

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Neža KORON

**POVEZAVE MED ORGANSKO SNOVJO IN ŽIVIM SREBROM V  
OBALNEM MORJU IN LAGUNAH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INTERACTION OF NATURAL ORGANIC MATTER WITH  
MERCURY IN COASTAL MARINE AND LAGOON  
ENVIRONMENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 7. 12. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka Neža Koron izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Univerzitetni podiplomski študij Varstva okolja ter opravljanje doktorata znanosti. Doktorsko delo je bilo opravljeno na Morski biološki postaji Piran Nacionalnega inštituta za biologijo ter na Odseku za znanosti o okolju Instituta 'Jožef Stefan'. Delo je bilo financirano s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo Republike Slovenije oz. po novem Ministrstva za izobraževanje, znanost in šport RS. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Jadran Faganeli.

Komisija za oceno in zagovor doktorske disertacije:

Predsednik: prof. dr. Mihael Jožef Toman

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Jadran Faganeli

Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran

Član: prof. dr. Peter Bukovec

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za anorgansko kemijo

Članica: prof. dr. Milena Horvat

Institut 'Jožef Stefan', Odsek za znanosti o okolju

Datum zagovora: 6.6.2013

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

Neža Koron

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dd  
DK UDK 551.468.3:543.272.81:543.38(043.3)=111=163.6  
KG organska snov/živo srebro/obalna morja/lagune/vodni stolpec/sedimenti/pretvorbe  
AV KORON, Neža, univ. dipl. mikrobiologinja  
SA FAGANELI, Jadran (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Univerzitetni podiplomski študij Varstvo okolja  
LI 2013  
IN POVEZAVE MED ORGANSKO SNOVJO IN ŽIVIM SREBROM V OBALNEM MORJU IN LAGUNAH  
TD Doktorska disertacija  
OP XI, 138 str., 9 sl., 1 pregl., 127 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Raziskave so bile opravljene na več raziskovalnih postajah v Tržaškem zalivu in v lagunah Marano in Grado. Gre za okolja, v katerih vladajo različne fizikalne, kemijske in biološke razmere. Cilj doktorskega dela je bil preučiti povezave med organsko snovjo (OM) in živim srebrom (Hg) v omenjenih okoljih ter ugotoviti, kako različni okoljski dejavniki in različen izvor OM ter Hg vplivajo na morebitne povezave in njihov obseg. Tržaški zaliv je onesnažen s Hg iz rudnika Hg Idrija, laguni pa sta podvрženi vplivu dveh oblik Hg iz dveh ločenih virov. En je prav tako idrijski rudnik, medtem ko je drugi nedolgo nazaj delujoča kloralkalna tovarna, locirana v zgornjem delu toka reke Aussa, ki se izliva v maranski sektor lagune. Delo se je osredotočalo na povezave med OM in Hg v vodnem stolpcu in sedimentih obeh sistemov. Izkazalo se je, da je organska snov v vodnem stolpcu Tržaškega zaliva pomemben vezalec Hg in tudi drugih kovin, povezav med njimi pa v sedimentih ni bilo mogoče zaznati. Podobno se je izkazalo tudi pri analizi vzorcev iz lagun. Razlike v povezavah med OM v vodnem stolpcu in sedimentih so povezane z različno sestavo in strukturo OM, saj je v sedimentih večinoma mogoče najti močno rekalcitrantno OM, medtem ko je OM v vodnem stolpcu bolj biodostopna in vsebuje več funkcionalnih skupin, ki omogočajo vezavo kovin. V Tržaškem zalivu oz. celotnem severnem Jadranu občasno prihaja tudi do tvorbe makroagregatov, velikih skupkov OM. Raziskovanje mehanizmov njihove tvorbe in razgradnje ter sestave in strukture je izjemnega pomena, saj je s tem omogočen tudi vpogled v dinamiko naravne OM v Tržaškem zalivu. Ob analizi netopne frakcije makroagregatov so bile zaznane visoke koncentracije nekaterih kovin, kar je kazalec vključitve mineralnih delcev v strukturo. Analiza topnega dela makroagregatov je pokazala, da ima raztopljena OM makroagregatov enake lastnosti in sposobnosti vezave Hg kot naravna OM v tem okolju. Združitev metode ultrafiltracije in uporabe radioaktivnih ali stabilnih izotopov bi v prihodnje pomembno pripomogla k še natančnejšemu poznovanju mehanizmov, ki vodijo do povezav med OM in kovinami v okolju. OM ima velik vpliv na biogeokemijsko kroženje Hg, saj je pomembna z vidika napajanja mikrobnega metabolizma, s tem pa tudi tistih mikrobov, ki vodijo pretvorbe Hg. Z izvedbo eksperimentov v okoljih, v katerih ima OM različen izvor, različen izvor ima pa tudi Hg, je bila potrjena hipoteza o pomembnosti biološke dostopnosti tako OM kot Hg pri tvorbi MeHg.

## KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)

DN Dd  
DC UDC 551.468.3:543.272.81:543.38(043.3)=111=163.6  
CX organic matter/mercury/coastal waters/lagoon environment/water  
column/sediments/transformations  
AU KORON, Neža  
AA FAGANELI, Jadran (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, University postgraduate study programme in environmental protection  
PY 2013  
TI INTERACTION OF NATURAL ORGANIC MATTER WITH MERCURY IN COASTAL MARINE AND LAGOON ENVIRONMENTS  
DT Doctoral Dissertation  
NO XI, 138 p., 9 fig., 1 tab., 127 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Research was conducted in various experimental stations throughout Gulf of Trieste and Grado and Marano Lagoon. Ecosystems observed are governed by different physical, chemical and biological conditions. The main aim of this research was to investigate the existence and extent of interactions between organic matter (OM) and mercury (Hg). The influences of various environmental conditions were also studied. The most important factor in our study was the effect that the origin, thus structure and composition, of OM as well as Hg has on the existence and extent of interactions. Gulf of Trieste is contaminated with Hg from Idrija mercury mine whereas Hg found in Lagoon has two origins. One is Idrija mercury mine, while the other is chloralkali plant operating until recently and situated upstream of Aussa River. Aussa River is as an Aussa-Corno river system discharged into the Lagoon. During the research dissolved and sedimentary OM and its interactions with Hg were investigated. It turned out that dissolved OM present in water column plays an important role as Hg and other metal complexation agent, however no conclusive evidence was found that interactions between sedimentary OM and Hg exist. Similar results were obtained also on samples from the lagoon environment. It was concluded that the absence of interactions in sediments was a consequence of OM quality, meaning that its recalcitrance does not support Hg binding in the extents as water column OM does. Water column OM is apparently more bioavailable and contains functional groups more suitable for metal binding. Macroaggregates, large aggregates of OM, are relatively regularly formed in the waters of northern Adriatic, also in waters of Gulf of Trieste. Knowledge on mechanisms of macroaggregate formation and degradation is necessary, since it offers an invaluable insight into dynamics of natural OM as well. Analyses on macroaggregate matrix showed high metal concentrations which suggested an incorporation of inorganic particles, while the results on interstitial soluble portion of macroaggregates revealed similar to identical properties in terms of structure and metal binding capacity as natural OM. In future the combined usage of ultrafiltration and radioactive or stable isotopes could prove to be invaluable tool for identifying the mechanisms behind interactions between OM and Hg. OM is one of the most important actors in the biogeochemical cycle of Hg, since it serves as a fuel for microbial metabolism. It supports also the microbes responsible for transformations of Hg. The experiments performed in different environments where OM and Hg have different origins allowed us to confirm the hypothesis on importance of bioavailability of OM and Hg in the formation of MeHg.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....	III
KEY WORD DOCUMENTATION (KWD) .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO ZNANSTVENIH DEL.....	VII
KAZALO SLIK .....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC .....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
<b>1 PREDSTAVITEV PROBLEMATIKE IN HIPOTEZ .....</b>	<b>1</b>
1.1 ORGANSKA SNOV V MORSKEM OKOLJU .....	1
<b>1.1.1 Organska snov v vodnem stolpcu.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.2 Organska snov v sedimentih .....</b>	<b>10</b>
1.2 BIOGEOKEMIJSKO KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA (Hg).....	12
<b>1.2.1 Globalno biogeokemijsko kroženje Hg .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.2 Biogeokemijsko kroženje Hg v morskem okolju .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3 Povezave med organsko snovjo in Hg .....</b>	<b>16</b>
1.3 POSEBNOSTI RAZISKOVANIH OBMOČIJ .....	20
<b>1.3.1 Tržaški zaliv.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.2 Laguni Marano in Grado .....</b>	<b>22</b>
1.4 CILJI IN HIPOTEZE DOKTORSKE DISERTACIJE .....	24
<b>2 ZNANSTVENA DELA .....</b>	<b>26</b>
2.1 OBJAVLJENA ZNANSTVENA DELA.....	26
<b>2.1.1 Koron in sod., 2011. Povezave med makroagregati in živim srebrom (Hg) v obalnih vodah (Tržaški zaliv, severno Jadransko morje) .....</b>	<b>26</b>

