – nosilni plin | 7 – Hg žarnica |
| 2 – merilec pretoka | 8 – merilna kiveta |
| 3 – teflonska septa | 9 – detektor |
| 4 – vzorčevalna past | 10 – ojačevalnik |
| 5 – električni peči | 11 – rekorder |
| 6 – permanentna Au-past | |

Slika 9: Shema aparature za merjenje AFS HP.
(Horvat, 1989)

Pred začetkom merjenja je potrebno instrument umeriti, kar poteka preko vbrizganja znane količine Hg^0 pare skozi teflonski septum nad prvo prežarjeno zlato pasto.

Količino Hg^0 , ujetega na zlati pasti izračunamo po *enačbi 2* (vir: *IJS*).

$$m(\text{pg}) = \frac{(h_{\text{vz}} - h_0) \cdot m_{\text{std}}}{(h_{\text{std}} - h_0)} \quad \dots (2)$$

h_{vz} – višina vzorčnega signala

h_{std} – višina signala vbrizganega standarda (Hg para)

h_0 – višina signala ozadja merilnega sistema

m_{std} – masa vbrizganega Hg standarda (pg)

Pomanjkljivost določanja Hg s sistemom dvojnega amalgamiranja je, da meritev ni možno ponoviti. Zato je zlasti potrebna previdnost pri kalibraciji sistema. Ker se višina signala tekom dneva spreminja zaradi nihanja napetosti v omrežju, smo standardne volumne živosrebrove pare merili po vsaki vzorčni zlati pasti dvakrat. Ozadje merilnega sistema smo merili s segrevanjem permanentne zlate pasti brez vstavljene vzorčne pasti.

3.3.4 Predpriprava in shranjevanje vzorcev alg in gojišča

V vsaki poskusni seriji smo gojišča z algami po končani inkubaciji najprej prefiltrirali (filtri 0,45 μm ; Millipore). Za kontrolo prisotnosti živega srebra na filtrih smo izvedli tudi filtracijo čiste MilliQ vode, pri čemer smo uporabljene filtre nato uporabili za kontrolo pri meritvah Hg-T in MeHg v biomasi na filtrih, vodni filtrat pa pri analizah prefiltriranih gojišč.

Filtre z biomaso alg smo nato zamrznili v tekočem dušiku in liofilizirali pri temperaturi -50°C in tlaku 1,5 Pa. Po liofilizaciji smo jih do meritev shranili v plastičnih vrečkah v zamrzovalniku (Horvat in Bryne, 1992). Maso liofiliziranih alg smo določili iz razlike v teži filtra pred in po filtraciji ter liofilizaciji. Prefiltrirano gojišče smo nakisali s HCl do 1% koncentracije ter jih v teflonskih posodah shranili v hladilniku do analize v naslednjih dneh (Horvat, 1996).

V steklenicah za inkubiracijo alg s Hg (in eni čisti kontrolni steklenici), smo pripravili raztopino 1% KMnO_4 + 4M HNO_3 za vezavo Hg s sten posod ter jih večkrat dobro pretresli. Količino vezanega Hg-T smo nato izmerili na sistemu AAS HP in nam je služila pri pripravi masne bilance celokupnega živega srebra v gojišču po inkubaciji. Razlika med količino HgCl_2 , ki je bilo v začetku dodano v gojišča in vsoto Hg-T, izmerjenega v algah, gojišču in na stenah posode nam je dala informacijo o izgubah Hg zaradi procesov priprave vzorcev na analize (izgube biomase pri filtraciji...) ter izhlapevanja.

3.3.5 Priprava vzorcev in meritve celokupnega živega srebra v gojišču in biomasi alg

Celokupno živo srebro v vzorcih biomase alg in gojišča smo določali po metodi atomske absorpcijske spektrofotometrije hladnih par (AAS HP) in kombinacijo redukcijsko - amalgamacijske tehnike. Vpeljali in validirali so jo na Inštitutu Jožef Stefan (Horvat, 1989, 1991). Določanje Hg-T v vzorcih gojišča smo izvedli po metodi AAS HP, prilagojeni za analizo vodnih vzorcev (Gill in Fitzgerald, 1987).

Liofolizirano biomaso alg na filtrih smo pred merjenjem najprej v steklenih bučkah razkrojili s kombinacijo kislin (3ml HNO_3 , 1ml HClO_4 , 5ml H_2SO_4 ; 1h na sobni temperaturi, 20 min na 200°C), s čimer smo dosegli sprostitve vseh oblik živega srebra v raztopino. V naslednjem koraku smo s kislinami razkrojeni vzorec razredčili z deionizirano vodo in dodali 1ml BrCl , katerega namen je oksidacija stabilnega MeHg. Poleg vzorcev alg smo po enakem postopku razkrojili tudi 2 vzorca s certificiranim referenčnim materialom (CRM), za

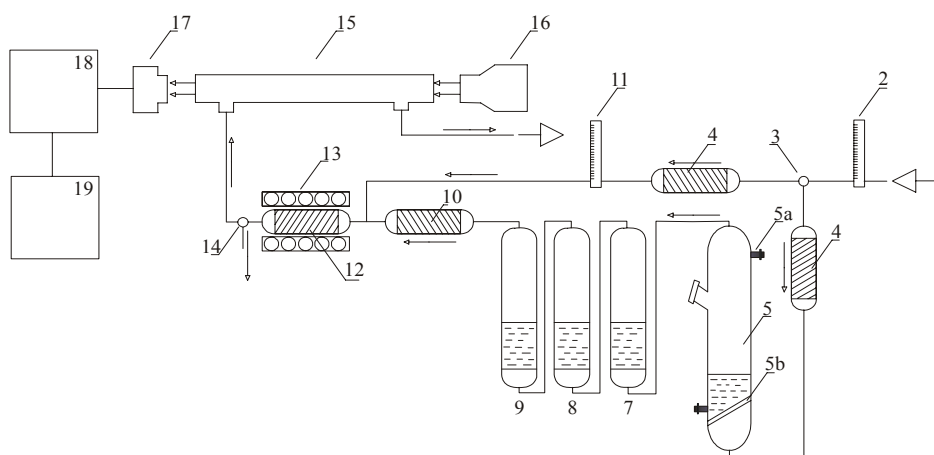
katerega je znana vsebnost Hg-T in nam je tako kasneje pri meritvah služil za preverjanje učinkovitosti razkroja oziroma celotnega postopka priprave materiala na analizo. Poleg referenčnega materiala smo pri vsaki seriji paralelno z vzorci po enakem postopku pripravili tudi dve kontroli prisotnosti Hg na filterjih ter eno kontrolo s samimi reagenti, da bi v primeru zaznane kontaminacije lahko sklepali, na kateri stopnji se je ta zgodila. Tako pripravljene vzorce smo pustili stati 3 do 4 dni, saj so poskusne meritve CRM pokazale, da po krajšem času še ni prišlo do ustreznega razkroja.

Pretvorbo organskega živega srebra v anorgansko v vzorcih gojišč smo dosegli z dodatkom HCl (0,5ml/100ml gojišča) in BrCl (1ml/100ml gojišča), čemur je sledila 3-4 urna inkubacija pod UV svetlobo. Tudi vzporedno z vzorci gojišča smo pripravili kontrole reagentov ter filtracije (prefiltrirana MilliQ voda).

Tik pred meritvami smo tako trdnim vzorcem, kot vzorcem gojišča dodali ustrezno količino hidroksilamin hidroklorida, katerega vloga je odstranitev Cl in Br, ki bi lahko kasneje vplivala na detekcijo.

Meritve na sistemu AAS HP (*slika 10*) so potekale tako, da smo merilni volumen razkrojenega vzorca vbrizgali v redukcijsko celico s SnCl_2 , ki reducira Hg^{2+} v Hg^0 . Plinasti Hg^0 je nato s tokom dušika potoval najprej skozi tri izpiralke s padajočo koncentracijo NaOH, kjer je prišlo do nevtralizacije kislinskih hlapov iz redukcijske celice. Sledil je prehod preko sušilnega sredstva v obliki silikagela, s čimer smo preprečili prehod vlage do optičnega dela instrumenta, na katerem bi vodna para lahko kondenzirala in povzročila nespecifično absorbcijo. Preko silikagela je z dušikom pomešani Hg^0 potoval do zlate pasti, na kateri je potekla amalgamacija. Po nekaj minutah, ko se je na past ujel ves pričakovani Hg^0 iz vzorca, je ob povišanju temperature na 500-600°C potekla deamalgamacija. Zbrani Hg^0 je nato s tokom dušika potoval do merilne celice detektorja AAS HP, kjer je potekla detekcija Hg par z merjenjem absorbcije pri 253,7 nm. Nastali signali, ki tam nastanejo kot razlika v absorbciji med referenčno in merilno fotocelico detektorja, se v naslednji fazi pretvorijo v razliko v napetosti, v končni obliki pa so zapisani kot kromatografski vrhovi (Horvat in sod., 1991; Horvat, 1996).

Pred vsakim začetkom meritev je bilo potrebno instrument umeriti. Za izdelavo umeritvene krivulje smo v redukcijsko celico injicirali različne količine delovnega standarda čiste raztopine Hg^{2+} s koncentracijo 10 ng/ml. Standard smo injicirali tudi po vsakem pomerjenem vzorcu ter tako preverjali, če prihaja do sprememb v občutljivosti detektorja. Pred začetkom meritev in po vsakem vzorcu smo preverili tudi kakšen je signal ozadja merilnega sistema, pri čemer v redukcijsko celico nismo injicirali ničesar, ves preostali postopek pa je potekal enako kot pri merjenju Hg-T v vzorcih ali standardni raztopini.



1-izvor dušika	10-sušilno sredstvo (silikagel)
2-rotameter	11-rotameter
3-tripotni ventil	12-Au past
4-Au past	13-uporovna grelna žica
5-redukcijska celica	14-tripotni ventil
5a-dodajanje reducenta	15-kvarčna kiveta
5b-frita	16-izvor svetlobe
7-raztopina 10%NaOH	17-detektor
8-raztopina 5% NaOH	18-ojačevalec
9-voda	19-rekorder

*Slika 10: Shema aparature za AAS HP
(Horvat, 1989; 1991)*

Koncentracijo Hg-T v vzorcih alg smo izračunali po *enačbi 3* (*vir: IJS*).

$$c(\text{ngHg/g}) = \frac{(h_{\text{vz}} - h_n) \cdot V_{\text{vz}} \cdot m_{\text{std}}}{(h_{\text{std}} - h_0) \cdot V_a \cdot m_{\text{vz}}} \quad \dots(3)$$

Koncentracijo Hg-T v vzorcih gojišč pa po *enačbi 4* (*vir: IJS*).

$$c(\text{ngHg/ml}) = \frac{(h_{\text{vz}} - h_n) \cdot m_{\text{std}}}{(h_{\text{std}} - h_0) \cdot V_a} \quad \dots (4)$$

h_{vz} - višina signala za Hg v merjenem alikvotu vzorca

h_n - višina signala slepe raztopine (kontrole reagentov in filtra oz. filtrata)

h_{std} - višina signala, ki ustreza količini Hg v standardu (1 ng)

h_0 - višina signala ozadja merilnega sistema

V_{vz} - volumen razkrojenega in razredčenega vzorca (ml)

V_a - volumen analiziranega alikvota vzorca (ml)

m_{vz} - masa vzorca (g)

Meritve Hg-T smo ponovili pri vsakem vzorcu štirikrat, nato pa iz dobljenih rezultatov izračunali povprečje in standardne odklone v programu Microsoft Excel 2003.

3.3.6 Priprava vzorcev in meritve metilnega živega srebra (MeHg) v gojišču in biomasi alg

Tako v gojišču, kot v biomasi alg smo, v primeru prisotnosti MeHg, v njih pričakovali v izjemno nizke koncentracije, zato smo se odločili za uporabo najobčutljivejše metode za določanje te Hg zvrsti, ki vključuje etilacijo, plinsko kromatografijo (GC) in atomsko fluorescenčno spektrofotometrijo hladnih par (AFS HP) (Liang in sod., 1994).

3.3.6.1 Priprava vzorcev in ekstrakcija MeHg iz biomase alg

Prva stopnja priprave trdnih vzorcev za določanje MeHg po tej metodi je kislinško izluževanje, oziroma razkroj biološkega vzorca z namenom sprostitve različnih oblik Hg v raztopino. Zaradi majhne mase liofiliziranih alg na filtrih in pričakovanih nizkih vrednosti MeHg v njih, smo za vzorec uporabili 2 (približno 20 mg vzorca) oz. 3 (približno 50 mg vzorca) filtre z liofilizirano biomaso. Filtre z algami smo namestili v 30 ml teflonsko posodico, vzporedno pa smo v štiri enake posodice zatehtali tudi 10 do 50 mg certificiranega referenčnega materiala (IAEA 140), od katerih smo v dve dodali tudi znano količino (100 pg) sveže pripravljenega delovnega standarda MeHg, kar nam je kasneje služilo za izračun izkoristka ekstrakcije. V dve posodici smo namestili samo filtra (kontrola odsotnosti MeHg na filtrih), v dve pa nismo dali ničesar, saj sta služili kontroli čistosti reagentov. V vse posodice smo nato dodali 5 ml sveže pripravljene raztopine 18%(w/v) KBr in 5%(v/v) H₂SO₄ v volumskem razmerju 1:1 ter 1 ml prav tako sveže raztopine 1M CuSO₄, čemur je sledilo 5 minutno stresanje na stresalniku.

Kislinškemu izluževanju je sledila ekstrakcija MeHg v organsko topilo diklorometan (CH₂Cl₂). Vzorcem smo dodali najprej 10 ml CH₂Cl₂, sledilo je 15 minutno stresanje na stresalniku, nato pa 5 minutno centrifugiranje pri 3200 obratih/min. Spodnjo, organsko fazo, v katero smo ekstrahirali MeHg smo nato od vodne ločili v teflonskem liju ločniku. Preostali vodni fazi smo nato dodali še 5 ml CH₂Cl₂ ter ponovili postopek stresanja, centrifugiranja in ločevanja. Združenim ekstraktom v 60 ml teflonski posodici smo nato dodali 20 ml MilliQ vode in jih inkubirali v vodni kopeli s temperaturo 80°C, dokler ni iz njih izparel ves CH₂Cl₂. V tej fazi je prišlo do prehoda MeHgBr nazaj v vodno fazo, v kateri pa tokrat ni bilo več prisotnih mnogih nečistoč iz začetnega vzorca. Preostanek CH₂Cl₂, ki je ostal tudi po izparevanju in bi motil pri nadaljnjih korakih analiznega postopka (etilaciji) smo odstranili s 5 minutnim prepihanjem vsebine teflonk z dušikom.