<b>2.1.2 Koron in Faganeli, 2012. Bentoški tokovi živega srebra (Hg) med spremembami redoks razmer v neonesnaženih sedimentih Tržaškega zaliva (severno Jadransko morje) .....</b>	38
<b>2.1.3 Acquavita in sod., 2012: Živo srebro (Hg) v sedimentih lagun Marano in Grado (severno Jadransko morje): Viri, porazdelitev in kemijske zvrsti .....</b>	51
<b>2.1.4 Emili in sod., 2012: Meritve bentoških tokov živosrebrovih spojin v lagunah severnega Jadrana (laguni Marano in Grado, Italija) .....</b>	65
<b>2.1.5 Koron in sod., 2012: Potenciala metilacije in redukcije živega srebra (Hg) v morski vodi: nadgradnja metode z uporabo radioizotopa <math>^{197}\text{Hg}</math> .....</b>	80
<b>2.2 OSTALO POVEZOVALNO ZNANSTVENO DELO .....</b>	86
<b>2.2.1 Koron in sod., 2013: Povezave med kovinami in makroagregati v obalnem morju.....</b>	86
<b>3 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	112
<b>3.1 RAZPRAVA .....</b>	112
<b>3.2 SKLEPI.....</b>	118
<b>4 POVZETEK (SUMMARY) .....</b>	121
<b>4.1 POVZETEK.....</b>	121
<b>4.2 SUMMARY .....</b>	123
<b>5 VIRI .....</b>	125
<b>ZAHVALA.....</b>	139
<b>PRILOGE .....</b>	140

## KAZALO ZNANSTVENIH DEL

	str.
OBJAVLJENA ZNANSTVENA DELA .....	26
Koron in sod., 2011. Povezave med makroagregati in živim srebrom (Hg) v obalnih vodah (Tržaški zaliv, severno Jadransko morje).....	26
Koron in Faganeli, 2012. Bentoški tokovi živega srebra (Hg) med spremembami redoks razmer v neonesnaženih sedimentih Tržaškega zaliva (severno Jadransko morje).....	38
Acquavita in sod., 2012: Živo srebro (Hg) v sedimentih lagun Marano in Grado (severno Jadransko morje): Viri, porazdelitev in kemijske zvrsti .....	51
Emili in sod., 2012: Meritve bentoških tokov živosrebrovih spojin v lagunah severnega Jadrana (laguni Marano in Grado, Italija).....	65
Koron in sod., 2012: Potenciala metilacije in redukcije živega srebra (Hg) v morski vodi: nadgradnja metode z uporabo radioizotopa $^{197}\text{Hg}$ .....	80
OSTALO POVEZOVALNO ZNANSTVENO DELO .....	86
Koron in sod., 2013: Povezave med kovinami in makroagregati v obalnem morju .....	86

## KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Poenostavljena shema globalnega biogeokemijskega kroženja C. (povzeto in prirejeno po <a href="http://globecarboncycle.unh.edu/CarbonCycleBackground.pdf">http://globecarboncycle.unh.edu/CarbonCycleBackground.pdf</a> ) .....	2
Slika 2: Shema, ki predstavlja mikrobno črpalko C (povzeto in prirejeno po Jiao in sod., 2010). .....	3
Slika 3: Biogeokemijsko kroženje OM v oceanih (povzeto in prirejeno po Libes, 2009) ....	5
Slika 4: Velikostna porazdelitev OM, prisotne v vodnem stolpcu (povzeto in prirejeno po Azam in Malfatti, 2007, Verdugo in sod., 2004).....	6
Slika 5: Shema biogeokemijskega kroženja Hg v morskem okolju (povzeto in prirejeno po Barkay in sod. 2003) .....	15
Slika 6: Speciacija $Hg^{2+}$ v oksičnem vodnem okolju kot ga opisuje kompleksacijski model Hg-Cl-organski ligand (L) (povzeto in prirejeno po Fitzgerald in sod., 2007). ....	19
Slika 7: Shema raziskovalnega področja Tržaškega zaliva z označenimi raziskovalnimi točkami in izmerjenimi vrednostmi Hg v sedimentih (povzeto in prirejeno po Covelli in sod., 2001).....	21
Slika 8: Shema raziskovalnega področja v lagunah Grado in Marano z označenimi raziskovalnimi točkami (povzeto in prirejeno po Emili in sod., 2012) .....	22
Slika 9: Porazdelitev koncentracij THg v lagunah Grado in Marano (povzeto po Acquavita in sod, 2012).....	23

## KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Preferenca posameznih kovin do osrednjega atoma vezavne skupine liganda (povzeto po Hughes in Poole, 1996) .....	17
---	----

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

OM	organic matter – organska snov – vsa organska snov, ki jo najdemo v okolju, pri čemer nas njen izvor in sestava ter struktura specifično ne zanima
DIC	dissolved inorganic carbon – raztopljen anorganski ogljik
DIN	dissolved inorganic nitrogen – raztopljene anorganski dušik
DOM/DOC	dissolved organic matter (carbon) – raztopljena organska snov – vsa organska snov, manjša od 0,2 µm/0,45 µm
RDOM	recalcitrant dissolved organic matter – rekalcitrantna raztopljena organska snov – močno spremenjena organska snov, odporna proti pretvorbam
MCP	microbial carbon pump – mikrobná črpalka C, pojem, ki opisuje skupek bioloških procesov pretvorbe CO <sub>2</sub> v OM v vodnem stolpcu oceanov
COM	colloidal organic matter – koloidna organska snov – organska snov, definirana v velikostnem razredu 1 kDa – 0,2 µm (operativna definicija)
koloid	v tem doktorskem delu uporabljen kot sopomenka COM
FDOM	fluorescent dissolved organic matter – fluorescirajoča raztopljena organska snov
HMW-DOM	high-molecular weight DOM – DOM z veliko molekulsko maso – organske molekule, večje od 1 kDa – izraz pomeni enako kot COM ali v našem primeru koloid
LMW-DOM	low-molecular weight DOM – DOM z nizko molekulsko maso – organske molekule, manjše od 1 kDa – nekateri jim pravijo tudi 'truly dissolved' organska snov
POM/POC	particulate organic matter (carbon) – suspendirana organska snov – vsa organska snov, večja od 0,2 µm/0,45 µm
HS	huminske snovi
EPS	extracellular polymer substances – ekstracelularne polisaharidne snovi, makromolekule
ASGM	artisanal and small scale gold mining – majhni, po navadi nelegalni rudnika zlata, kjer se za njegovo pridobivanje uporablja postopek amalgamacije s Hg; eden najpomembnejših antropogenih virov Hg v atmosfero

Hg	živo srebro, uporabljeno tudi pri opisu vseh oblik živega srebra
THg	celokupna koncentracija živega srebra v vzorcu
MeHg	koncentracija metilnega živega srebra v vzorcu
RHg	reakтивno živo srebro
Hg <sup>0</sup>	elementno živo srebro
DMHg	dimetilno živo srebro
DGM	dissolved gaseous mercury – vse plinaste oblike Hg, ki jih najdemo v vodni raztopini
SWI	sediment-water interface – meja med sedimentom in vodo, mesto, kjer potekajo najaktivnejše pretvorbe kemijskih zvrsti
bentoški tok	vertikalni (pre)tok različnih kemijskih spojin med sedimentom in vodnim stolpcem, ki ga poganja difuzija oz. koncentracijski gradient