3.3.6.2 Ekstrakcija MeHg iz gojišča

Priprava vzorcev oz. ekstrakcija MeHg iz gojišča je potekala po sledečem postopku: v čiste teflonske posodice smo najprej nalili približno 70 ml gojišča, v eno od njih pa smo poleg tega dodali še 100 pg standardne raztopine MeHg. Vsem smo nato dodali 5ml HCl in 30 ml CH_2Cl_2 , dobro premešali in pustili na stresalniku preko noči. Za kontrolo filtracije in čistosti reagentov smo v tri posodice namesto gojišča dodali prefiltrirano MilliQ vodo in postopali enako kot pri vzorcih gojišča. Po prekonočnem stresanju smo z vodno črpalko odstranili zgornjo vodno fazo, preostali organski fazi, v katero se je ekstrahiralo MeHgCl pa smo dodali 40 ml MilliQ vode. Z inkubacijo v vodni kopeli pri 80°C smo odparili organsko topilo, pri čemer je prišlo do prehoda MeHgCl v vodno fazo. Slednjo smo v nadaljevanju še 5 minut prepihovali z dušikom, s čimer smo odstranili morebitne ostanke CH_2Cl_2 .

3.3.6.3 Etilacija, GC, AFS HP

Vzorci (ekstrakte biomase, gojišča oziroma ustreznih kontrol) smo v naslednji fazi prenesli v teflonske prepihovalne posodice, kjer smo jim dodali 50 μl etilacijskega reagenta, natrijevega tetraetilborata ($\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$) ter 100 μl acetatnega pufra, ki je vzdrževal primeren pH za reakcijo etilacije. Po 15 minutnem delovanju reagentov, smo na posodice priključili pasti Tenax (vsebujejo porozni polimerni material, z dobro adsorpcijsko kapaciteto za hlapne organske spojine) in jih 15 minut usmerjeno prepihovali s tokom dušika. Pri tem so se hlapne etilirane Hg zvrsti lovile na adsorpcijski material v pasteh. V nadaljevanju smo pasti odstranili s posodic in jih za 5 minut priključili neposredno na tok dušika, s čimer smo odstranili vlago v njih. Do naslednje stopnje, ki poteka na merilnem sistemu, smo pasti Tenax zaprli s teflonskimi zamaški.

Na merilnem sistemu smo Tenax pasti na katere so se ujele hlapne Hg zvrsti, namestili znotraj grelne spirale ter priključili na teflonske cevi zaprtega plinskega tokokroga. Med segrevanjem na 200°C je prišlo do sproščanja adsorbiranih molekul s pasti, tok argona pa jih je nato vodil v stekleno GC kolono, kjer so se ločile posamezne zvrsti. Te so se v pirolitski celici termično razkrojile in pretvorile v Hg^0 , ki je nato preko sušilne pasti potoval v merilno celico AFS HP detektorja. Nadaljni postopek in delovanje slednjega sta razložena v odstavku 3.3.3.

Tudi ta sistem smo umerili z uporabo različnih količin sveže pripravljenega standarda MeHg, ki smo jih dodali namesto vzorcev v prepihovalno posodico, napolnjeno z MilliQ vodo, vsi

nadaljni koraki (etilacija/GC/AFS HP) pa so potekali po enakem postopku. Standard smo vključili v vsako serijo postopka etilacije (na vsaka dva vzorca), poleg slednjega pa smo enako pogosto preverjali tudi čistost reagentov za etilacijo oziroma ozadje merilnega sistema. To smo storili tako, da smo v preprihodne posodice namesto vzorcev dali MilliQ vodo ter z njimi postopali enako kot z vzorci in standardom.

Koncentracijo MeHg v algah smo v končni fazi izračunali po *enačbi 5* (vir: IJS).

$$c(\text{pgMeHg/g}) = \frac{(h_{\text{vz}} - h_n) \cdot V_{\text{vz}} \cdot m_{\text{std}}}{(h_{\text{std}} - h_0) \cdot V_a \cdot m} \quad \dots (5)$$

V vzorcih gojišč pa po *enačbi 6* (vir: IJS).

$$c(\text{pgMeHg/ml}) = \frac{(h_{\text{vz}} - h_n) \cdot m_{\text{std}}}{(h_{\text{std}} - h_0) \cdot V_a} \quad \dots (6)$$

h_{vz} – višina signala za MeHg v analiziranem alikvotu vzorca

h_{std} – višina signala, ki ustreza količini MeHg v standardu (100 pg)

h_n – višina signala za slepo raztopino (kontrolno reagentov in filtra oz. filtrata)

h_0 – višina signala ozadja merilnega sistema

V_{vz} – volumen razkrojenega in razredčenega vzorca (ml)

V_a – volumen analiziranega alikvota vzorca (ml)

m – masa vzorca (g)

V primeru meritev MeHg smo dobili pri posameznem vzorcu le po en rezultat (vzrok je bil pomanjkanje biomase in/ali težave pri ekstrakciji), zato statistična obdelava ni bila mogoča.

3.3.7 Preverjanje pravilnosti analiznih postopkov

Za preverjanje pravilnosti postopkov priprave in natančnosti meritev smo tako pri določanju celokupnega kot tudi metilnega živega srebra v vzorcih alg uporabljali certificiran referenčni material (CRM). To je material, v katerem je ena ali več lastnosti (našem primeru sta pomembni predvsem koncentraciji Hg-T in MeHg), določenih s tehnično veljavnim

postopkom in ima certifikat ali kako drugo listino izdano s strani certifikacijskega organa, v kateri so podane certificirane vrednosti ter interval zaupanja z navedbo stopnje negotovosti (Horvat in sod., 1993). Uporabljen certificirani referenčni material mora biti po sestavi in koncentracijskem območju določenih elementov čimbolj podoben vzorcu. Večina certificiranih materialov pokriva področje morskih ekosistemov, medtem ko le-ti za sladkovodne sisteme večinoma še niso določeni. CRM, ki je bil po sestavi najbližje našemu vzorcu je bil IAEA-140, ki vsebuje homogenat morskega rastlinja, s koncentracijami Hg-T: $(0,038 \pm 0,006) \mu\text{g/g}$ in MeHg: $(0,000626 \pm 0,000107) \mu\text{g/g}$ (Coquery in sod., 2000).

3.3.8 Ukrepi za preprečevanje kontaminacije vzorcev

Zaradi izjemno nizkih koncentracij Hg, ki se jih v različnih materialih določa po zgoraj opisanih postopkih, je preprečevanje vsakršne kontaminacije vzorcev z različnimi oblikami tega elementa ključnega pomena. Med delom smo zato slednje preprečevali z ukrepi na vseh nivojih.

Vso steklovino, s katero je prišel v stik vzorec smo predhodno tako očistili z raztopino 1% $\text{KMnO}_4/0,5\text{M H}_2\text{SO}_4$ (ki sprosti adsorbirani Hg s stekla in ga veže nase) nato pa splaknili z deionizirano vodo.

Vse teflonske posode smo pred uporabo očistili po posebnem postopku. Po temeljitnem spiranju z vodo in MilliQ, smo jih za 48h namočili v raztopino detergenta (2 % raztopina Micro-90), čemur je sledilo vnovično spiranje z MilliQ. V naslednji fazi smo posode nato namočili v razredčeno 65 % HNO_3 (1:1) in jih 48 ur segrevali na temperaturo, pri kateri je potekal razkroj vzorcev. Ponovnemu spiranju z MilliQ je sledilo 48-urno namakanje v 10 % HCl. V zadnjem koraku smo posode sprali z Milli-Q vodo in posušili v sušilniku, če smo jih nameravali uporabiti še isti dan, sicer pa smo v njih pripravili 1% raztopino HCl in jih shranili v zaprtih polietilenskih vrečkah (Horvat, 1996).

Kontaminacijo z reagenti smo preprečevali z uporabo posebnih, namenskih kemikalij, ki vsebujejo minimalno množino Hg (npr. Suprapur kisline-Merck) ali take, ki jih je mogoče s primerno tehniko očistiti. Pri pripravi vseh reagentov smo uporabljali deionizirano (MilliQ) vodo. Med ostalimi ukrepi preprečevanja kontaminacije vzorcev je pomembna še pazljivost pri pipetiranju (preprečevanje kakršnega koli dotikanja posodic z vzorci) in hranjenju vzorcev (preprečevanje stikov med njimi in okolico).

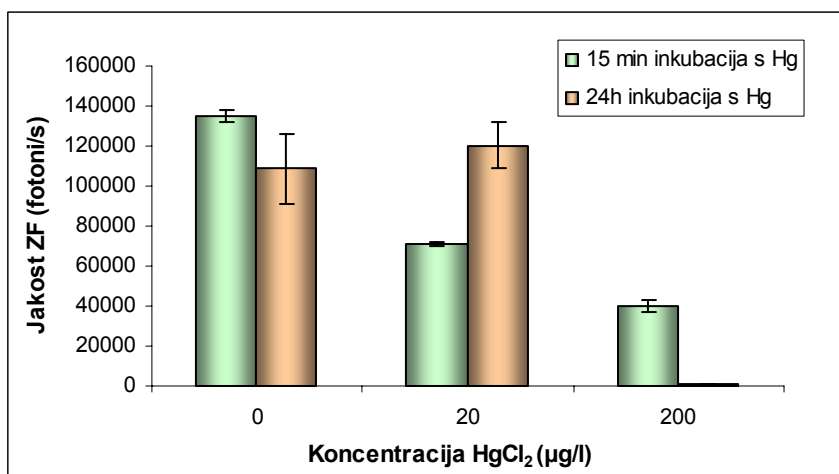
4 REZULTATI

4.1 REZULTATI MERITEV TAKOJŠNJEGA FOTOSINTETSKEGA ODZIVA ALG OB DODATKU Hg^{2+}

4.1.1 Preliminarni poskus

Po 15-minutni izpostavitvi HgCl_2 (slika 11, zeleni stolpci) sta bili izmerjeni jakosti zakasnjene fluorescence statistično značilno ($\alpha = 0,05^*$) manjši od kontrole tako pri vzorcih alg (*C. vulgaris*), izpostavljenih 200 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 , kot pri tistih, izpostavljenih 20 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 . Jakost zakasnjene fluorescence pri vzorcih, izpostavljenih 20 $\mu\text{g/l}$ je bila tudi statistično značilno večja od tiste, ki je bila izmerjena pri vzorcih, izpostavljenih 200 $\mu\text{g/l}$. Izmerjena jakost ZF je bila pri vzorcih z 20 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 v povprečju za 47 % nižja od vrednosti, izmerjene pri kontroli, pri vzorcih z 200 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 pa je bila ta zmanjšana za 70 %.

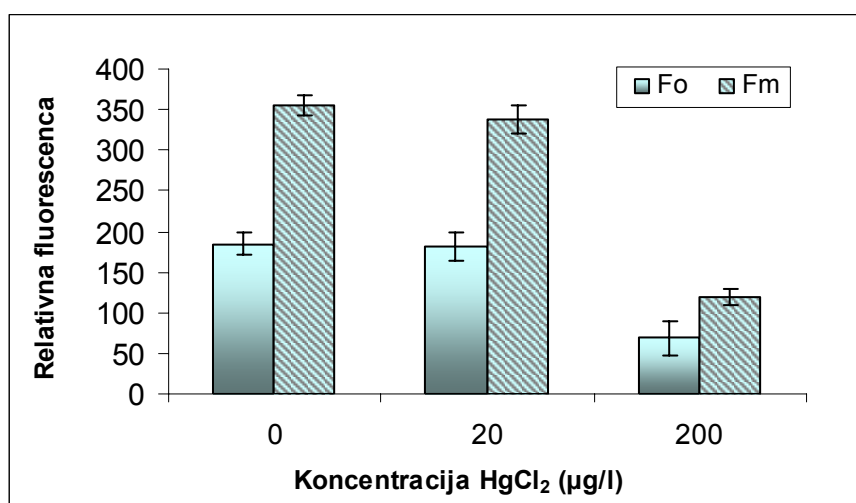
Po 24-ih urah (slika 11, oranžni stolpci) se je izmerjena jakost zakasnjene fluorescence pri pri algah, izpostavljenih 20 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 močno povečala v primerjavi s 15-minutno izpostavitvijo ter se ni več statistično značilno razlikovala od kontrole. Nasprotno pa se je jakost ZF pri vzorcih, ki smo jih 24 ur izpostavili koncentraciji 200 $\mu\text{g/l}$ glede na kontrolo zmanjšala pod mejo zaznave.



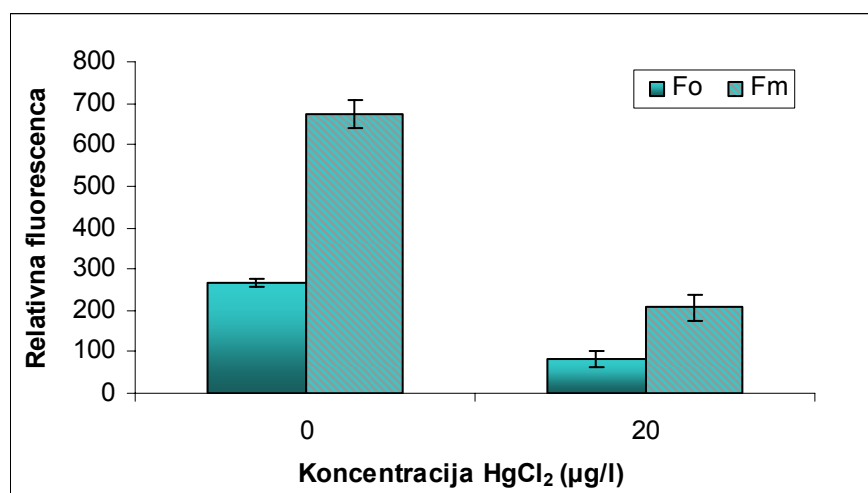
Slika 11: Jakost zakasnjene fluorescence (ZF) v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri različnih časih izpostavitve *C. vulgaris*. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni ($n=4$).

*Stopnja značilnosti (α) 0,05 velja tudi povsod v nadaljevanju, če ni označeno drugače.

Meritve fluorescence na istih vzorcih so pokazale sočasen padec izmerjenih parametrov F_0 in F_m , ki je bil po 15-minutni inkubaciji (*slika 12*) opažen pri vzorcih, izpostavljenih 200 $\mu\text{g/l}$ (zmanjšanje povprečnega F_0 za 63% in F_m za 66%), po 24-urni izpostavitvi (*slika 13*) pa že pri koncentraciji 20 $\mu\text{g/l}$ (padec F_0 za 68% in F_m za 69% glede na kontrolo). V vseh primerih je bila razlika med vzorci in kontrolami statistično značilna. Kvocienta F_v/F_m pri vzorcih alg, izpostavljenih HgCl_2 , se zaradi približno enakomernega spreminjanja parametrov F_v in F_m statistično značilno ne razlikujeta od kontrole.



Slika 12: Odvisnost fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m od koncentracije HgCl_2 po 15-minutni izpostavitvi *C. vulgaris*. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni ($n=4$).

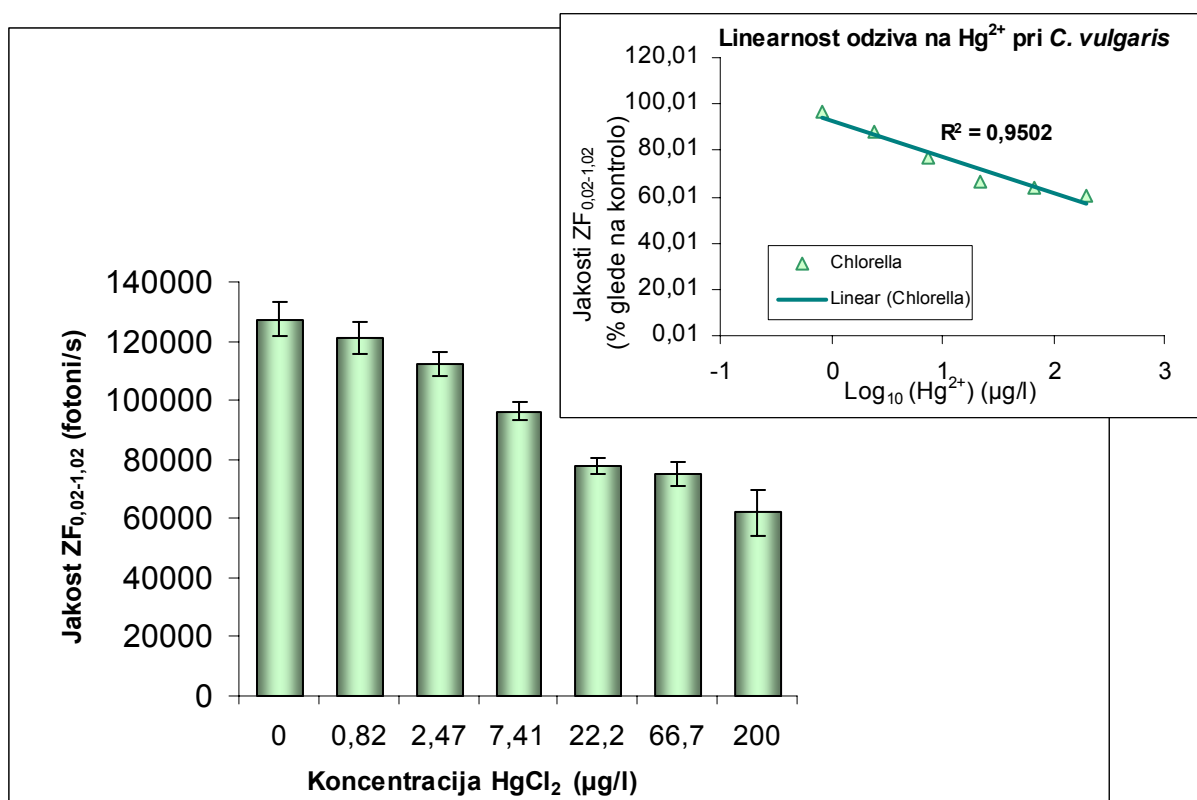


Slika 13: Odvisnost fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m od koncentracije HgCl_2 po 24-urni izpostavitvi *C. vulgaris*. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni ($n=4$).

4.1.1 Fotosintetski odziv vrste *C. vulgaris* po 15-minutni izpostavitvi koncentracijam HgCl_2 od 0,8 do 200 $\mu\text{g/l}$:

Statistično značilen upad jakosti zakasnjene fluorescence v primerjavi s kontrolo je bil izmerjen že pri algah, izpostavljenih koncentraciji 2,5 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 (slika 14). Pri tej koncentraciji se je povprečna jakost zakasnjene fluorescence glede na kontrolo zmanjšala za 12%. Pri vsaki nadaljnji večji koncentraciji je bila izmerjena jakost ZF še manjša. V povprečju se pri vzorcih s koncentracijo HgCl_2 7,4 $\mu\text{g/l}$ glede na kontrolo zmanjšala za 24%, pri vzorcih izpostavljenih 22,2 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 za 39%, pri koncentraciji 66,7 $\mu\text{g/l}$ za 41% ter pri 200 $\mu\text{g/l}$ za 51%.

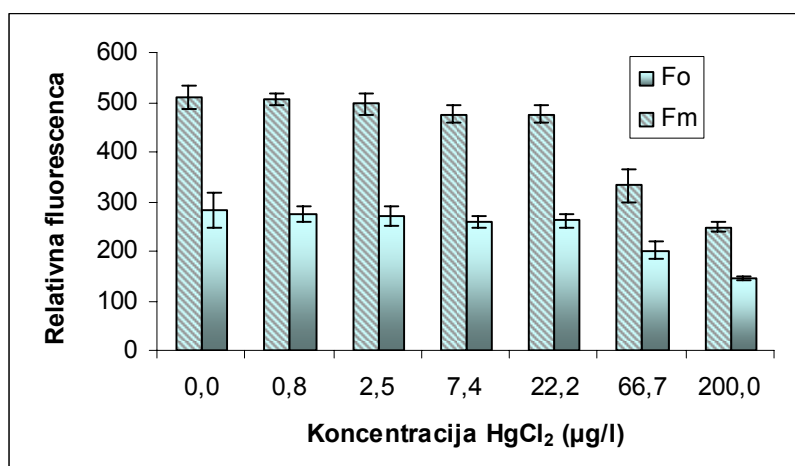
Linearna povezava med logaritmom merjenih koncentracij HgCl_2 in jakostjo zakasnjene fluorescence je bila pri $\alpha = 0,05$ ugotovljena na celotnem koncentracijskem območju ($R^2 = 0,95$).



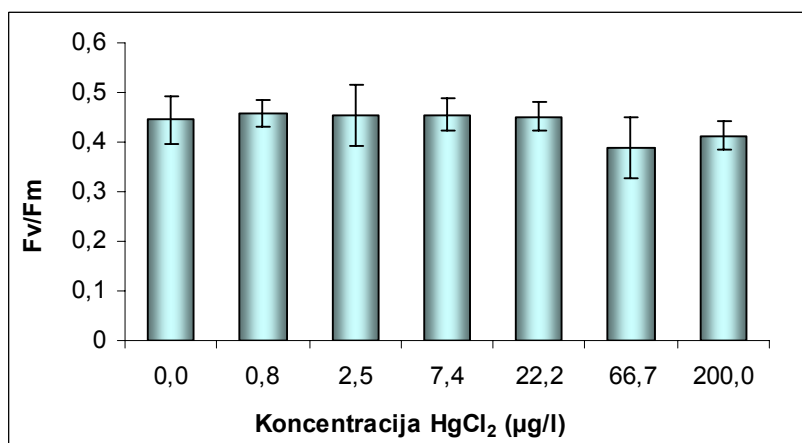
Slika 14: Jakost zakasnjene fluorescence v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri 15-minutni izpostavitvi *C. vulgaris*. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni ($n=4$). Manjši graf: Vrednosti jakosti ZF normirane glede na kontrolo v odvisnosti od logaritma koncentracije HgCl_2 .

Fluorescenčna parametra F_m in F_0 sta statistično značilno odstopanje od kontrole pokazala pri koncentracijah 66,7 $\mu\text{g/l}$ in 200 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 (slika 15). Pri višji od obeh koncentracij je bilo povprečno znižanje glede na kontrolo pri parametru F_0 za 49%, pri F_m pa za 51%. Pri koncentraciji 66,7 $\mu\text{g/l}$ je bilo v povprečju znižanje F_0 glede na kontrolo za 29%, F_m pa za 35%.

Vrednosti F_v/F_m , izračunane iz izmerjenih parametrov F_0 in F_m se, enako kot v preliminarnem poskusu, niso statistično značilno razlikovale od kontrole in med seboj (slika 16).



Slika 15: Fluorescenčna parametra F_0 in F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri 15-minutni izpostavitvi *C. vulgaris*. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni ($n=4$).



Slika 16: F_v/F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri 15-minutni izpostavitvi *C. vulgaris*. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni ($n=4$).

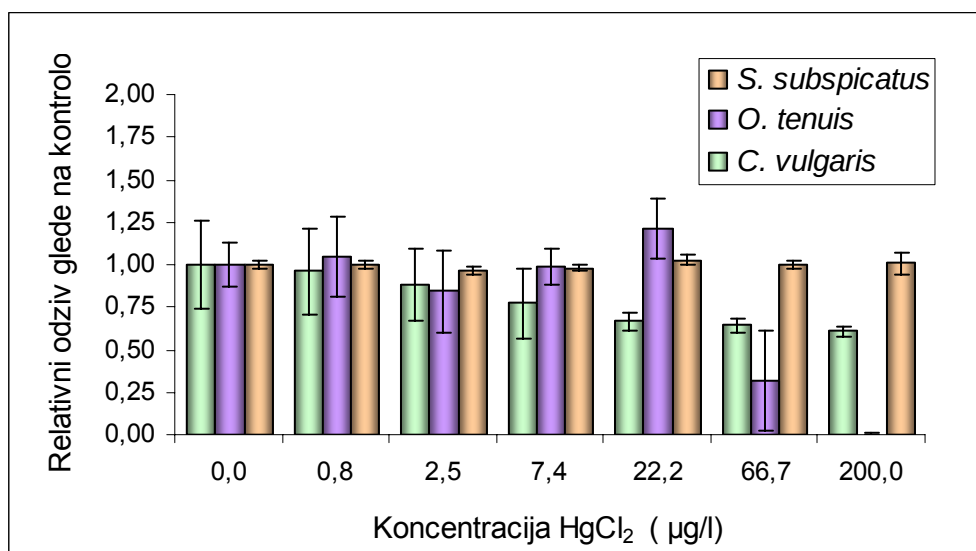
4.1.3 Primerjava hitrih fotosintetskih odzivov treh različnih alg

4.1.3.1 Primerjava jakosti zakasnjene fluorescence in fluorescence

Iz rezultatov meritev (*preglednica 4* in *slika 17*) je razvidno, da je jakost zakasnjene fluorescence glede na koncentracijo HgCl_2 najhitreje začela upadati pri vrsti *Chlorella vulgaris*. Pri omenjeni vrsti je bil v tem poskusu statistično značilen odziv izmerjen pri koncentracijah 22,2 $\mu\text{g/l}$, 66,7 $\mu\text{g/l}$ in 200 $\mu\text{g/l}$ (pri prejšnjem poskusu je bila meja zaznavnosti še manjša). Pri najvišji koncentraciji (200 $\mu\text{g/l}$) je bil povprečni izmerjeni upad jakosti zakasnjene fluorescence glede na kontrolo 39%, pri koncentraciji 66,7 $\mu\text{g/l}$ se je ta zmanjšala za 36%, pri 22,2 $\mu\text{g/l}$ pa za 33%. Pri koncentraciji 7,4 $\mu\text{g/l}$ je bila izmerjena povprečna jakost za 23% manjša od kontrolne, vendar razlika ni bila statistično značilna. Pri vzorcih z manjšimi koncentracijami Hg^{2+} je opazna velika variabilnost meritev (v primerjavi s prvim poskusom), kar je povezano tudi z znižanjem meje zaznave.

Preglednica 4: Izmerjene jakosti zakasnjene fluorescence v intervalu 0,02-1,02 s po osvetlitvi, ki je sledila 15-minutni izpostavitvi alg različnim koncentracijam HgCl_2 . Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni ($n=4$).

Koncentracija HgCl_2 ($\mu\text{g/l}$)	Jakost zakasnjene fluorescence 0,02-1,02 (fotoni/s)		
	<i>S. subspicatus</i>	<i>O. tenuis</i>	<i>C. vulgaris</i>
0,0	46729 $\pm$ 1109	4710 $\pm$ 596	72950 $\pm$ 26163
0,8	46811 $\pm$ 1024	4918 $\pm$ 1098	70257 $\pm$ 23150
2,5	45190 $\pm$ 1001	3977 $\pm$ 1130	64357 $\pm$ 23150
7,4	45807 $\pm$ 864	4661 $\pm$ 513	56323 $\pm$ 15008
22, 2	47968 $\pm$ 1337	5732 $\pm$ 832	48770 $\pm$ 3896
66,7	46733 $\pm$ 1091	1501 $\pm$ 1394	46799 $\pm$ 3096
200	47060 $\pm$ 2864	15 $\pm$ 41	44338 $\pm$ 2181



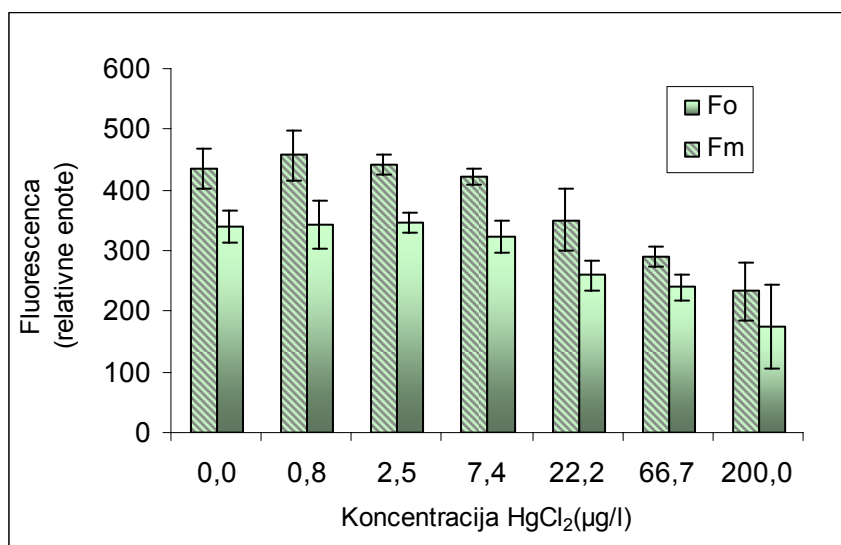
Slika 17: Jakost zakasnjene fluorescence v odvisnosti od koncentracije HgCl₂ pri vrstah *S. subspicatus*, *O. tenuis* in *C. vulgaris*. Vrednosti, dobljene pri različnih koncentracijah smo normirali na vrednost, dobljeno pri kontroli. Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni (n=4).

Pri algi vrste *Oscillatoria tenuis* smo statistično značilen vpliv zaznali pri koncentracijah 66,7 µg/l in 200 µg/l, pri čemer pa je bil opazen upad jakosti zakasnjene fluorescence bistveno večji, kot pri vrsti *C. vulgaris*. Pri koncentraciji 66,7 µg/l je bila povprečna jakost ZF za 68 % manjša od kontrolne, pri 200 µg/l pa je padla za 100%.

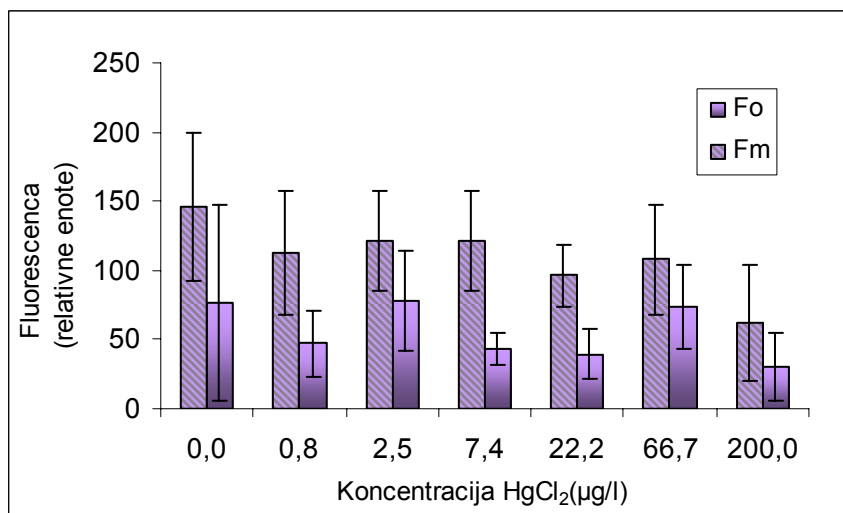
Alge vrste *Scenedesmus subspicatus* so se izkazale kot najmanj občutljive na Hg²⁺, saj niti pri največji koncentraciji nismo izmerili statistično značilnega odstopanja od kontrole. Povprečna jakost ZF je pri vseh koncentracijah HgCl₂ ostala 100% jakosti ZF kontrole.