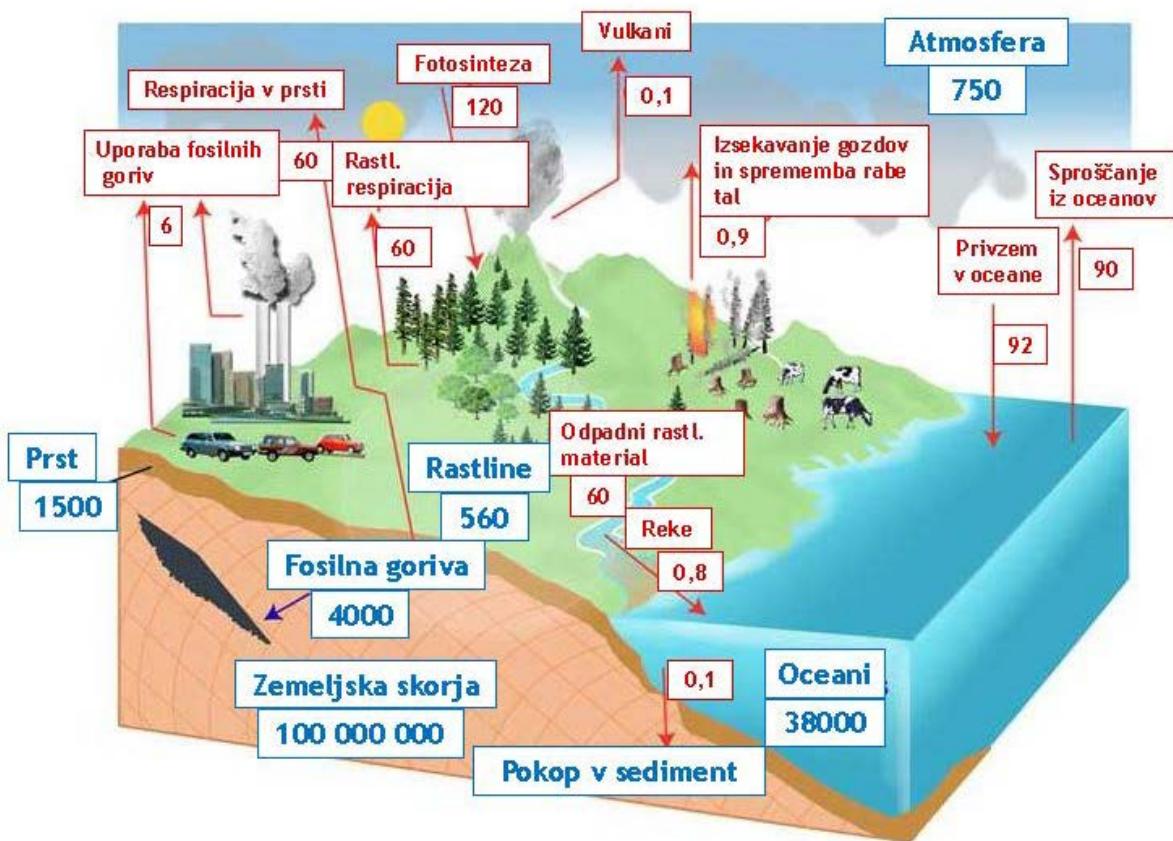
## 1 PREDSTAVITEV PROBLEMATIKE IN HIPOTEZ

### 1.1 ORGANSKA SNOV V MORSKEM OKOLJU

Morsko okolje oz. oceani predstavljajo največji biološko aktiven rezervoar v globalnem kroženju ogljika (C). C je element, ki s še drugimi elementi, kot so kisik (O), vodik (H), dušik (N), kalcij (Ca), žveplo (S) in fosfor (P) tvori živo snov oz. organizme. Poleg oceana med rezervoarje C v okolju uvrščamo še atmosfero, prst, sedimente in zemeljsko skorjo. V rezervoarjih, ki delujejo kot velike zaloge C, potekajo biotske in abiotske pretvorbe, ki vodijo v spremembe v obliki C. S tem, ko C spremeni obliko (kemijsko strukturo, agregatno stanje, ipd.), lahko en rezervoar zapusti in vstopi v drugega, čemur pravimo tok ali fluks C. Po navadi ga izražamo kot hitrost oz. prenos količine neke snovi v enoti časa ( $\text{g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ali  $\text{kg km}^{-2} \text{ leto}^{-1}$ ). Tokovi povezujejo rezervoarje med seboj, med dvema rezervoarjem pa lahko teče več tokov, pri čemer je njihova smer lahko različna. Tokovi določajo tudi velikosti posameznih rezervoarjev.

Oceani naj bi vsebovali kar 38 000 Pg (1 Pg =  $10^{15}\text{g}$ ) C, večinoma prisotnega kot raztopljeni anorganski C (DIC – dissolved inorganic carbon) v globljih delih oceanov. V ravnotežnih razmerah naj bi DIC tako predstavljal kar 56-kratno količino vsega C v atmosferi (Schlesinger, 1997). Veliko manjša količina, okoli 1000 Pg, naj bi ga bilo prisotnega v zgornje ležečem, premešanem sloju oceanov. Gre za C, ki se preko delovanja difuzije in bioloških procesov aktivno izmenjuje z atmosfero. Kljub temu da gre za zelo dinamičen del rezervoarja, lahko pomemben del C uide kroženju in se prenese v globlje dele oceanov, kjer ostane nedotaknjen daljša časovna obdobja.

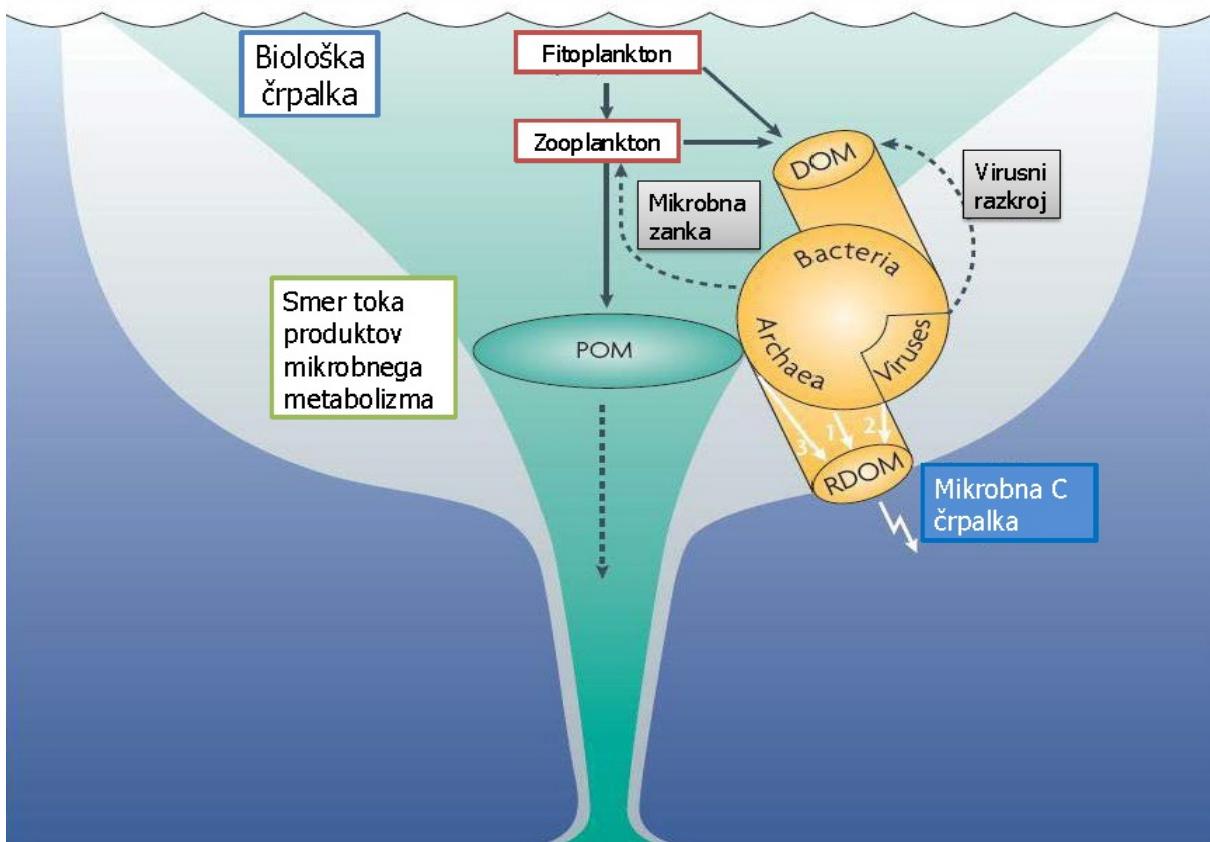
Biogeokemijsko kroženje C, shematično predstavljeno na [Sliki 1](#), je nedvomno zelo kompleksen skupek procesov, s katerim so povezana kroženja še drugih elementov, med drugim tudi Hg.



Slika 1: Poenostavljena shema globalnega biogeokemijskega kroženja C. Modri napiši prikazujejo velikosti rezervoarjev (v Pg,  $Pg = 10^{15}$  g), rdeči napiši prikazujejo tokove (v  $Pg y^{-1}$ ) (povzeto in prizerno po <http://globecarboncycle.unh.edu/CarbonCycleBackground.pdf>)

V morskem okolju je C prisoten v štirih oblikah: v obliki DIC, kot raztopljeni organski C (DOC/DOM – dissolved organic carbon/matter), suspendirani organski C (POC/POM – particulate organic carbon/matter) in kot morska biota. Pri tem naj bi DOM vsebovala približno enako količino C kot atmosfera ( $700 : 750$  Pg). O pomembnosti rezervoarja v obliki DOM govori podatek, da bi neto oksidacija le 1 % DOM v atmosfero prispevala enako količino  $CO_2$ , kot ga letno prispeva človeštvo z uporabo fosilnih goriv (Hedges, 2002). Ena najbolj aktualnih tem v svetu organske snovi (OM – organic matter) v morskem okolju je pojem mikrobne črpalke C (MCP – microbial carbon pump, shematično prikazana na [Sliki 2](#)), ki so ga Jiao in sod. (2010) vpeljali kot nadgradnjo pojma biološke črpalke, saj naj slednja ne bi zadostno poudarjala pomembnosti mikroorganizmov pri tvorbi težko razgradljive oz. rekalcitrantne organske snovi (RDOM – recalcitrant dissolved

organic matter). Vloga RDOM predstavlja pomemben rezervoar C v globljih delih vodnega stolpca oceanov.