Meritve parametrov fluorescence F_0 in F_m so pokazale odziv na HgCl₂ le pri vrsti *Chlorella vulgaris*, medtem ko pri ostalih dveh algah ni bilo opazne povezave med dodanim HgCl₂ in izmerjenima parametroma (slike 18-20).

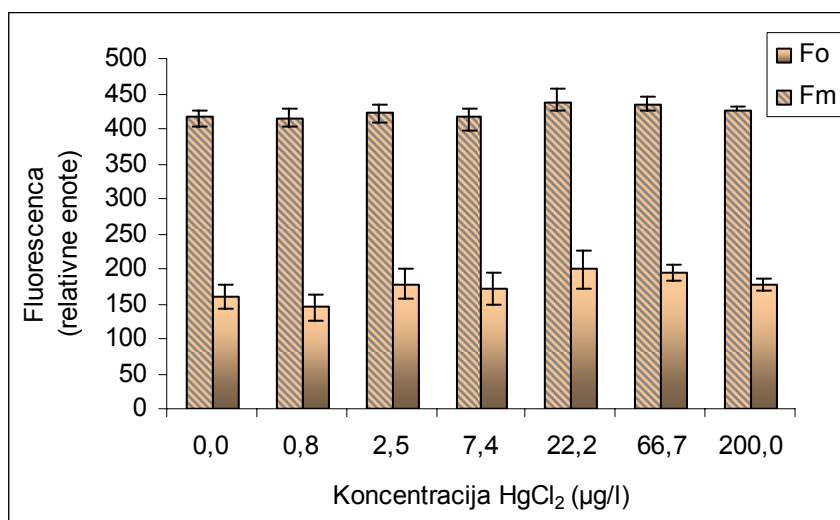
Pri *C. vulgaris* (slika 18) smo statistično značilna odziva izmerili pri koncentracijah 66,7 in 200 µg/l HgCl₂. Pri vzorcih s koncentracijo HgCl₂ 200 µg/l je bila povprečna vrednost F_0 za 48%, povprečna vrednost F_m pa za 47% nižja od povprečne vrednosti kontrole, medtem ko smo pri koncentraciji 66,7 µg/l izmerili 29% zmanjšanje vrednosti F_0 ter 33% zmanjšanje F_m glede na kontrolo.



Slika 18: Parametra F_0 in F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri *C. vulgaris*. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni ($n=4$).

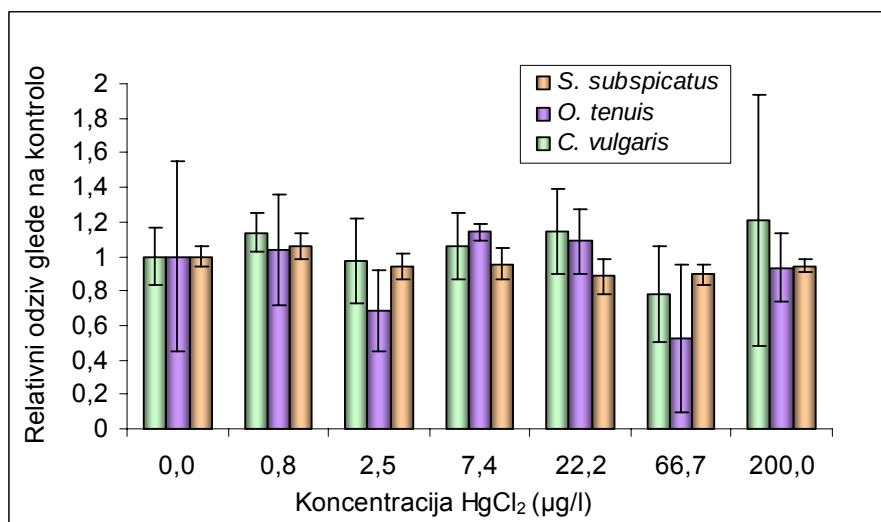


Slika 19: Parametra F_0 in F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl_2 pri *O. tenuis*. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni ($n=4$).



Slika 20: Parametra F_0 in F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl₂ pri *S. subspicatus*. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni (n=4).

Razmerja parametrov fluorescence F_v/F_m pri algah, izpostavljenih HgCl₂ se tudi pri tem poskusu niso statistično značilno razlikovala od kontrole pri nobeni koncentraciji - ne glede na vrsto alge (slika 21).



Slika 21: Količnih fluorescenčnih parametrov F_v/F_m v odvisnosti od koncentracije HgCl₂ pri *S. subspicatus*, *O. tenuis*, *C. vulgaris*. Vrednosti, dobljene pri različnih koncentracijah smo normirali na vrednost, dobljeno pri kontroli. Rezultati so prikazani kot povprečja $\pm$ standardni odkloni (n=4).

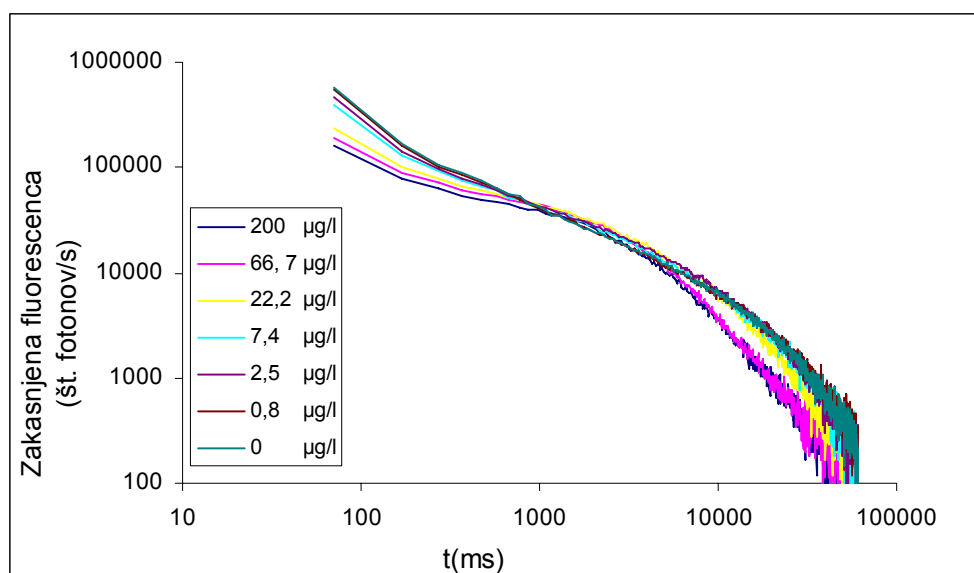
4.1.3.2 Kinetične relaksacijske krivulje zakasnjene fluorescence

Kinetične krivulje upadanja zakasnjene fluorescence pri različnih koncentracijah HgCl_2 za vse tri uporabljene vrste so prikazane na *slikah 22-24*.

Pri *C. vulgaris* se vpliv koncentracije Hg^{2+} na relaksacijsko kinetiko najbolj odraža takoj po koncu osvetljevanja (*slika 22*). V prvih 100 ms po osvetlitvi se je število izmerjenih fotonov zakasnjene fluorescence pri vzorcih s koncentracijo 200 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 zmanjšalo glede na kontrolo za 72%. Pri koncentraciji 66,7 $\mu\text{g/l}$ je bilo zmanjšanje 66 %, pri 22,2 $\mu\text{g/l}$ pa 59%. Pri nižjih treh koncentracijah je bil upad ZF glede na kontrolo nekoliko manjši - 31% pri 7,4 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 , 15% pri koncentraciji 2,5 $\mu\text{g/l}$ ter 5% pri 0,8 $\mu\text{g/l}$.

Po 1 sekundi od konca osvetljevanja je prišlo do zmanjšanja razlik v ZF vzorcev s Hg^{2+} glede na kontrolne vzorce. Pri višjih treh koncentracijah (200 $\mu\text{g/l}$, 66,7 $\mu\text{g/l}$ in 22,2 $\mu\text{g/l}$) smo v enako dolgem intervalu (100 ms) izmerili zmanjšanje za 8% glede na kontrolo, medtem ko je bilo slednje pri koncentracijah 7,4 $\mu\text{g/l}$, 2,5 $\mu\text{g/l}$ in 0,8 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 3%, 5% in 1%.

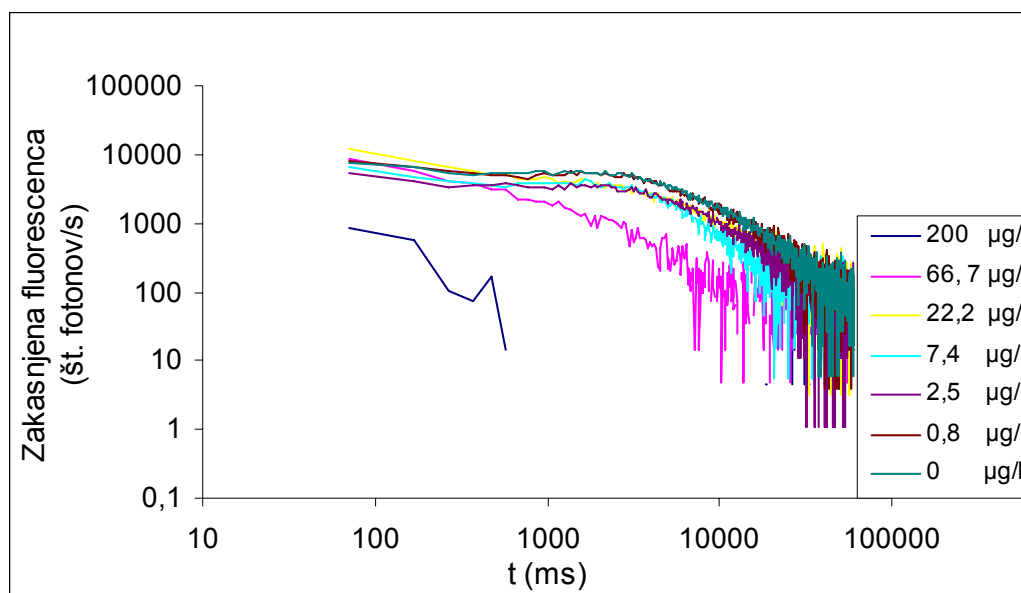
Po 10 sekundah so se razlike v ZF med kontrolo in najvišjima dvema koncentracijama (200 $\mu\text{g/l}$ in 66,7 $\mu\text{g/l}$) spet povečale (v intervalu 100 ms za 40-43%), medtem ko pri manjših koncentracijah ni bilo značilnega odstopanja od kontrole.



Slika 22: Vpliv Hg^{2+} na relaksacijsko kinetiko zakasnjene fluorescence pri vrsti *C. vulgaris*. Signal ZF v odvisnosti od časa pri različnih koncentracijah HgCl_2 je prikazan na log-log skali.

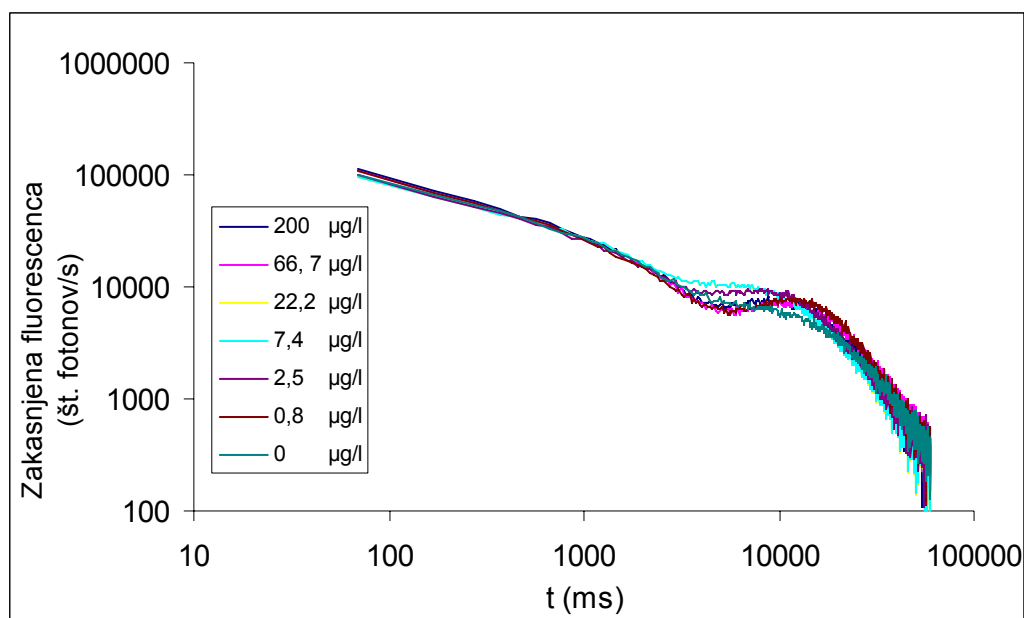
Nasprotno se pri vrsti *O. tenuis* (slika 23), vpliv HgCl_2 na kinetiko ZF bolje izraža v času po 1 sekundi od konca osvetljevanja. V prvih 100 ms po koncu osvetljevanja je bil signal ZF močno zmanjšan v primerjavi s kontrolo le pri koncentraciji 200 $\mu\text{g/l}$ (89% manjši od kontrolnega), pri vzorcih z nižjimi koncentracijami HgCl_2 pa signal zakasnjene fluorescence ni koreliral s koncentracijo HgCl_2 .

Po 1 sekundi od konca osvetljevanja je signal ZF v 100 milisekundnem intervalu manjši od kontrole pri vseh koncentracijah. Največja razlika je bila opazna pri vzorcih s koncentracijami HgCl_2 200 $\mu\text{g/l}$, kjer je bil signal ZF za 100% zmanjšan glede na kontrolo ter vzorcih s koncentracijami 66,7 $\mu\text{g/l}$, kjer je bilo zmanjšanje 72%. Pri vzorcih s preostalimi koncentracijami HgCl_2 je bil signal ZF zmanjšan glede na kontrolo od 40-43% in ni koreliral s koncentracijo Hg^{2+} .



Slika 23: Vpliv Hg^{2+} na relaksacijsko kinetiko zakasnjene fluorescence pri vrsti *O. tenuis*. Signal ZF v odvisnosti od časa pri različnih koncentracijah HgCl_2 je prikazan na log-log skali.