Slika 2: Shema, ki predstavlja mikrobično črpalko C (povzeto in pritejeno po Jiao in sod., 2010).

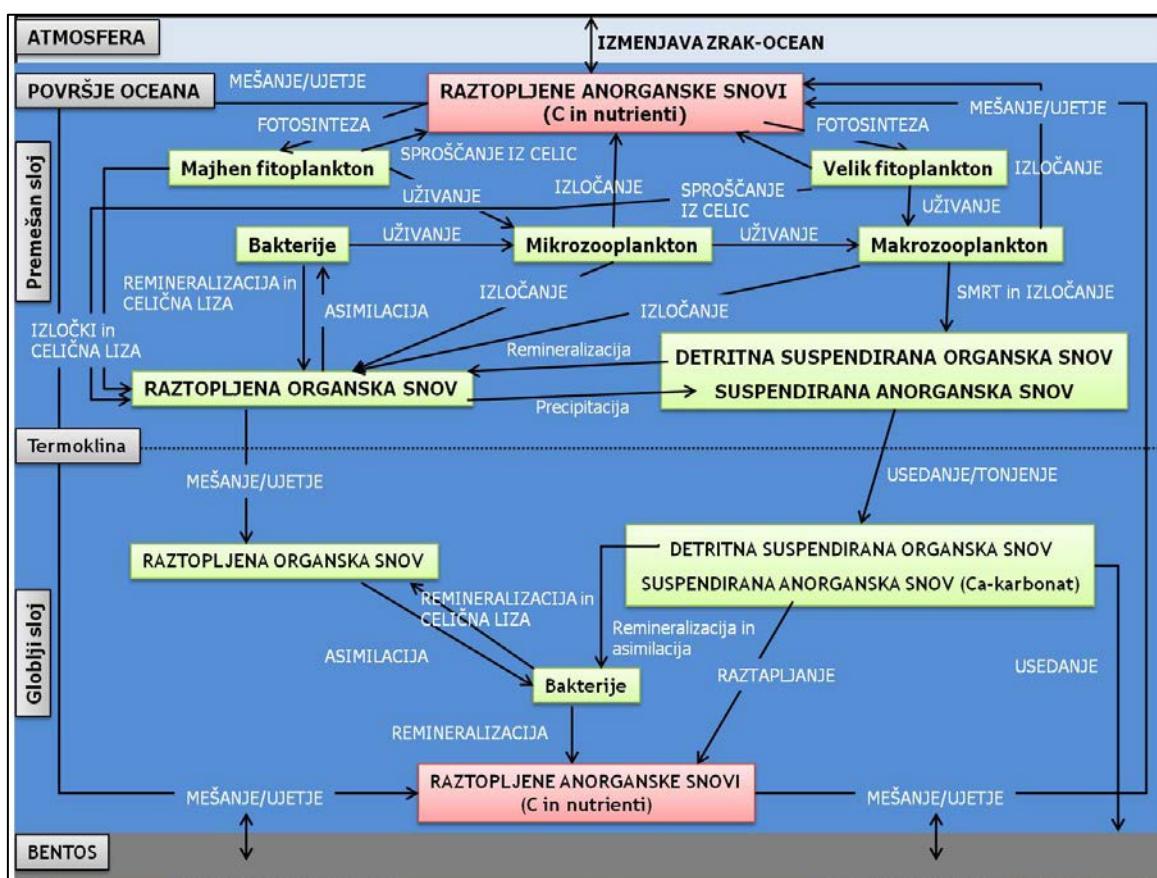
Biološka črpalka C je nekoliko zastarel opis skupka procesov, s katerimi se  $\text{CO}_2$  v evfotski ali osvetljeni coni oceanov v procesu fotosinteze fiksira v OM in od tam z usedanjem prenaša v globine, kjer je na razpolago heterotrofnim mikrobnim pretvorbam. Biološka črpalka predvideva, da je heterotrofna pretvorba nastale organske snovi, imenovana tudi remineralizacija, 100 %, kar pomeni, da ob njeni razgradnji nastajajo  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  in anorganski nutrienti, ki so ponovno na razpolago avtotrofnim organizmom. C naj bi se v procesu biološke črpalke iz vodnega stolpca s sedimentacijo na morsko dno odstranjeval le v obliki netopnega karbonata. Mnogo novejših študij pa je pokazalo, da je večina DOM v oceanskem okolju na globinah, večjih od 1000 m, refraktorne. Zaradi tega je nedostopna bakterijski razgradnji, oz. bi bila razgradnja mogoča le v omejenem obsegu ob izdatni pomoči fotokemijskih reakcij (ki v teh globinah niso več mogoče). Iz tega razloga so leta 2010 vpeljali pojem mikrobne črpalke C. Definirali so jo kot skupino bioloških procesov,

preko katerih prihaja do fiksacije CO<sub>2</sub> v OM, ki se nato prenaša v globine oceanov. Ob transportu v globino prihaja do njene delne remineralizacije, nekaj OM pa se delno razgrajene oz. nerazgrajene v obliki RDOM poseda proti dnu. Gre za pomemben proces, ki v dolgih geoloških obdobjih pomembno prispeva k zmanjšanju celokupnih količin C. Po nekaterih ocenah naj bi ta tok predstavljal kar 15-20 % vsega iz globalnega kroženja odstranjenega C (Emerson in Hedges, 2008; Hansell in Carlson, 1998), povprečna starost RDOM pa je ocenjena na 4000 do 6000 let. Rezervoar C v obliki RDOM naj bi bilo po velikosti primerljiv rezervoarju C kot CO<sub>2</sub> v atmosferi (Carlson, 2002 in tam navedeni članki).

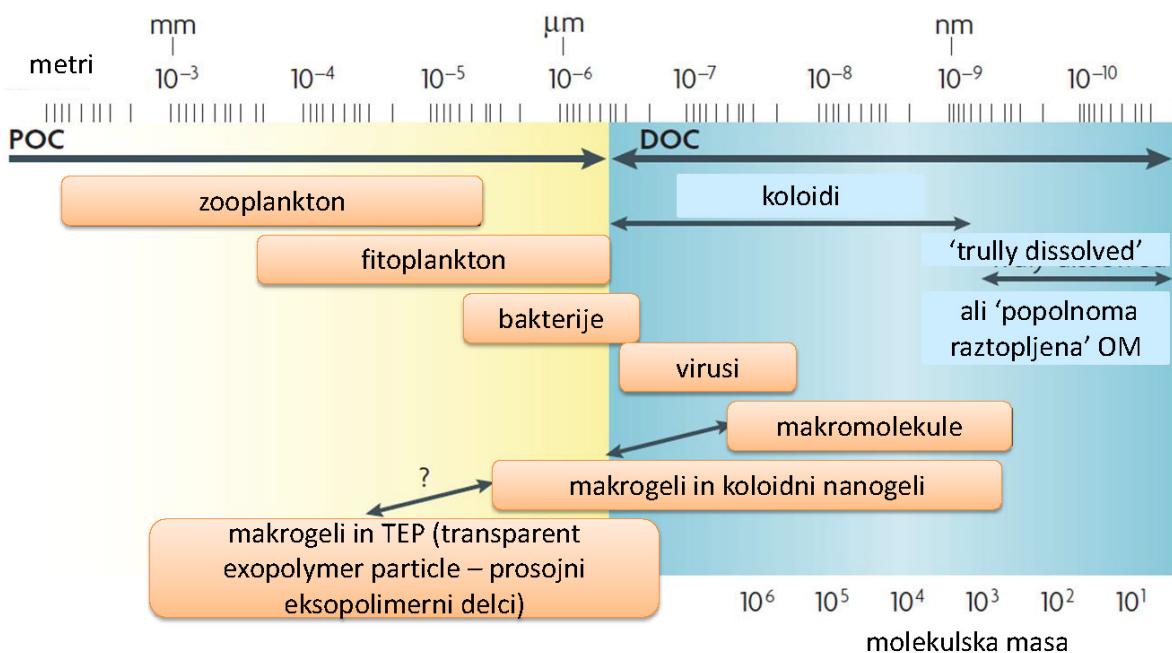
### **1.1.1 Organska snov v vodnem stolpcu**

Organsko snov v vodnem stolpcu bi lahko razvrstili v tri glavne razrede, in sicer v DOC/DOM, POC/POM in morsko bioto, pri čemer naj bi DOM predstavljala kar 97 % vse OM v oceanih (Benner, 2002). V pričujočem doktorskem delu smo se ukvarjali predvsem s to frakcijo. Razlika med POM in DOM je definirana operativno, saj med DOM uvrščamo tisto organsko snov, ki prehaja 0,45 µm velike pore filtrov, medtem ko se POM na njih zadrži (nekatere zgodnejše raziskave uporabljajo tudi filtre z 0,7 µm porami). Tako fitoplankton in veliko večino morskih bakterij uvrščamo med POM, medtem ko nekatere vrste bakterij, virusi, huminske snovi ter organski polimeri (beljakovine, sestavljeni ogljikovi hidrati, itd.) in monomeri (aminokisline, maščobne kisline, ogljikovi hidrati, ekstracelularne makromolekule, ki jih izločajo celice (EPS – extracellular polymer substances), ipd.), spadajo v skupino DOM (Nebbioso in Piccolo, 2013) ([Slika 4](#)). Pomembna frakcija DOM je koloidna organska snov (COM – colloidal organic matter), ki je prav tako definirana operativno, saj gre za molekule, ki so večje od 1 kDa (ali približno 1 nm, kolikor znaša krogelni premer makromolekule z maso 1 kDa) in manjše od 0,45 oz. 0,2 µm. COM naj bi po nekaterih ocenah predstavljala približno tretjino vse DOM (Benner in sod., 1992), zato njenega obstoja in funkcije v morskem okolju ne gre zanemariti. Nekateri avtorji DOM delijo v nizkomolekularne (LMW – low molecular weight DOM) in visokomolekularne spojine (HMW – high molecular weight DOM), s čemer poudarjajo, da gre za ločevanje molekul na podlagi velikosti (Benner, 1991; Benner in sod., 1992). HMW-DOM je definirana enako kot koloidi oz. COM, LMW-DOM pa kot resnično raztopljenja

snov (angl. 'truly dissolved'). Definiranje oz. ločevanje molekul na osnovi velikosti je uporabno s praktičnega vidika, z vidika njihove funkcije v okolju pa takšno razlikovanje posedeje zelo malo informacij (Gustafsson in Gschwend, 1997). HMW-DOM je bolj 'bioaktivna' in dostopna razgradnji kot LMW-DOM (Amon in Benner, 1996). LMW-DOM, ki se akumulira v okolju in ne vstopa v mikrobnii metabolizem, naj bi spontano agregirala v večje molekule (Chin in sod., 1998; Zoppini in sod., 2005), za katere je značilno, da jim strukture celo z današnjimi analiznimi metodami skoraj ni mogoče določiti. Tako nastale makromolekule po definiciji sodijo v skupino RDOM.



Slika 3: Biogeokemijsko kroženje OM v oceanih (povzeto in prirejeno po Libes, 2009)



Slika 4: Velikostna porazdelitev OM, prisotne v vodnem stolpcu (povzeto in prizerno po Azam in Malfatti, 2007, Verdugo in sod., 2004)

DOM, ki jo najdemo v morjih in oceanih, sestavlja t.i. avtohtona in alohtona OM, kar pomeni, da izvirata iz morskega okolja in s kopnega. Avtohtona je tista, ki nastaja v morskem stolpcu in se v okolje sprošča pri procesih izločanja iz celic fitoplanktona, pri površni 'paši' protozoojev (angl. 'grazer sloppy feeding'), pri virusni lizi bakterijskih celic ter bakterijski lizi fitoplanktona in pri bakterijskih pretvorbah ter sproščanju OM (Carlson, 2002). Alohtona pa nastaja ob razgradnji OM višjih rastlin in tudi živali, torej kopenske OM, njen vpliv pa je opaznejši v lagunah, estuarijih in obalnih morjih, saj v ta okolja vstopa predvsem z rekami. OM je v morju podvržena kemijskim in biološkim pretvorbam. Mineralizacija ali pa le delne pretvorbe, in agregacija v refraktorno obliko predstavljajo pomemben ponor C. Avtohtono in alohtono DOM je mogoče med seboj razlikovati, saj je njuna struktura zaradi izvora samega in zaradi delovanja številnih okoljskih dejavnikov različna. Avtohtono DOM v grobem sestavlja 25-50 % beljakovin, 5-25 % lipidov in okoli 40 % ogljikovih hidratov, medtem ko je struktura alohtone DOM lahko zelo raznolika, saj je odvisna predvsem od strukture in sestave izvorne OM. Po navadi takšna OM vsebuje več ogljikovih hidratov, med katerimi prevladuje celuloza, vsebuje pa tudi lignin (15-25 %) ter druge makromolekule (Nebbioso in Piccolo, 2013). Prisotnost oz. odsotnost lignina se pogosto uporablja kot biomarker za prisotnost alohtone OM (Ertel in sod., 1986; Opsahl in

sod., 1999). Proteini in ogljikovi hidrati kot biomarkerji niso najbolj primerni, saj so mikrobov lažje dostopni in tako bolj podvrženi razgradnji. To so pokazali že Benner in sod. (1992), ki so dokazali, da se celokupna vsebnost ogljikovih hidratov v vodnem stolpcu oceanov z globino manjša, medtem ko se vsebnost aromatskih funkcionalnih skupin povečuje. Nekatere študije kažejo, da je kar 50 % vsega C v HMW-DOM v vrhnjem delu vodnega stolpca oceanov prisotnega v obliki ogljikovih hidratov, medtem ko ta odstotek v spodnjih delih vodnega stolpca znaša le še okoli 25 %. Rezultati nakazujejo dejstvo, da so ogljikovi hidrati v vodnem stolpcu najbolj 'reakтивni' oz. dostopni heterotrofnemu metabolizmu.

Ogljikovi hidrati igrajo pomembno vlogo v obalnih morskih okoljih, saj naj bi sodelovali tudi pri prečnem povezovanju večjih molekul, kar lahko vodi v nastanek velikih organskih agregatov v vodnem stolpcu (Ahel in sod., 2005), medtem ko nekatere druge raziskave kažejo, da vlogo prečnih povezav pogosto zavzemajo tudi kovinski ioni (Chin in sod., 1998; Doucet in sod., 2007).

Huminske snovi (HS), definirane kot velike, močno spremenjene molekule, nastale ob razgradnji OM, so najbolj zastopane v prsti in sedimentih, vendar jih je mogoče najti tudi v vodnem stolpcu (Jones in Bryan, 1998). Glede na topnost v kislinah oz. bazah jih delimo v huminske kisline, fulvinske kisline in humin. HS v vodnem stolpcu predstavljajo 10-20 % vse DOM, od tega je kar 50 % fulvinskih kislin (Bronk, 2002). Nekateri avtorji navajajo višje odstotke, tudi do 50 % (Jones in Bryan, 1998). Med HS v površinskem sloju oceanov in tistimi v globljih slojih naj ne bi bilo pomembnih razlik v strukturi, kar kaže na izrazito refraktornost teh molekul. Nekateri avtorji (Bronk, 2002) temu nasprotujejo in trdijo, da so določeni organizmi sposobni uporabe N v HS. Obstajali naj bi trije mehanizmi, s katerimi se sprošča vezani N: ob delovanju bakterijskega metabolizma, ob delovanju specifičnih površinskih encimov fitoplanktona in preko fotorazgradnje HS v LMW-DOM.

Vloge, ki jih DOM zavzema v morskem okolju, so zelo različne (Hirose, 2007; Nebbioso in Piccolo, 2013), saj lahko igra vlogo kelatorja kovin in s tem vpliva na njihovo topnost, transport in strupenost, igra pomembno vlogo pri transportu organskih onesnažil, sodeluje pri tvorbi koloidne snovi in vpliva na njihove površinske lastnosti, sodeluje pri

fotokemijskih reakcijah, sodeluje pri kroženju in dostopnosti nutrientov, vpliva na pufrsko kapaciteto sistema in na razporeditev ionov med raztopljeno in trdno fazo.