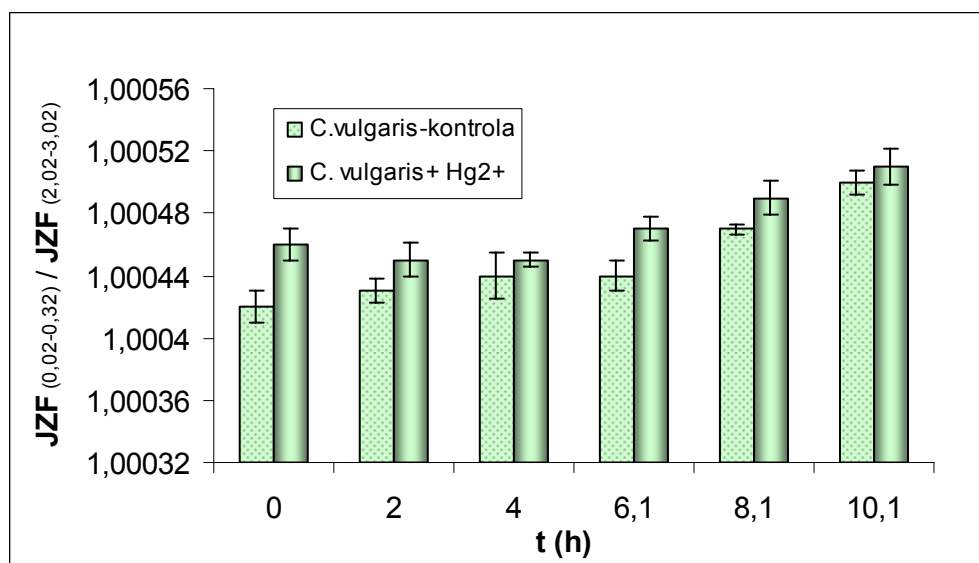
Pri vrsti *S. subspicatus* nismo opazili povezave med koncentracijo HgCl_2 in signalom ZF v nobenem od časovnih intervalov (slika 24).



Slika 24: Vpliv Hg^{2+} na relaksacijsko kinetiko zakasnjene fluorescencepri vrsti *S. subspicatus*. Signal ZF v odvisnosti od časa pri različnih koncentracijah HgCl_2 je prikazan na log-log skali.

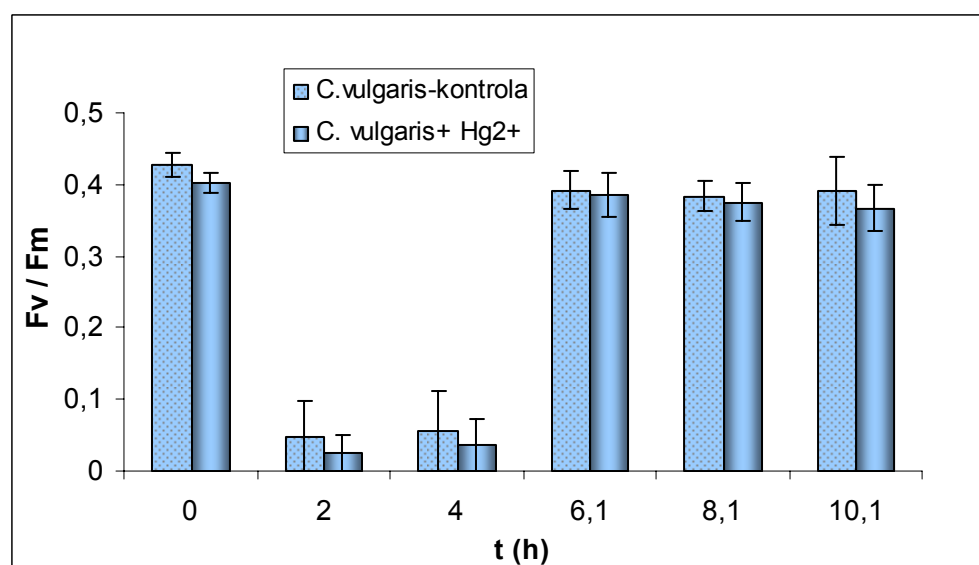
4.1.4 Spremljanje fluorescence in zakasnjene fluorescence v daljšem časovnem obdobju po izpostavitvi HgCl_2

Pri spremljanju jakosti zakasnjene fluorescence v daljšem časovnem obdobju, pri čemer smo primerjali odziv pri algah v gojišču z $1 \mu\text{g/l}$ Hg^{2+} in kontrolnem gojišču (brez dodanega Hg^{2+}), nismo ugotovili statistično značilnih vplivov živega srebra na jakost ZF (slika 25). Da bi se izognili vplivu različne gostote kontrolne in Hg^{2+} izpostavljene kulture na izračunani odziv, smo v tem primeru naredili primerjavo količnikov jakosti zakasnjene fluorescence v prvih 30 milisekundah in med drugo in tretjo sekundo (arbitrarno določena intervala na različnih straneh presečišča kinetičnih krivulj, dobljenih pri različnih kulturah *C. vulgaris*). Rezultati so pokazali, da sta se kulturi že pred izpostavitvijo Hg^{2+} (čas 0) razlikovali v fiziološkem stanju, kasneje pa sta sledili približno enakomernemu trendu padanja jakosti zakasnjene fluorescence (naraščanje $\text{JZF}_{(0,02-0,32)}/\text{JZF}_{(2,02-3,03)}$), ki je bil posledica vpliva drugih dejavnikov.



Slika 25: Količnik jakosti zakasnjene fluorescence pri kulturi *C. vulgaris*, izpostavljeni koncentraciji Hg^{2+} $1\mu g/l$ v daljšem časovnem obdobju. Rezultati so prikazani kot povprečje $\pm$ standardni odkloni (n=4).

Tudi pri meritvah fluorescence nismo opazili statistično značilnih razlik v nobenem časovnem intervalu med kulturo izpostavljeno Hg^{2+} in kontrolno kulturo. Tudi opazno zmanjšanje količnika F_v/F_m po dveh oziroma štirih urah je bilo prisotno enakomerno pri obeh kulturah, torej neodvisno od prisotnosti Hg^{2+} v gojišču (slika 26).

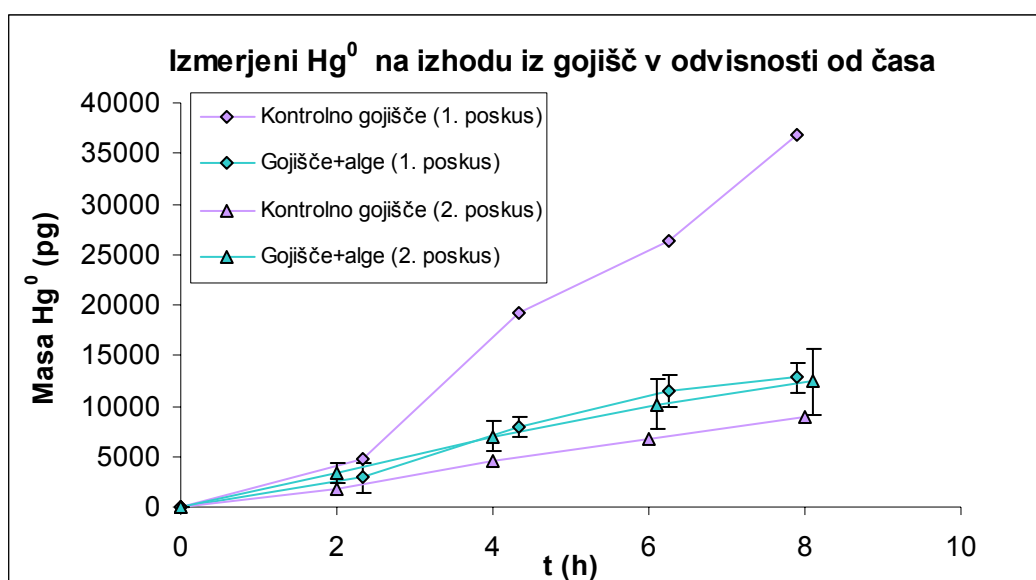


Slika 26: Količnik F_v/F_m pri kulturi *C. vulgaris*, izpostavljeni koncentraciji Hg^{2+} $1\mu g/l$ v daljšem časovnem obdobju. Rezultati so prikazani kot povprečje $\pm$ standardni odkloni (n=4).

4.1 REZULTATI ANALIZ VPLIVA ALGE *C. vulgaris* NA PRETVORBE ŽIVEGA SREBRA V GOJIŠČU

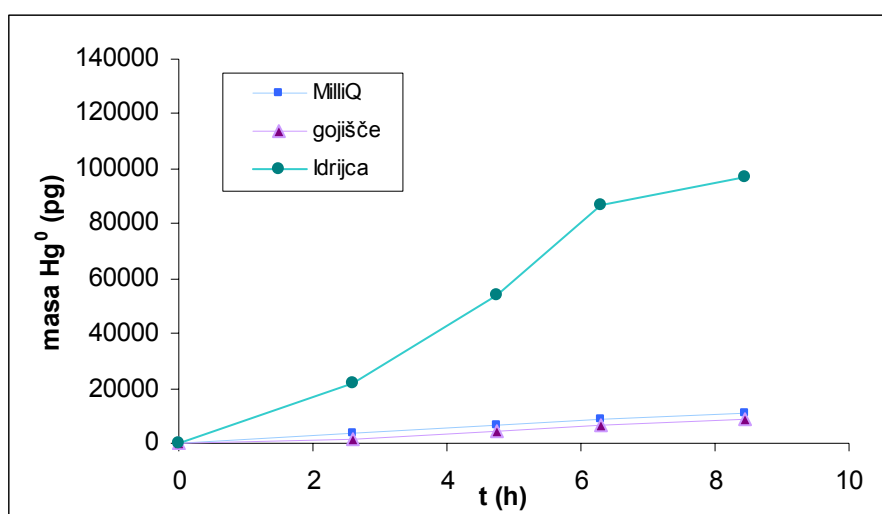
4.1.1 Analiza dinamike redukcije Hg^{2+} v gojišču z algami ter vpliva gojišča na ta proces

Časovno odvisnost nastajanja Hg^0 v gojiščih z algami in kontrolnih gojiščih brez alg, ki smo jim dodali Hg^{2+} , prikazuje *slika 27*. Iz te je razvidno, da je bila v gojiščih z algami hitrost nastajanja Hg^0 v prvih urah v povprečju večja kot v zadnjih dveh urah, medtem ko je redukcija v kontrolnih gojiščih potekala po prvih dveh urah s približno enakomerno hitrostjo. V 8 urah smo na izhodu steklenic gojišč z algami izmerili $12,9 \pm 1,5$ ng Hg^0 pri prvi ponovitvi ter $12,2 \pm 3,3$ ng Hg^0 pri drugi ponovitvi poskusa. Količina na izhodu iz kontrolnih gojišč izmerjenega Hg^0 , se je med dvema ponovitvama močno razlikovala. V prvem poskusu smo v 8 urah izmerili 37 ng Hg^0 , torej približno trikrat več kot pri gojiščih z algami. Nasprotno je bila pri drugem poskusu količina Hg^0 , nastalega v kontrolnem gojišču, manjša kot pri gojiščih z algami in je v 8h dosegla vrednost 11 ng. Da bi preverili, ali je zmanjšano izločanje Hg^0 posledica nižje začetne temperature kontrolnega gojišča (ki smo ga do začetka poskusa hranili v hladilniku), smo izpostavitve slednjega ponovili po segretju gojišča na sobno temperaturo. Po 8 urah je bila zmerjena količina Hg^0 8 ng, kar je bližje tisti, izmerjeni pri drugi ponovitvi poskusa.



Slika 27: Masa izmerjenega Hg^0 v zraku na izhodu iz gojišč z algami in kontrolnim gojiščem v odvisnosti od časa pri prvem in drugem poskusu. Rezultati izmerjenega Hg^0 v paralelkah gojišč z algami so prikazani kot povprečje $\pm$ standardni odkloni.

Izkazalo se je, da v gojišču brez alg poteka veliko intenzivnejša redukcija Hg^{2+} kot smo pričakovali, zato smo se odločili preveriti, ali gre pri tem za spontan kemijski proces, ali je kataliziran s strani morebitnih reaktivnih kemijskih skupin, prisotnih v samem gojišču. Kot primerjavo redukcijskega potenciala gojišča z redukcijskim potencialom naravnega medija, smo sočasno z deionizirano vodo in gojiščem, preverili še redukcijo v filtrirani vodi iz Idrijce. Meritve so pokazale, da redukcija v čisti deionizirani vodi (MilliQ) poteka ne le enako hitro, temveč celo nekoliko hitreje kot v gojišču. V obeh medijih pa je bila hitrost nastajanja Hg^0 bistveno manjša kot v vodi iz Idrijce (slika 28).



Slika 28: Primerjava hitrosti nastajanja Hg^0 v deionizirani vodi (MilliQ), gojišču in vodi iz Idrijce.

4.1.2 Analiza celokupnega (Hg-T) in monometiliranega (MeHg) živega srebra v gojišču in algah

Po 10-urni inkubaciji, smo v biomasi alg izmerili koncentracijo celokupnega živega srebra 4395 ± 89 ng/g. Ob upoštevanju mase liofiliziranih alg (0,0787 g) smo izračunali, da se je od začetnih 1000 ng Hg-T, povprečno 346 ng (≈ 34 %) razporedilo v ali na celice alg.

V nasprotju s pričakovanji, smo po 20-urni inkubaciji izmerili v algah skoraj dvakrat nižjo koncentracijo Hg-T kot po 10-urni (2234 ± 14 ng/g). Kljub temu, da je bila biomasa v primeru 20-urne inkubacije večja (0,1004 g), je bil povprečni delež živega srebra, ki ga je akumulirala manjši ($\approx 22\%$).

Vsota celokupnega živega srebra v biomasi, gojišču in na stenah posode je bila v vseh primerih manjša od količine v začetku dodanega Hg^{2+} (1000 ng). Po 10-urni inkubaciji je vsota Hg-T v gojišču z algami dosegala v povprečju 920 ng, po 20-urni inkubaciji pa 985 ng. Vsota Hg-T izmerjenega v kontrolnem gojišču je bila po 10-urni inkubaciji v povprečju 958 ng, po 20-urni inkubaciji pa 537 ng.

Rezultati razporeditve Hg-T med biomaso alg, gojiščem in stenami posode po 10 in 20-urni inkubaciji, so prikazani v *preglednici 5*.

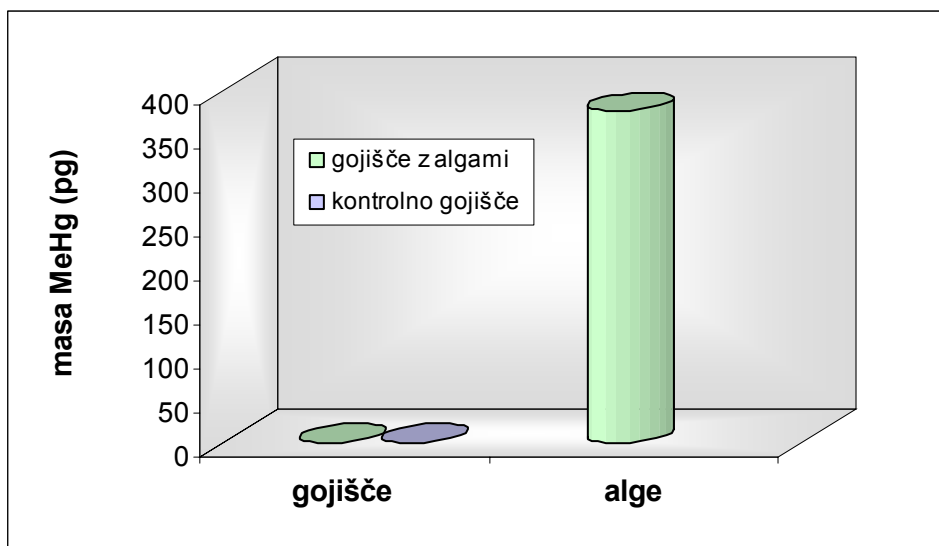
Preglednica 5: Razporeditev celokupnega živega srebra. Rezultati so prikazani kot povprečna masa Hg-T $\pm$ standardni odkloni ($n = 4$)

	Masa T-Hg (ng)			
	10-urna inkubacija:		20-urna inkubacija:	
	Gojišče z algami	Kontrolno gojišče	Gojišče z algami	Kontrolno gojišče
Gojišče:	$563,8 \pm 6,6$	$935,9 \pm 22,7$	$747,9 \pm 28,4$	$513,79 \pm 12,9$
Biomasa alg:	$345,9 \pm 70,0$	/	$224,3 \pm 1,5$	/
Stene posode:	$10,7 \pm 0,1$	$23,0 \pm 0,7$	$13,0 \pm 0,2$	$24,39 \pm 0,0$

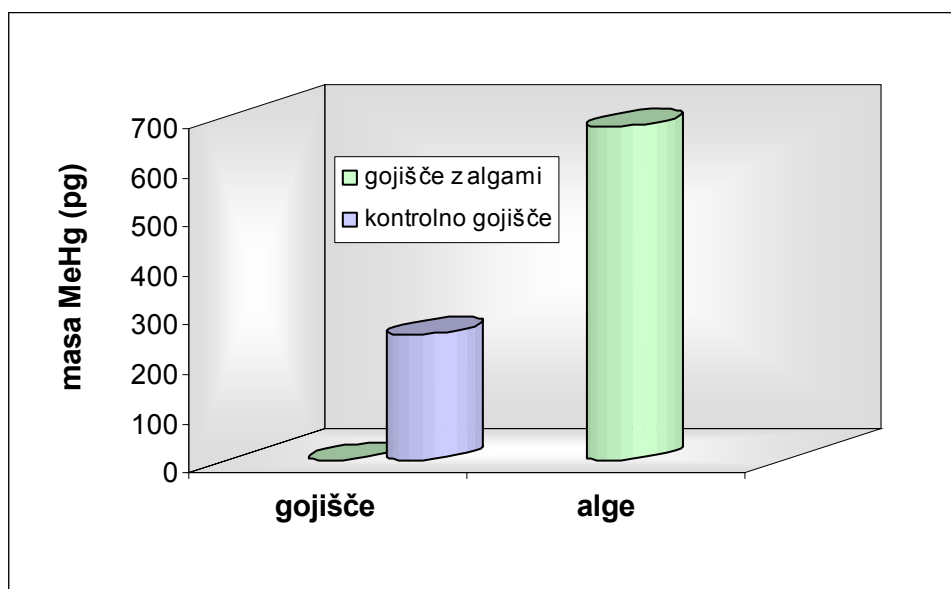
Analize biomase alg so pokazale, da je bil majhen del celokupnega živega srebra prisoten tudi v obliki MeHg. Po 10-urni inkubaciji smo v algah izmerili koncentracijo 4,78 ng/g ($\approx 0,1$ % Hg-T), po 20-urni inkubaciji pa je bila ta več kot trikrat višja in je dosegla vrednost 17,12 ng/g ($\approx 0,3$ % Hg-T). V analiziranih gojiščih je bil MeHg pod mejo detekcije v vseh primerih, razen pri enem od kontrolnih gojišč. Izračunane mase MeHg v algah prikazuje *preglednica 6* ter *sliki 29* in *30*.

Preglednica 6: Izmerjene mase MeHg v algah in gojiščih (PMD = pod mejo detekcije). Prikazani so rezultati ene meritve.

	Masa MeHg (pg)			
	10-urna inkubacija:		20-urna inkubacija:	
	Gojišče z algami	Kontrolno gojišče	Gojišče z algami	Kontrolno gojišče
Gojišče:	PMD	PMD	PMD	253,00
Biomasa alg:	376,6	/	676,0	/



Slika 29: Razporeditev MeHg med gojiščem in algami po 10-urni inkubaciji (n=1).



Slika 30: Razporeditev MeHg med gojiščem in algami po 10-urni inkubaciji (n=1).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Živo srebro zaradi svoje velike strupenosti že desetletja predstavlja pomemben okoljski problem na obremenjenih območjih po vsem svetu. Človeška družba se je njegovega reševanja lotila z različnimi ukrepi. Ti med drugim obsegajo bioremediacijske tehnologije, zmanjšanje rudniške dejavnosti ter industrijskih virov onesnaževanja. Stalen nadzor nad koncentracijami tega elementa v okolju je ključnega pomena za ohranjanje zdravja ljudi in ekosistemov. Pogosto in učinkovito preverjanje obremenjenosti različnih ekosistemov z živim srebrom in drugimi strupenimi snovmi, bi bilo mogoče s hitrimi, enostavnimi in ceneniimi presejalnimi testi, ki bi jim v primeru pozitivnih rezultatov lahko sledile še natančnejše kemijske analize.

Evkariontske in prokariontske mikroalge so priznane kot ustrezni bioindikatorji na področju nadzora strupenih snovi v okolju. Zaradi enostavnega gojenja in občutljivosti na mnoga onesnaževala so pogosto uporabljene v ekotoksikoloških presejalnih testih onesnaženih voda. V zadnjih letih so nekatere enocelične planktonske alge že uporabili za pripravo celičnih biosenzorjev, sposobnih hitrega odziva na kritične spremembe v vodnih sistemih zaradi povišanja vsebnosti strupenih snovi (Campanella in sod., 2000).

Pri načrtovanju biosenzorskega sistema z veliko občutljivostjo za tarčno spojino je zelo pomembna izbira primerne biološkega elementa. V našem primeru smo izbirali med celicami različnih vrst alg. Rezultati raziskave so pokazali, da se je izmed treh preizkušenih vrst odziv na najnižjo koncentracijo Hg^{2+} pokazal pri vrsti *Chlorella vulgaris* (2,5 oz. 22,2 $\mu\text{g/l}$). Tudi linearnost odziva je pri tej algi obsegala največji razpon logaritmiranih koncentracij, medtem ko so bile izmerjene razlike v odzivih pri različnih koncentracijah relativno majhne. Pri višjih koncentracijah (od 66,7 $\mu\text{g/l}$ naprej), je veliko občutljivost pokazala tudi vrsta *Oscillatoria tenuis*. Pri slednji odziv v merjenem območju ni bil linearen, vendar pa so bile razlike med odzivi na različne koncentracije HgCl_2 v tem območju veliko večje kot pri *C. vulgaris*, kar kaže na to, da bi biosenzorski sistem s to algo lahko imel v ozkem koncentracijskem območju večjo resolucijo. Težava, ki se pojavlja pri uporabi *O. tenuis* so velike razlike med posameznimi ponovitvami meritev, ki se kažejo v velikih standardnih odklonih. Vzrok za to je po vsej verjetnosti morfologija alge, ki je nitasta in omogoča tvorbo povezanih kolonij, posledica česar je nehomogena kultura in zato večja variabilnost pri vzorčenju. Alge vrste *Scenedesmus subspicatus* so se izkazale kot neobčutljive na uporabljene koncentracije HgCl_2 in zato neprimerne za uporabo v biosenzorskem sistemu.

Ugotovili smo, da je za občutljivost alge na Hg^{2+} poleg morfoloških značilnosti izjemnega pomena tudi trenutno fiziološko stanje, v katerem se nahaja, ko pride v stik s Hg^{2+} (razlika med učinki pri različnih ponovitvah pri *C. vulgaris*). Ohranjanje konstantnega fiziološkega stanja celic, pri katerem so slednje najbolj občutljive, so Frense in sod. (1998) dosegli z gojenjem alg v kontinuirnem fotobioreaktorju.

Z metodo merjenja jakosti zakasnjene fluorescence smo statistično značilne učinke po 15-minutni izpostavitvi izmerili tako pri vrsti *C. vulgaris*, kot pri *O. tenuis*, medtem ko smo z merjenjem fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m zaznali odziv le pri vrsti *C. vulgaris*. Slednji je bil izmerjen pri trikrat višji koncentraciji Hg^{2+} kot z metodo zakasnjene fluorescence. Obe omenjeni dejstvi kažeta na to, da je metoda zakasnjene fluorescence občutljivejša kot metoda merjenja fluorescenčnih parametrov.

Kot ustrezna kvantitativna biomarkerja za prisotnost Hg^{2+} v vzorcu sta se torej pri občutljivih algah izkazala jakost zakasnjene fluorescence v prvi sekundi po osvetlitvi ter fluorescenčna parametra F_0 in F_m , medtem ko je kvalitativni odziv hitro opazen že iz krivulj relaksacijske kinetike zakasnjene fluorescence.

Uporaba optičnega biosenzorskega sistema na osnovi testiranih alg je omejena z občutljivostjo. Kljub temu, da je ta v preizkušenem sistemu s *C. vulgaris* podobna kot pri večini že opisanih biosenzorjev, ta v splošnem ne dosega koncentracijskega ranga živega srebra v okoljskih vodnih vzorcih. Koncentracije živega srebra, izmerjene v vzorcih vode iz Idrijce so se npr. gibale od 2,8 do 197 ng/l (Horvat in sod., 2002), v stoječih vodah močno obremenjene kitajske province Guizhou pa od 6 do 10 000 ng/l (Nolde, 2000). Višje koncentracije živega srebra so prisotne v nekaterih industrijskih odplakah, iztokih iz čistilnih naprav in sedimentih. Za uporabo predlaganega biosenzorskega sistema pri analizi manj obremenjenih okoljskih vzorcev voda, bi bilo torej potrebno bodisi koncentriranje vzorcev, bodisi povečanje občutljivosti biološkega elementa. Poleg uporabe celic z najprimernejšo gostoto in fiziološkim stanjem, bi bilo smiselno preizkusiti tudi vpliv razgradnje ekstracelularnih polisaharidov, ki jih izločajo mnoge alge, na občutljivost slednjih za živo srebro. Omenjeni produkti namreč lahko vežejo Hg ter tako preprečujejo njegov vstop v celice (Geresh in sod., 1997), kar bi lahko bil vzrok za navidezno večjo odpornost. Nadaljnja koraka v povečanju občutljivosti bi lahko bila povečanje propustnosti celične membrane, ali uporaba izoliranih kloroplastov alg.

Druga težava, ki bi lahko nastopila ob uporabi predlaganega biosenzorskega sistema pri analizi okoljskih vzorcev, je nespecifičen odziv. Znano je, da je fotosistem II občutljiv na mnoge težke kovine, herbicide in nekatere druge kemijske spojine, zato dobljenega signala v okoljskih vzorcih ne bi mogli z gotovostjo pripisati le vplivu živega srebra. Morebitna rešitev bi lahko bila v pripravi negativnih kontrol iz vzorcev okoljske vode, ki bi jim dodali specifične kelatorje za živo srebro. Razlika med odzivom vzorca in kontrole bi bila tako neposredno povezana s koncentracijo biodostopnega deleža tega elementa v vzorcu. Kelatorji, ki bi bili popolnoma specifični za živo srebro do sedaj še niso znani. Med najbolj specifične spadata *mezo*-dimerkaptosukcinat (DMSA) in dimerkaptopropansulfonat (DMPS), znan pa je tudi že model kemijske spojine, ki bi se najbolj optimalno vezal z živosrebovimi ioni (George in sod., 2005).

Druga možnost za povečanje specifičnosti določanja živega srebra v kompleksnih vzorcih bi bila lahko primerjava profila kinetičnih krivulj zakasnjene fluorescence večih različnih alg ob stiku z neznanim vzorcem s profili, dobljenimi ob izpostavitvi istih alg različnim koncentracijam živega srebra in drugih znanih onesnaževal. V naši raziskavi so se namreč kinetične krivulje, nastale ob izpostavitvi treh različnih vrst alg živemu srebru med seboj razlikovale po težišču največjih sprememb, kar kaže na različno mesto učinka Hg^{2+} na fotosistemu II pri posamezni vrsti alge. Pri *C. vulgaris*, se je vpliv $HgCl_2$ najbolj očitno pokazal na prvem delu grafa (do 1 sekunde po koncu osvetljevanja), kar kaže na inhibicijo donorske strani FS II (prenosa elektronov med OEC in reakcijskim centrom FS II). Nasprotno je bil vpliv pri *O. tenuis* najbolj izražen v drugem delu grafa (od 1 do 10 sekund po koncu osvetljevanja), kar kaže na zaviranje toka elektronov na akceptorski strani FS II oziroma njihovega prenosa na plastokinone.

Možnosti uporabe alg v okoljevarstvu se poleg uporabe v biomonitoringu, kažejo tudi na področju bioremediacije. Dokazano je, da žive alge lahko privzamejo večje količine živega srebra in nekaterih drugih težkih kovin kot neživi material s podobno površino, proces privzema pa poteka z manjšo hitrostjo. Omenjeni dejstvi kažeta na to, da poleg biosorpcije pri prevzemu pomembno vlogo igra tudi bioakumulacija (Schmitt in sod., 2000). V naši raziskavi smo ugotovili, da so med 10-urno inkubacijo alge vrste *Chlorella vulgaris* v gojišču s koncentracijo Hg^{2+} $1\mu g/l$ slednje privzele približno 4395 ng/g Hg , medtem ko je bila po 20-urni inkubaciji izmerjena koncentracija živega srebra v oziroma na algah skoraj polovico nižja. Pojav zmanjševanja privzema težkih kovin ob večanju biomase alg so opazili tudi Schmitt in sod. (2000), razlogi zanj pa še niso znani. Predvidevamo, da bi bil možen vzrok lahko aktiviranje obrambnih mehanizmov mikroalg (npr. izločanje kelatorjev,

blokada transporterjev,...), ki bi po določenem času zmanjšali ali ustavili prehod živega srebra v celice. V biomasi že obstoječe živo srebro bi se pri tem razredčilo z delitvijo celic, ob odmrtnosti in razpadu starejših in bolj občutljivih med njimi, pa bi se določen del Hg sprostil nazaj v raztopino. Slednje razloži poleg zmanjšane koncentracije Hg v algah po daljši izpostavitvi tudi dejstvo, da je bila absolutna masa Hg v biomasi po 20-urni inkubaciji manjša kot po 10-urni. Hipotezo podpirajo tudi rezultati meritev zakasnjene fluorescence pri koncentraciji 20 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 . Ti kažejo na padec jakosti zakasnjene fluorescence po 15 minutah, ki pa mu je sledil ponoven dvig na začetno vrednost po 24 urah. Do podobnih rezultatov so z meritvami parametrov fluorescence pri izpostavitvi alg 37 $\mu\text{g/l}$ HgCl_2 , prišli tudi Juneau in sod. (2001). Pojav tolerance so že prej opazili tudi pri nekaterih drugih težkih kovinah, na primer bakru (Fernandes in sod., 1991; Moffet in Brand, 1996).