Vloga COM v morskem okolju je z vidika vezave kovinskih kationov izjemnega pomena, saj tvorba kompleksov z organskimi ligandi vpliva na kemijsko speciacijo elementa. Organiskih ligandov, ki močno vežejo kovine, je v morskem okolju sicer zelo malo (v nM koncentracijskem območju), vendar so konstante vezave velikostne razrede večje kot ob 'navadni' kationski vezavi na negativno nabite funkcionalne skupine (Wells, 2002). Nekateri izsledki kažejo, da vezava kovin na COM ni nujno reverzibilna oz. v dinamičnem ravnovesju z raztopino, temveč lahko prihaja do tvorbe kompleksnih sekundarnih in terciarnih struktur, pri čemer se kovine 'vgradijo' v organsko strukturo. S tem naj se stabilnostna konstanta in specifičnost kompleksa kovina-ligand ne bi spremajala, spremajala naj bi se le hitrost izmenjave kovine z okolico (Wells in sod., 2000). Razlage, zakaj oz. kako posamezni organski ligandi specifično vežejo neko kovino, še ni, vendar raziskovalci domnevajo, da je sposobnost odvisna predvsem od izvora določenega liganda. Bakterije so namreč sposobne tvorbe sideroforov, s katerimi v okolju iščejo in vežejo Fe in ta molekula lahko v nekaterih situacijah tvori zametek DOM, ki bo nadalje agregirala v COM, njena sposobnost specifične vezave, v tem primeru Fe, pa se bo ohranila (Wells, 2002). Neposredna interakcija med kovinami in bakterijskimi celicami lahko poteka tudi preko funkcionalnih skupin, ki jih vsebuje EPS, ki ga celice izločajo. Pomembne so zlasti hidroksilne, karboksilne, fosfatne, aminске, amidne in nitrilne (Zhang in sod, 2010). Interakcije potekajo tudi na nivoju membranskih proteinov, ki v svojih aktivnih mestih vsebujejo sulfhidrilne funkcionalne skupine. Bakterije so med evolucijo razvile npr. tudi detoksifikacijski mehanizem, s katerim se branijo pred negativnimi posledicami, ki bi jih lahko na delovanje njihovega metabolizma imel Hg. Glavna naloga encimskega kompleksa Mer, katerega zapis se nahaja na operonu *mer*, je vezava anorganskega Hg ali MeHg ter njegova redukcija v inertno  $Hg^0$  ali nastanek  $Hg^{2+}$  (Barkay in sod., 2003). V membrani celic, ki so odporne proti Hg oz. imajo operon *mer*, se nahaja tudi transmembranski protein MerT, katerega naloga je specifična vezava Hg in nadaljnji transport v notranjost celice.

Izjemen izziv za raziskovalce tako ostaja opis oz. določitev sestave in strukture DOM, saj zaradi nezadostnega poznavanja njene strukture in izvora ne moremo napovedati oz.

predvideti obsega vezave kovin v morskem okolju. Ta obseg pa se lahko s časom še spreminja. Kljub vsem analiznim metodam, ki so na razpolago, pri delu z DOM še vedno predstavlja ozko grlo izolacija zadostnih količin OM za vse potrebne analize. V vodnem stolpcu je DOC zelo malo, saj se koncentracije gibljejo nekje med 0,5 in 2 mg L<sup>-1</sup> (Hedges, 2002), podobno velja tudi za Tržaški zaliv, kjer se koncentracije gibljejo okoli 1 mg L<sup>-1</sup> (De Vittor in sod., 2008; Pettine in sod., 2001).

Sezonsko dinamiko DOC v Tržaškem zalivu so podrobno opisali De Vittor in sod. (2008) ter Fonda Umani in sod. (2007). Izpostavili so predvsem tipični zimski minimum koncentracij DOC in poznoletni maksimum. Pokazali so, da so za Tržaški zaliv značilna nihanja v temperaturi in slanosti, ta pa je odvisna tako od temperature kot tudi od pretoka reke Soče, ki je glavni pritok v Tržaški zaliv. Vzporedno raziskovanje OM v lagunskem in morskem okolju je nujno, saj na njeno obliko in obnašanje vplivajo že majhne spremembe v pH, koncentraciji ionov ali temperature. Te spremembe se lahko odražajo kot spremembe v velikosti (tvorba gelov), gostoti, reaktivnosti in fizikalno-kemijskih lastnostih, kar se pomembno odraža v interakcijah z organizmi in njihovimi encimi (Tanaka, 1992). V Tržaškem zalivu korelacije med produkcijo fitoplanktona in akumulacijo DOC v vodnem stolpcu ni mogoče zaznati, iz česar je mogoče sklepati, da je obseg akumulacije pogojen še z drugimi okoljskimi in biološkimi dejavniki. So pa Fonda Umani in sod. (2007) opazili, da maksimalne vrednosti DOCsovpadajo z maksimalno bakterijsko produkcijo, kar kaže na nepopolno bakterijsko porabo DOC ter tvorbo RDOM.

Svetloba v relativno plitvem obalnem morju, kakršen je Tržaški zaliv, praviloma sega do dna, kar omogoča razvoj in obstoj aktivne bentoške populacije fototrofnih organizmov. Delež izločenega DOC proti aktivnosti primarne bentoške produkcije naj bi po nekaterih podatkih (Goto in sod., 1999) predstavljal tudi 70 % in bil s tem mnogo pomembnejši od fitoplanktonskega.

Posebnost Tržaškega zaliva je tudi v tem, da v njem prihaja do nastanka makrogelov oz. makroagregatov, večinoma sestavljenih iz heteropolisaharidov, ki jih v okolje izloča fitoplankton (Koron in sod., 2011; Kovač in sod., 1998, 2002, 2004, 2008). Pojav tvorbe makrogelov ni omejen le na Tržaški zaliv, temveč se pojavlja po celotnem severnem

Jadranu, prav tako pa so ga opisali tudi v nekaterih drugih obalnih morjih (Kovač in sod., 2008). Posebnost Tržaškega zaliva je predvsem razsežnost pojava. Proizvodnja DOM naj bi se izdatno povečala, kadar fitoplanktonu primanjkuje nutrientov, pri tem pa naj bi k akumulaciji DOM v vodnem stolpcu prispevala tudi zmanjšana sposobnost vgradnje C v celične strukture ter zmanjšana aktivnost heterotrofnih organizmov, ki so prav tako podvrženi prehranskemu stresu (Pettine in sod., 2001; Turk in sod., 2010).

### **1.1.2 Organska snov v sedimentih**

V sedimentih je potrebno ločiti med OM, ki je prisotna v pornih vodah sedimentov, in OM, ki je prisotna v trdni fazi sedimentov. OM, ki jo najdemo v pornih vodah sedimentov, ima načeloma enako vlogo kot OM v vodnem stolpcu, sestava in struktura pa se lahko razlikujeta. Je zelo kompleksna zmes spojin zelo različnih velikosti. Izvorno gre lahko za OM, ki se je v sedimente posedla iz vodnega stolpca in za OM, ki je nastala *in situ* z delovanjem bentoških avtotrofnih in fototrofnih organizmov. Slednja je v Tržaškem zalivu pomembna, saj gre za plitev morski bazen, v katerem svetloba, ki sega do tal, omogoča razvoj in obstoj fototrofnih mikrobnih združb (De Vittor in sod., 2008). OM, ki se v sedimente oceanov poseda iz vodnega stolpca, imenujmo močno rekalcitrantna snov, ki ji je težko pripisati strukturo. Po nekaterih ocenah (Nebbioso in Piccolo, 2013) naj bi takšna organska snov predstavlja kar 80 % vse OM v sedimentih. Kopičenje OM v globljih delih sedimentov potrjuje tezo, da gre za težko razgradljivo snov, saj bi v nasprotnem primeru s povečevanjem globine opazili njeno porabljanje (Burdige, 2002). Vendar pa tok OM ni enosmeren, temveč lahko v vrhnjih delih sedimentov prihaja do razgradnje labilne OM, razpadni produkti pa se lahko sproščajo v zgoraj ležeči vodni stolpec, kar potrjujejo tudi povisane koncentracije DOM nad sedimentom. Končni produkti razgradnje HMW-DOM so navadno LMW-DOM, kot so na primer kratkoverižne organske kisline. Te pa lahko v sedimentih služijo kot vir energije in C v procesih denitifikacije in sulfatne redukcije (Burdige, 2002). Slednja je najpomembnejši anaerobni mikrobeni proces v sedimentih obalnih morij, tudi v Tržaškem zalivu (Hines in sod., 1997).

V lagunskem okolju, kjer je vnos z rekami izjemnega pomena, igra pomembno vlogo alohtona OM. Zanjo je značilna večja vsebnost kompleksnih polimernih molekul z

relativno nižjo vsebnostjo N (celuloza, hemiceluloza in lignin) in večjo vsebnostjo aromatskih funkcionalnih skupin (Ertel in sod., 1986; Opsahl in sod., 1999).

V sedimentih je pomembna tudi interakcija OM z mineralnimi delci. Z manjšanjem velikosti delcev se povečuje njihova aktivna površina, kjer te interakcije potekajo. Ob prisotnosti mineralnih delcev in trivalentnih kovinskih kationov lahko prihaja do nekakšne zaščite organske snovi pred razgradnjo (Baldock in sod., 2004; Hedges in sod., 2001, Ogrinc in sod., 2005). Še posebno pomembne mineralne strukture so silikati ter Fe in Mn oksidi in hidroksidi. OM, ki je tako vezana na mineralne delce oz. z njimi, se bo v okolje sprostila šele, ko bo prišlo do raztplavljanja mineralne faze, ki jo ščiti pred delovanjem encimov.