Intenziven upad zakasnjene fluorescence po 24-urni izpostavitvi alg koncentraciji HgCl_2 200 $\mu\text{g/l}$, bi lahko razložili z odmrtnostjo celic, kot posledico inhibicije fotosinteze in drugih metabolnih procesov.

Rezultati meritev redukcije živega srebra v gojiščih z algami kažejo največjo hitrost procesa v prvih štirih do šestih urah. Po tem času je, v nasprotju s kontrolnim gojiščem, prišlo do upočasnitve sproščanja Hg^0 v gojiščih z algami. Krivulji izmerjenega Hg^0 v odvisnosti od časa po obliki spominjata na krivulje, ki so jih dobili pri merjenju biosorpcije Hg^{2+} na algo *C. barcata* (Herrero in sod., 2005). Opaženi pojav bi torej lahko bil posledica adsorpcije oziroma bioakumulacije Hg^{2+} in tako zmanjšanja razpoložljive količine prostega Hg^{2+} za redukcijo. Zaradi intenzivnosti spontane redukcije Hg^{2+} , ki je potekala v gojišču, aktivne vloge alg pri tem procesu nismo mogli oceniti. Poskus, pri katerem bi primerjali obseg redukcije v gojilnem mediju z neživo biomaso alg s tistim, v katerem so žive alge bi morda lahko dal odgovor na vprašanje, kakšna je aktivna vloga alg pri tem procesu.

Analiza prisotnosti metiliranega živega srebra v algah je, v nasprotju s pričakovanji, pokazala prisotnost slednjega v biomasi tako po 10- kot po 20-urni inkubaciji. Po daljši izpostavitvi je bila koncentracija izmerjenega MeHg skoraj trikrat večja kot po krajši. Ker pri algah aktivni mehanizmi metilacije še niso opisani, sklepamo, da bi lahko bila prisotnost MeHg posledica kemičnih reakcij, pri katerih sodelujejo njihovi metabolni produkti. Kot možne donorje metilne skupine v abiotskih reakcijah, potekajočih v vodnih sistemih, omenjajo nekatere vitamine (metilkobalamin), majhne organske molekule

(dimetilioidid, dimetilsulfid) in celo nekatere organometalne komplekse (Valbona in sod., 2005). Prisotnost abiotske metilacije bi prav tako lahko preverili s poskusom, pri katerem bi kot kontrolo uporabili neživo biomaso alg.

Izmerjeno povečano vsebnost MeHg v kontrolnem gojišču po 20-urni inkubaciji pripisujemo naključni kontaminaciji, saj mineralna sestava samega gojišča ne dopušča znatne verjetnosti abiotske metilacije.

Masna bilanca izmerjenega Hg-T je pokazala, da je med inkubacijo oziroma pripravo vzorcev za analizo prišlo do izgube določenega dela v začetku dodanega živega srebra. Poleg možnih izgub biomase alg pri filtraciji in drugih postopkih priprave vzorcev, je delno k izgubam prispevalo tudi intenzivno izhlapevanje Hg^0 . Slednje je verjetno tudi ključni vzrok za izgubo Hg iz kontrolnih gojišč, v katerih poteka intenzivna spontana redukcija Hg^{2+} . V gojiščih z algami so možne izgube tudi preko nastanka druge hlapne oblike – Me_2Hg (Pongraz in Heumann, 1997).

Pri interpretaciji dobljenih rezultatov je pomembno poudariti, da zaradi omejenosti s časom, tehnične zapletenosti poskusov ter majhne biomase alg, večje število ponovitev izpostavitve alg ter meritev živosrebrskih vrst, ki bi dale statistično podprte zaključke, ni bilo mogoče. Hipoteze, ki smo jih postavili ob dobljenih rezultatih torej temeljijo na predpostavki, da slednji niso bili posledica naključja, temveč bi se ponovili tudi v primeru večjega števila ponovitev poskusov oziroma meritev.

Na podlagi raziskave lahko podamo naslednje sklepe:

- Občutljivost na Hg^{2+} v koncentracijskem območju do 200 $\mu\text{g/l}$ sta pokazali dve od treh preizkušenih vrst alg (*C. vulgaris* in *O. tenuis*), medtem ko pri vrsti *S. subspicatus* ni bilo izmerjenega učinka, zaradi česar ta alga ne bi bila primerna kot biološki element v biosenzorskem sistemu na osnovi FS II.
- *C. vulgaris* je pokazala občutljivost in linearen odziv pri nižjih koncentracijah kot *O. tenuis*, medtem ko je bil pri slednji odziv v ožjem območju višjih koncentracij intenzivnejši, kar nakazuje, da bi bil biosenzor z uporabo prve od omenjenih vrst bolj občutljiv, vendar bi imel manjšo ločljivost od biosenzorja, v katerem bi uporabili drugo od obeh vrst.
- Od obeh uporabljenih metod meritev fotosintetskega odziva alg na Hg^{2+} se je metoda zakasnjene fluorescence izkazala za občutljivejšo od metode merjenja fluorescenčnih parametrov.
- Pred uporabo biosenzorja na osnovi fotosintetskega odziva občutljivih alg za določanje Hg v okoljskih vzorcih, bi bilo potrebno izboljšati njegovo občutljivost in specifičnost, ali pa ustrezno prilagoditi vzorce in kontrole.
- Alge vrste *C. vulgaris* privzemajo živo srebro iz gojišča in lahko posredno ali neposredno vplivajo na pretvorbe tega elementa.
- Privzem živega srebra se je pri inkubaciji *C. vulgaris* z 1 $\mu\text{g/l}$ Hg^{2+} je pri daljšem času inkubacije kljub večji biomasi alg zmanjšal, kar kaže na možno aktivacijo odpornostnih mehanizmov.
- V gojišču s *C. vulgaris* poteka intenzivna redukcija Hg^{2+} , ki pa je v veliki meri spontane narave.
- V gojišču s *C. vulgaris* je možna metilacija Hg^{2+} .
- Za statistično podprte dokaze o vlogi alg pri speciaciji živega srebra v gojišču bi bilo potrebno narediti večje število ponovitev in vzporednih meritev.

6 POVZETEK

Živo srebro je eden od elementov, ki so za žive organizme strupeni v vseh biodostopnih oblikah. V okolju je prisotno že od nekdaj, vendar je na njegovo kroženje in akumulacijo v nekaterih ekosistemih s svojim delovanjem, na primer rudarjenjem in uporabo v industriji močno vplival človek. V obremenjenih, predvsem s kisikom omejenih vodnih sistemih, prihaja do metilacije Hg^{2+} , pri čemer nastaja organizmom še nevarnejša, v maščobah topna oblika tega elementa - MeHg , ki se kopiči v prehranjevalnih verigah.

Odkar so znani toksični učinki živega srebra na višje organizme, si človeška družba prizadeva zmanjšati vnos biodostopnih oblik elementa v okolje ter hkrati nadzirati mobilnost tistega dela Hg , ki je v okolju že prisoten. Klasične kemijske metode analize obremenjenosti različnih ekosistemov z živim srebrom se ponašajo z veliko občutljivostjo, vendar pa so drage in tehnično zahtevne. Ideja o uvedbi cenejše in enostavnejše biosenzorske analitike, ki bi pokazala okvirno količino biodostopnega deleža živega srebra v vzorcih in smiselnost nadaljnjih kemijskih meritev, ter tako morda pripomogla k nižjim stroškom analize, je gonilo za razvoj sistemov detekcije Hg preko biološkega odziva.

Biosenzorski sistemi na osnovi fotosistema II (FS II) temeljijo na meritvah jakosti fotosintetskih odzivov, ki nastanejo ob stiku inhibitornih snovi s fotosistemom alg ali cianobakterij. Eden najmočnejših inhibitorjev FS II je tudi Hg^{2+} , zato je prisotnost slednjega možno zaznati preko sprememb v fotosintetskem odzivu.

V raziskavi smo merili fotosintetske odzive na različne koncentracije Hg^{2+} pri treh vrstah alg, ki so predstavljale potencialne biološke elemente biosenzorskega sistema. Pri tem smo uporabili metodi merjenja zakasnjene fluorescence in fotosintetskih parametrov F_0 in F_m . Prva od obeh metod temelji na zaznavanju fotonov, ki se emitirajo v nekaj milisekundah oziroma sekundah po koncu osvetlitve fotosintetskega aparata zaradi povratnega toka elektronov po fotosintetski verigi, ki je vir energije za ponovno vzbuditev FS II po koncu osvetlitve. Meritve fotosintetskih parametrov pa temeljijo na zaznavi fluorescence molekul *klorofila a*, ki nastane pred ločitvijo nabojev na fotosistemu II in jo zato zaznamo v nekaj nanosekundah po osvetlitvi. F_0 je parameter minimalne fluorescence, ki jo izmerimo po temni adaptaciji alg, ko je večina fotosintetskih centrov odprta, F_m pa parameter maksimalne fluorescence, ki nastane po osvetlitvi fotosintetskega organizma s svetlobo velike jakosti.

Odziv pri najmanjših koncentracijah Hg^{2+} (2,5 $\mu\text{g/l}$) smo z metodo merjenja zakasnjene fluorescence izmerili pri vrsti *Chlorella vulgaris*. Poleg najmanjšega praga detekcije je bilo pri tej vrsti ugotovljeno tudi široko območje linearnosti odziva. Pri višjih koncentracijah HgCl_2 (nad 66,7 $\mu\text{g/l}$) smo izmerili odziv tudi pri vrsti *Oscillatoria tenuis*. Razlike med odzivi pri posameznih koncentracijah so bile v tem primeru veliko večje, vendar linearnosti znotraj merjenega območja nismo ugotovili. Alge vrste *Scenedesmus subspicatus* so se izkazale kot neobčutljive za HgCl_2 in zato neprimerne za uporabo v biosenzorskem sistemu.

Med uporabljenima metodama detekcije, se je za občutljivejšo od metode merjenja fluorescenčnih parametrov F_0 in F_m izkazala metoda merjenja zakasnjene fluorescence.

V drugem delu naloge smo preizkušali vpliv alge *C. vulgaris* na transformacije in živega srebra v gojišču. Kulturo alg smo inkubirali z 1 $\mu\text{g/l}$ Hg^{2+} ter sproti merili nastali Hg^0 , po 10 oziroma 20 urah pa še koncentracije celokupnega (Hg-T) in metilnega (MeHg) živega srebra v algah in gojišču. Pri tem smo uporabili metodi atomske absorpcijske spektrometrije hladnih par (določanje Hg-T) in atomske fluorescenčne spektrometrije hladnih par (določanje MeHg in Hg^0). Zaradi velikega obsega spontane redukcije Hg^{2+} vloge alg pri tem procesu nismo mogli opredeliti. V algah smo izmerili MeHg , pri čemer je bila njegova koncentracija po 20-urni inkubaciji večja kot po 10-urni. Nasprotno smo po daljšem času inkubacije izmerili manjšo koncentracijo celokupnega živega srebra kot po krajšem, kar v skladu z nekaterimi fotosintetskimi meritvami kaže na možnost razvoja mehanizmov tolerance, ki preprečujejo vstop Hg v celice.

Na podlagi rezultatov raziskave zaključujemo, da je izmed treh prizkušenih vrst alg, za uporabo v predlaganem biosenzorskem sistemu za detekcijo Hg glede na občutljivost ter linearnost in variabilnost odziva najprimernejša vrsta *C. vulgaris*, medtem ko je med preizkušenima metodama detekcije zaradi večje občutljivosti priporočljivejša metoda merjenja zakasnjene fluorescence.

7 VIRI

Arnold W., Davidson J.B. 1954. The identity of the fluorescent and delayed light emission spectra in *Chlorella*. *Journal of General Physiology*, 37: 677-684

Avron M., Schreiber U. 1979. Properties of ATP-induced chlorophyll luminescence in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 546: 448-454

Baldwin D.R. in Marshal W.J. 1999. Heavy metal poisoning and its laboratory investigation (review). *Annals of Clinical Biochemistry*, 36: 267-300

Bloom N.S., Fitzgerald W.F. 1988. Determination of volatile mercury species at the picogram level by low temperature gas chromatography with cold-vapour atomic fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 208: 151-161

Bernier M., Carpentier R. 1995. The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidising complex of photosystem II. *FEBS Letters*, 321: 19-23

Barkay T., Miller S. M., Summers O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 355-384

Biran I., Babai R., Levkov K., Rishpon J., Ron E.Z. 2000. Online and in situ monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium. *Environmental Microbiology*, 2: 285-290

Bontidean I., Lloyd R.J., Wilson J.R., Csöregi E., Mattiasson B., Brown N.L. 2000. Bacterial metal-resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 79: 225-229

Bontidean I., Ahlquist J., Mulehandani A., Chon W., Bae W., Mehra R.K., Mortari A., Csöregi E. 2003. Novel synthetic phytochelatin-based capacitive biosensor for heavy metal detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 18: 547-553

Bontidean I., Mortari A., Leth S., Brown N.L., Karlson U., Larsen M.M., Vangronsveld J., Corbisier P., Csöregi E. 2004. Biosensors for detection of mercury in contaminated soils. *Environmental Pollution*, 131: 255-262

Campanella L., Cubadda F., Sammartino M.P., Saoncella A. 2000. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Resources*, 35: 69-76

Castillo J., Gaspar S., Leth S., Niculescu A., Mortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneanu S.A., Ryabov A.D., Csöregi E. 2004. Biosensors for life quality. Design, development and applications. *Sensors and Actuators B*, 102: 179-194

Cerrati G., Bernhard M., Weber J.H. 1992. Model reactions for abiotic mercury(II) methylation: kinetics of methylation of mercury II by mono-, di- and tri- methylation in sea water. *Applied Organometallic Chemistry*, 6: 587-595.

Coquery M., Carvalho F.P., Azemard S., Bachelez M., Horvat M. 2000. Certification of trace and major elements and methylmercury concentrations in macroalgae (*Fucus s.p.*) reference material, IAEA-140. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366: 792-801

Corbisier P., Van Der Lelie D., Borremans B., Provoost A., De Lorenzo V., Brown N.L., Lloyd J.R., Hobman J.R., Csöregi E., Johansson G., Mattiasson B. 1999. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 387: 235-244

Cossa D., Sanjuan J., Cloud J., Stockwell P.B., Corns W.T. 1995. Automated technique for mercury determination at sub-nanogram per liter levels in natural waters. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10: 287-291

De Filippis L.F., Ziegler H. 1993. Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. *Journal of Plant Physiology*, 142: 167-172.

Drinovec L., Drobne D., Jerman I., Zrimec A. 2004. Delayed fluorescence of *Lemna minor*: A biomarker of the effects of copper, cadmium and zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72: 896-902

Durrieau C., Tran-Minh C. 2002. Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51: 206-209

European Commission Position Paper. 2001. Ambient air pollution by mercury: Health affects and risk assessments. Brussels, European Commission.

<http://ec.europa.eu/environment/air/background.htm> (2. avgust 2006): 3-28 str.