HS so najpogosteje raziskovana in opisana OM v trdni fazi sedimentov, poleg tega tudi glavna oblika C. Kljub njihovi pregovorni refraktornosti lahko deluje stimulativno na fitoplankton, in sicer kot donor elektronov v reakcijah fotooksidacije (Zepp in sod., 1987). Poleg tega pa lahko sodelujejo tudi v biogeokemijskem kroženju različnih kovin ter tudi nekaterih organskih polutantov (Poerschmann in sod., 2007). HS v grobem delimo v tri skupine glede na njihovo topnosti in adsorpcijske lastnosti. Huminske kisline so topne v bazičnih topilih, fulvinske so topne tako v bazičnih kot kislih topilih, medtem ko humin ni topen ne v bazah ne v kislinah. Na splošno lahko rečemo, da se v morskih sedimentih pojavljajo predvsem huminske kisline in humin, fulvinske kisline pa so bolj mobilne in predstavljajo pomemben del DOM vodnega stolpca (Tipping, 2004). Giani in sod. (2010) so ob analizi HS v Severnem Jadranu prišli do zaključkov, da lahko te v anoksičnih pogojih igrajo pomembno vlogo končnega elektronskega akceptorja v anaerobnem mikrobnem metabolizmu.

## 1.2 BIOGEOKEMIJSKO KROŽENJE ŽIVEGA SREBRA (Hg)

### 1.2.1 Globalno biogeokemijsko kroženje Hg

Hg uvrščamo med globalne onesnaževalce, saj kompleksna biogeokemija spodbuja njegovo neprestano kroženje z zemeljske površine v atmosfero in nazaj. Zaradi prisotnosti v atmosferi in posledičnega sproščanja na površino tako nobeno okolje ne ostane neprizadeto. Hg je v okolju že naravno prisotno, vendar v relativno nizkih koncentracijah in na geografsko omejenih območjih. Njegovo uporabnost so cenili že stari Egipčani, prvič pa je bil kot element opisan šele v 18. stoletju. Uporaba Hg v različnih tehnoloških procesih, kjer se uporablja v velikih količinah, je vodila v izrazit porast njegovega pridobivanja. To je bilo najobsežnejše v času 2. svetovne vojne (Hylander in Meili, 2003; UNEP, 2013). Pridobivali so ga v nahajališčih samorodnega Hg ali pa z izkopom in predelavo cinabaritne rude, v kateri je Hg prisoten kot HgS. Pridobivanje Hg pa nekoč ni bilo in še vedno ni 100 % učinkovito, kar je v preteklosti po nekaterih ocenah vodilo v kar 25 % izgube vsega izkopanega Hg (Gosar in sod., 1997). Hg je na ta način začel v veliko večjih količinah vstopati v globalno biogeokemijsko kroženje.

Najnovejši podatki (UNEP, 2013) kažejo, da antropogeni viri prispevajo 30 % letno v zrak izpuščenega Hg, 10 % se ga sprosti iz naravnih virov, preostalih 60 % pa se ga sprosti iz površinskih delov oceanov in prsti. Gre za Hg, ki se v tem okolju kopiči že desetletja in stalno kroži med atmosfero in zemeljskim površjem, njegovega primarnega izvora pa ne moremo z gotovostjo določiti. Danes med antropogene vire, ki v okolje vnašajo novo Hg uvrščamo majhne, po navadi nelegalne rudnike zlata (ASGM – artisanal and small scale gold mining), kjer za njegovo pridobivanje uporabljam postopek amalgamacije s Hg. Ta način rudarjenja so vpeljali v 16. stoletju, aktivno se je uporabljal v času zlate mrzlice v Ameriki, danes pa se uporablja pretežno v azijskih državah in državah Južne Amerike (Cordy in sod., 2011; Teran-Mita in sod., 2013), še posebno v Braziliji (Veiga in Hinton, 2002). Poleg ASGM pomembne vire predstavljajo še uporaba fosilnih goriv, rudarjenje in pridobivanje železa in drugih kovin ter proizvodnja cementa (Hylander in Meili, 2003; UNEP, 2013). Med najpomembnejše naravne vire uvrščamo vulkane, prst s povišanimi naravnimi koncentracijami Hg, geotermalne vrelce in gorenje lesne biomase oz. gozdov (Gustin in sod., 2008).

Pretvorbe, ki poganjajo biogeokemijsko kroženje Hg, so lahko biotske, v katerih so osrednji akterji mikroorganizmi, ali abiotske. V okolju lahko potekajo oksidacija  $Hg^0$  v  $Hg^{2+}$ , redukcija  $Hg^{2+}$  v  $Hg^0$ , metilacija Hg v monometilno Hg (MeHg) ali dimetilno Hg (DMHg) in demetilacija MeHg v  $Hg^0$  oz.  $Hg^{2+}$ . Hg, prisotno v atmosferi, je lahko udeleženo v številnih kemijskih reakcijah pretvorb  $Hg^0$  v  $Hg^{2+}$  in obratno, pri čemer je prevladujoča oblika  $Hg^0$ . Glavni reaktanti v reakcijah pretvorb, ki potekajo v atmosferi, so ozon (Hall, 1995; Munthe, 1992), hidroksilni in hidroperoksilni radikali (Lin in Pehkonen, 1997) ter S(IV) (Munthe in sod., 1991). Oksidacijsko stanje Hg pomembno vpliva na njegov zadrževalni čas v atmosferi in s tem na velikost njegovega vplivnega območja. Še najbolj pa je od njega odvisen mehanizem odlaganja na zemeljsko površino. Mehanizem odlaganja je lahko suh, kar pomeni, da se Hg odloži vezano na delce, ali moker, kjer se Hg na zemeljsko površino vrača raztopljeno v padavinah. Njegova nadaljnja usoda je odvisna od številnih okoljskih in biotskih dejavnikov, predvsem pa je pomembno, v kateri del ekosistema vstopa. Hg, ki vstopa v kopenske ekosisteme, velja za bolj ali manj neaktivno (Fitzgerald in Lamborg, 2007), saj večinoma ostane imobilizirano v prsti ali v lesni biomasi. Na to dejstvo posredno kaže tudi prisotnost Hg v premogu, kjer ga je mnogo več kot v nafti. Prehodna območja, kot so estuariji in lagune, ter morska okolja pa so mesta najkompleksnejših biogeokemijskih pretvorb Hg.

### 1.2.2 Biogeokemijsko kroženje Hg v morskem okolju

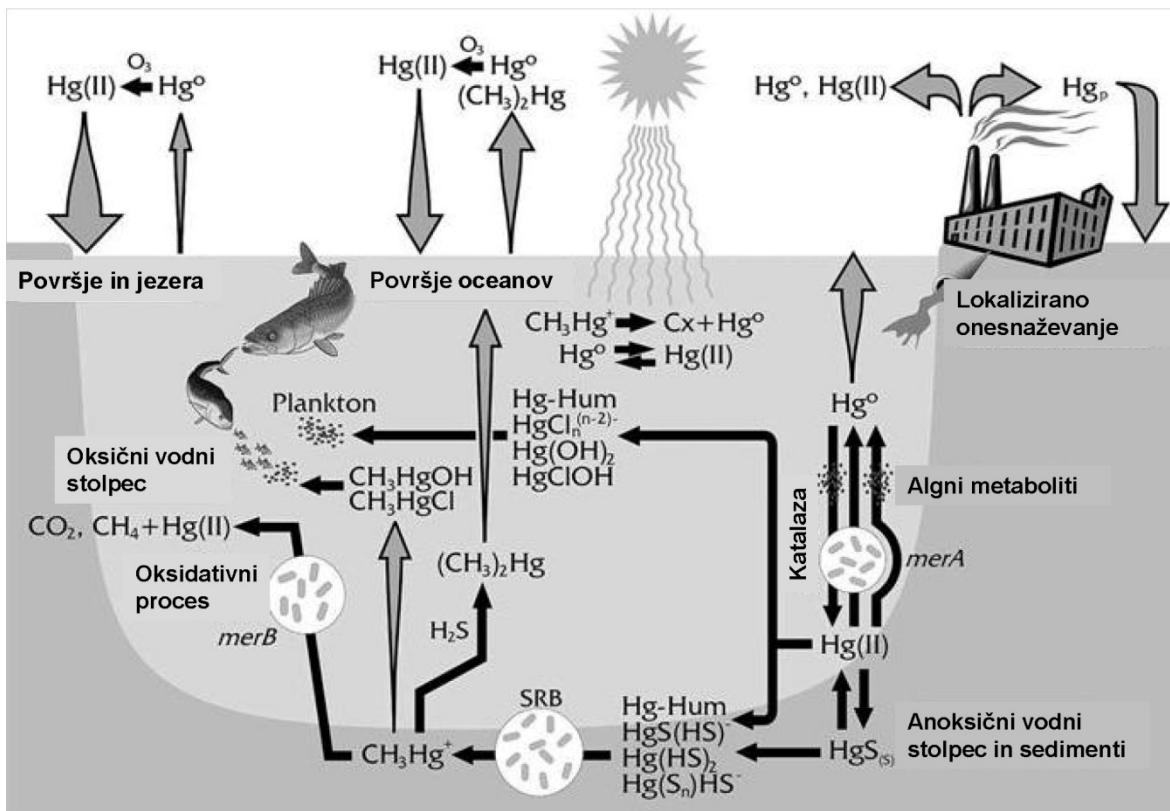
Vstop iz atmosfere je le eden od načinov, preko katerih Hg vstopa v morsko okolje, vendar se domneva, da je najobsežnejši (Fitzgerald in Lamborg, 2007). Pomemben način je tudi transport z rekami, v katerih se Hg prenaša vezano v delce ali pa raztopljeno. Od velikosti delcev je odvisno mesto njihovega posedanja. Tako so pomembna mesta obsežnega spredeljanja delcev z vezanim Hg predvsem estuariji. Ti so zanimivi tudi zaradi kemijskih sprememb, ki potečejo ob stiku sladke in slane vode. Razlika med enim in drugim okoljem je predvsem v organskih in anorganskih ligandih, ki lahko vežejo Hg. V sladki vodi najdemo večinoma hidroksidne komplekse, tudi komplekse med Hg in DOM, medtem ko naj bi v morski vodi v odsotnosti organskih ligandov prevladovali kloridni kompleksi (Ullrich in sod., 2001).