El Sheek M.M. 1999. Inhibition of the photosynthetic electron transport in the unicellular green alga *Chlorella kessleri* by mercury at multiple sites. *Cytobios*, 98: 5-37

Emteborg H., Sinemus H.W., Radziuk B., Baxter D.C., French W. 1996. Gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry - a sensitive instrumentation for mercury speciation. *Spectrochimica Acta B*, 51: 829-837

EUROCAT: IDRICAT- Soca catchment and the gulf of Trieste. Rende, Italian National Research Council. (2003)

<http://www.cs.iaa.cnr.it/EUROCAT/publications/EUROCAT%20WD27.pdf>

(2.avgust 2006):1 str.

Falter R. 1999. Experimental study on the unintentional abiotic methylation of inorganic mercury during analysis: part 1: localization of the compounds effecting the abiotic mercury methylation. *Chemosphere*, 39: 1051-1073

Fernandes J.C., Henriques F.S. 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *Botanical Review*, 57: 246-273

Fitzgerald, W.F., Gill, G.A. 1979. Subnanogram determination of mercury by two-stage gold amalgamation and gas-phase detection applied to atmospheric analysis. *Analytical Chemistry*, 51: 1714-1720

Flynn H.C., McMahon V., Diaz G.C., Demergasso C.S., Corbisier P., Meharg A.A., Paton G.I. 2002. Assessment of bioavailable arsenic and copper in soils and sediments from the Antofagasta region of northern Chile. *Science of the Total Environment*, 286: 51-59

Frense D., Muller A., Beckman D. 1998. Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilised algae cells. *Sensors & Actuators B*, 51: 256-260

George G.N., Prince R.C., Gailer J., Buttigieg G.A., Denton M.B., Harris H.H., Pickering I.J. 2005. Mercury binding to chelation therapy agents DMSA, DMPS and the rational design of custom chelators for mercury. *Chemical Research in Toxicology*, 17: 999-1006

Geresh S., Arad S., Shefer A. 1997. Chemically crosslinked polysaccharyde of the red microalga *Rhodella reticulata*- an ion exchanger for toxic metal ions. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 16: 703-708

Giardi M.T., Kobilizek M., Masojidek J. 2001. Photosystem II based biosensors for detection of pollutants. *Biosensors and Bioelectronics*, 16: 1027-1033

Gill G.A., Fitzgerald W.F. 1987. Picomolar mercury measurements in seawater and other material using stannous chloride reduction and two-stage gold amalgamation with gas phase detection. *Marine Chemistry*, 20: 227-243

Goldbeck J.H., Lein S., San Pietro A. 1977. Isolation and characterisation of sub-chloroplast particle enriched in iron-sulfur protein and P700. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 178: 140-150.

Hall D.O., Rao K.K. 1999. *Photosynthesis*. 6th ed. Cambridge, Cambridge University Press: 174 str.

Herrero R., Lodeiro P., Rey-Castro C., Vilariño, Sastre de Vicente M.E. 2005. Removal of inorganic mercury from aqueous solutions by biomass of the marine macroalga *Cystoseira baccata*. *Water Research*, 39: 3199-3210

Hideg E., Kobayashi M., Inaba H. 1990. Ultraweak photoemission from dark-adapted leaves and isolated chloroplasts. *FEBS Letters*, 275: 121-124

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

Hintelmann H., Wilken R.-D. 1994. Levels of total mercury and methylmercury compounds in sediments of polluted Elbe River: influence of seasonally and spatially varying environmental factors. *Science of the Total Environment*, 166: 1-10

Honeycutt R.C., Frogmann D.W. 1972. Inhibition of chloroplast reactions with phenylmercuric acetate. *Plant Physiology*, 49: 376-380.

Ho M.W., Musumeci F., Scordion A., Triglia A. 1998. Influence of cations in extracellular liquid on delayed luminescence of *Acetabularia acetabulum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 45: 60-66

Horvat M. 1989. Študije in razvoj analiznih metod za določanje nizkih koncentracij živega srebra in njihova uporaba pri analizi bioloških vzorcev in vzorcev iz okolja. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, Oddelek za kemijo in kemijsko tehnologijo: 155 str.

Horvat M., 1996. Mercury analyses and speciation. V: Baeyens W.: Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances. 1st ed. Amsterdam, Kluwer Academic Publishers: 1-31 str.

Horvat M., Liang L., Bloom N. 1993. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methylmercury compounds in low-level environmental samples, Part 2: Water. *Analytica Chimica Acta*, 282: 153-168

Horvat M., Byrne A.R. 1992. Preliminary study of the effects of some physical parameters on the stability of methylmercury in biological samples. *Analyst*, 117: 665-668

Horvat M. 1999. Current status and future needs for biological and environmental reference materials certified for methylmercury compounds. *Chemosphere*, 39: 1167-1179

Horvat M., Jereb V., Fajon V., Logar M., Kotnik J., Faganeli J., Hines M. E., Bonzogo J.C. 2000. Mercury distribution in water, sediment and soil in the Idrijca and Soča river systems. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*, 2: 287-296

Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae, 2004. Geneve, International Organisation for Standardisation.

<http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/ANNEXV/C03web1992.pdf>

(avgust 2006): 1 str.

Ivask A., Virta M., Kahru A. 2002. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1439–1447

Jamoussi B., Zafaouf M., BenHassine B., 1995. Hydride generation/condensation system with an inductively coupled argon plasma polychromator for simultaneous determination of arsenic, antimony, selenium, lead, mercury and tin in honey. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 61: 249-256

Janjic J., Kiurski J. 1994. Non-flame atomic fluorescence as a method for mercury traces determination. *Water Research*, 28: 233-235

Joliot P., Joliot A. 1980. Dependence of delayed luminescence upon adenosine triphosphatase activity in *Chlorella*. *Plant Physiology*, 65: 691-696

Joliot P., Joliot A., Bourges B., Barbieri G. 1971. Studies of a system II photocenters by comparative measurements of luminescence, fluorescence and oxygen emission. *Photochemistry and Photobiology*, 14: 287-305

Joly D. 2004. Electron transport in the photosynthetic membrane. Quebec, Université du Québec à Trois-Rivières.

www.uqtr.ca/labcarpentier/eng/main.htm (September 2006): 1 str.

Juneau P., Dewez D., Matsui S., Kim S.-G., Popovic R. 2001. Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metachlor by PAM-fluorimetry. *Chemosphere*, 45: 589-598

Kojima Y., Hiyama T., Sakurai H. 1987. Effect of mercurials on iron-sulfur centres of PS I of *Anacystis nidulans*. V: Progress in photosynthesis research. Biggins J. (ed.). Hague, The Hague Nijhoff/Junk: 57-60 str.

Lee S.H., Jung K.H., Lee D.S. 1989. Determination of mercury in environmental samples by cold vapour generation and atomic absorption spectrometry with gold-coated graphite furnace. *Talanta*, 36: 999-1003

Leemakers M., Baeyens W., Quevauviller P., Horvat M. 2005. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 383-393

Lehmann M., Riedel K., Adler K., Kunze G. 2000. Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using nove *Saccharomyces cerevisiae* sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 211-219

Leth S., Maltoni S., Simkus R., Mattiasson B., Corbisier P., Klimant I., Wolfbeis O.S., Csöregi E. 2002. Engineered Bacteria Based Biosensors for monitoring bioavailable heavy metals. *Electroanalysis*, 14: 35-42

Liang L., Horvat M., Bloom N. 1994. An improved speciation method for mercury by GC/CVAFS after aqueous phase ethylation and room temperature precollection. *Talanta* 41: 371-379.

Liang L., Horvat M., Cernichiari E., Gelein B., Balogh S. 1996. Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation-gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 43: 1883-1888

Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668

Mieg C., Mei W.P., Popp F.A. 1992. Technical notes to biophoton emission. V: Recent advances in biophoton research and its applications. Popp, F.A., Li, K.H., Gu, Q. (eds). Singapore, World Scientific Publishing: 197 str.

Moffet J.W., Brand L.E. 1996. Production of strong extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. *Limnology and Oceanography*, 41: 388-395

Morita H., Tanaka H., Shimomura S. 1994. Atomic fluorescence spectrometry: principles and developments. 1994. *Spectrochimica Acta*, 50B: 69-84

Murthy S.D.S., Mohanty P. 1993. Mercury ions inhibit electron transport at multiple sites in the cyanobacterium *Synechococcus 6301*. *Journal of Biosciences*, 18: 355-360.

Noiri Y., Otsuki A., Fuwa K. 1986. Determination of sub-nanogram-per-liter levels of mercury in lake water with atmospheric pressure helium microwave induced plasma emission spectrometry. *Analytical Chemistry*, 58: 544-547

Nolde N. 2000. Vsebnosti celokupnega (Hg-T) in metiliranega (MeHg) živega srebra v vzorcih iz onesneženega okolja v provinci Guizhou na Kitajskem. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. 46-48 str.

Pandard P., Vasseur P. and Rawson D.M. 1993. Comparison of two types of sensors using eukaryotic algae to monitor pollution of aquatic systems. *Water Research*, 27: 427-431

Pongratz R., Heumann K.G. 1997. Production of methylated mercury and lead by polar macroalgae-a significant natural source for atmospheric heavy metals in clean room compartments. *Chemosphere*, 36: 1935-1946

Preininger C., Wolfbeis O.S. 1996. Disposable cuvette test with integrated sensor layer for enzymic determination of heavy metals. *Biosensors and Bioelectronics*, 11: 981-990

Prokowski Z. 1993. Effects of HgCl₂ on long-lived delayed luminescence in *Scenedesmus quadricauda*. *Photosynthetica*, 28: 563-566

Ramanathan S., Shi W., Rosen B.P., Daunert S. 1998. Bacteria-based chemiluminescence sensing system using β -galactosidase under the control of the ArsR regulatory protein of the ars operon. *Analytica Chimica Acta*, 369: 189-195

Ramos J.A., Bermejo E., Zapardiel J.A., Perez L., Hernandez L. 1993. Direct determination of lead by bioaccumulation at a moss-modified carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*, 273: 219-227

Rasmussen L.D., Sorensen S.J., Turner R.R., Barkay T. 2000. Application of a mer-lux biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 639–646

Roberto F.F., Barnes J.M., Bruhn D.F. 2002: Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. *Talanta*, 58: 181-188

Robinson H.H., Crofts A.R. 1983. Kinetics of the oxidation-reduction reactions of the photosystem II quinone acceptor complex, and the pathway for deactivation. *FEBS Letters*, 153: 221-226

Roda A., Pasini P., Mirasoli M., Guardigli M., Russo C., Musiani M., Baraldini M. 2001. Sensitive determination of urinary mercury(II) by a bioluminescent transgenic bacteria-based biosensor. *Analytical Letters*, 34: 29–41

Rutherford A.W., Inoue Y. 1984. Oscillation of delayed luminescence from PS II: recombination of $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$. *FEBS Letters*, 165:163-170

Samson G., Morisette J.-C., Popovic R. 1990. Determination of four apparent mercury interaction sites in PS II by using a new modification of the Stern-Volmer analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 166: 873-878

Samson G., Popovic R. 1990. Inhibitory effects of mercury on photosystem II photochemistry in *Dunalella tertiolecta* under '*in vivo*' conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 5: 303-310

Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. V: Ecophysiology of photosynthesis. Schulze E.D., Caldwell M.M. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 94-94 str.

Schmitt D., Muller A., Csogor Z., Frimmel F.H., Posten C. 2001. The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. *Water Research*, 35: 779-785

Scordino A., Triglia A., Musumeci F., Grasso F., Rajfur Z. 1996. Influence of the presence of atrazine in water on in-vivo delayed luminescence of *Acetabularia acetabulum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 32: 11-17

Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-invasive indicator for rapid assessment of 'in vivo' photosynthesis. V: Ecophysiology of photosynthesis. Schulze E.D., Calswell M.M. Berlin, Springer-Verlag: 49-70

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

Shatkin J.A., Brown H.S., Licht S. 1995. Composite graphite ion selective electrode array potentiometry for detection of mercury and other relevant ions in aquatic systems. *Analytical Chemistry*, 67: 1147-1151

Strehler B.L., Arnold W.A. 1951. Light production by green plants. *Journal of General Physiology*, 34: 809-820

Tauriainen S., Karp M., Chang W., Virta M. 1998. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 931-938

Tibazarwa C., Corbisier P., Mench M., Bossus A., Solda P., Mergeay M., Wyns L., Van Der Lelie D. 2001. A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environmental Pollution*, 113: 19-26

Tong S. 1978. Stationary cold-vapour atomic absorption spectrometric method for mercury determination. *Analytical Chemistry*, 50: 412-414

Turyan I., Mandler D. 1993. Electrochemical mercury detection. *Nature*, 362: 703-704

Ugo P., Moretto L.M., Mazzochin G.A., 1995. Voltammetric determination of trace mercury in chloride media at glassy carbon electrodes modified with polycationic ionomers. *Analytica Chimica Acta*, 305: 74-82

Valbona C., Lean D.R.S., Scott S. 2006. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 368: 126-137

Van Wijk R., Scordino A., Triglia A., Musumeci F. 1999. 'Simultaneous' measurements of delayed luminescence and chloroplast organisation in *Acetabularia acetabulum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 49: 142-149

Wang J., Tian B. 1993. Screen-printed electrodes for stripping measurements of trace mercury. *Analytica Chimica Acta*, 274: 1-6

Weber J.H. 1993. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment. *Chemosphere*, 26: 2063-2077.

Wraight C.A., Crofts A.R. 1971. Delayed fluorescence and the high-energy state of chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 19: 386-497

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

Zrimec A., Drinovec L., Berden-Zrimec M. 2005. Influence of chemical and physical factors on long-term delayed fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 24: 309-318

ZAHVALA

Iskrena zahvala velja vodji Odseka za znanost o okolju, izr. prof. dr. Mileni Horvat, ki mi je omogočila opravljanje diplomskega dela na zanimivem področju živosrebrove analitike, pri čemer sem pridobila znanje in izkušnje tako na področju klasičnih kemijskih metod, kot tudi prve izkušnje na področju razvoja biosenzorskih sistemov. Hvala tudi za vse koristne nasvete in koordinacijo tekom dela.

Najlepša hvala dr. Alexisu Zrimcu za usmerjanje in spodbudo pri delu, konstruktiven pristop k reševanju težav ter natančen pregled diplomske naloge. Za pregled dela, izjemno prijaznost in spodbudne besede se zahvaljujem tudi prof. dr. Romani Marinšek Logar ter prof. dr. Ines Mandič Mulec.

Za pomoč in nasvete pri delu se zahvaljujem vsem sodelavcem Inštituta za fizikalno biologijo (predvsem dr. Maji Berden Zrimec ter dr. Luki Drinovcu) ter laboratorija za analitiko živega srebra na Odseku za znanost o okolju IJS (predvsem Vesni Fajon, Nuši Horvat, Darji Gibičar in Suzani Žižek).

Za štipendiranje v času študija se zahvaljujem Inštitutu Jožef Stefan.

Posebna zahvala velja Boštjanu, vsem domačim in prijateljem, ki ste vedno z mano, ko vas potrebujem in nikoli ne nehate verjeti vame!

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maša VODOVNIK

**RAZVOJ BIOLOŠKEGA SENZORSKEGA SISTEMA
ZA ZAZNAVANJE ŽIVEGA SREBRA V VODI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006