Morska okolja ne delujejo le kot ponor Hg, temveč tudi kot njegov pomemben vir, saj preko biotskih in abiotskih pretvorb nastaja  $Hg^0$ , ki se sprošča nazaj v atmosfero, prav tako pa nastaja MeHg, ki vstopa v prehranjevalne splete. Ker je MeHg pomemben nevrotoksin, ki se lahko bioakumulira in biomagnificira v prehranjevalnih spletih, v katere je vključen tudi človek, je poznavanje mehanizmov in okoljskih parametrov, ki vplivajo na nastanek MeHg v sedimentih izrednega pomena (Merritt in Amirbahman, 2009). Z vidika toksikologije je proces metilacije anorganskega Hg najpomembnejša pretvorba Hg, ki deluje na obnašanje in usodo Hg v morskih sistemih (Fitzgerald in Lamborg, 2007). Tvorba MeHg je posledica delovanja mikroorganizmov, predvsem sulfatnih reducentov (Compeau in Bartha, 1985) in reducentov Fe (Fleming in sod., 2006), poteka pa lahko tudi abiotsko (Falter, 1999a, 1999b; Gardfeldt in sod., 2003, Celo in sod, 2006, Siciliano in sod., 2005). Pri študiju akumulacije MeHg v okolju je potrebno upoštevati mnogo spremenljivk (Merritt in Amirbahman, 2009), predvsem hidrodinamiko nad sedimentom ležeče vode, vnos organske snovi in razmere v sedimentu. Akumulacija MeHg je namreč šeštevek dveh nasprotnih procesov: mikrobne metilacije in mikrobne demetilacije. Prostorska raznolikost sedimenta in razmer, ki vladajo v njem, je lahko tako velika, da je posploševanje oz. nedvoumno zaključevanje, kateri mehanizmi vplivajo na določen proces v okolju, zelo omejeno (Barkay in Wagner-Dobler, 2005; Benoit in sod., 2003; Han in sod., 2007; Lin in sod., 2012; Ullrich in sod., 2001).

Vloga OM je v morskem okolju zelo različna. Večinoma deluje kot stimulator mikrobnega metabolizma, pri čemer lahko prihaja tudi do metilacije Hg, sicer pa OM sestavljajo molekule, ki Hg vežejo in ga na ta način delajo organizmom težje dostopnega oz. nedostopnega (Belzile in sod., 2008; Ravichandran, 2004; Slowey, 2010). Prav tako je ob vezavi na DOC omejen privzem Hg v celice fitoplanktona, pri čemer je efekt zmanjšanja večji pri Hg(II) kot MeHg (Zhong in Wang, 2009). Guo in sod. (2002) so pokazali, da do bioakumulacije v tkivih školjk prihaja ne glede na to ali je Hg vezano na koloide ali pa na LMW-DOC, za ostale kovine pa velja, da vezava na koloide biološko dostopnost zmanjša. Pokazali so tudi, da se je kar 60-80 % privzetega Hg vezalo v mehka tkiva školjk, pri čemer se je akumuliralo več MeHg kot Hg(II). Biološka dostopnost Hg, pa naj bo to organsko ali anorgansko kompleksirano, je predvsem tudi funkcija načina prehranjevanja nekega organizma. Sposobnost privzema organsko vezanega Hg v bakterijske celice (Gram

negativnih bakterij) je omejena z velikostjo organske molekule, ki znaša 600 Da (Hedges, 2002), medtem ko pri organizmih, ki hrano požirajo oz. gre za privzem hrane s filtriranjem morske vode, velikostnih omejitev načeloma ni.

V morskom okolju, kjer vladajo razmere z visokimi koncentracijami  $\text{Cl}^-$  ionov in nizkimi koncentracijami DOC ( $1 \mu\text{M}$ ) in prevladujejo kompleksi med Hg in  $\text{Cl}^-$ , se je pokazalo, da je Hg v kloridni obliki bolj biodostopen od Hg, vezanega s koloidi (Zhong in Wang, 2009). Nasprotno v okoljih, kjer so koncentracije DOC visoke ( $> 100 \mu\text{M}$ ), spreminjače/naraščajoče koncentracije  $\text{Cl}^-$  na privzem Hg(II) nimajo nobenega vpliva. V takšnem okolju prevladujejo organski kompleksi, kar kaže na zelo pomemben vpliv koncentracije in izvora DOC. Nekateri avtorji (Fitzgerald in sod., 2007; Merritt in Amirbahman, 2009; Ravichandran, 2004) navajajo, da je tvorba kompleksov med organsko snovjo in Hg v morskom okolju pomembna predvsem v oksičnih pogojih, saj v anoksičnih razmerah zaradi povečane aktivnosti sulfatnih reducentov prihaja do tvorbe  $\text{H}_2\text{S}$  oz  $\text{S}^{2-}$ , za katerega so značilne večje konstante vezave Hg.



Slika 5: Shema biogeokemijskega kroženja Hg v morskom okolju (povzeto in pritejeno po Barkay in sod. 2003)

### 1.2.3 Povezave med organsko snovjo in Hg

Pomembnost, ki jo OM igra pri speciaciji, topnosti, mobilnosti in biološki dostopnosti Hg v vodnem, torej tudi morskem okolju, je znana, kljub temu pa se le malo raziskav ukvarja s preučevanjem teh povezav na molekularnem nivoju. Glavna tema večine raziskav je predvsem ekološki pomen teh povezav.

DOM, ki jo najdemo v vodnem stolpcu, vsebuje veliko število ligandov, na katere se lahko potencialno vežejo ioni kovin. V DOM po navadi ločimo med dvema tipoma ligandov,  $L_1$  in  $L_2$  ligandi.  $L_1$  ligandi (Hirose, 2000) vežejo ione trdih ('hard') kovin, medtem ko  $L_2$  ligandi (Hirose in sod., 1982) reagirajo z ioni mehkikh ('soft') kovin.  $L_1$  ligande najdemo v zelo nizkih koncentracijah (1-3 nM) v DOM, POM ter pri mikroorganizmih, druge pa v višjih koncentracijah (10-100 nM) le v DOM. Pomembna razlika med omenjenima tipoma ligandov je v stabilnostnih konstantah, s katerimi vežejo posamezne kovine.  $L_1$  ligandi imajo veliko večje stabilnostne konstante kot  $L_2$  ligandi in specifično vežejo biološko pomembne kovine pa tudi tiste toksične,  $L_2$  ligandi pa so večinoma zasedeni z ioni kovin, kot sta  $Mg^{2+}$  ali  $Ca^{2+}$ . Moči vezave pa ne določa le tip liganda, temveč tudi tip kovinskega iona. Razmerje med nabojem in atomskim premerom določa polarizacijsko moč kovinskega kationa, ta pa določa reaktivnost iona. Enovalentne kovine na levi strani periodnega sistema se tako šibkeje vežejo z ligandi kot dvovalentne, oboje pa še mnogo šibkeje kot ioni prehodnih kovin. Kljub temu pa obstajajo nekatere izjeme, saj vezave nekaterih toksičnih kovin ne moremo razložiti le s polarizacijsko močjo. Primer sta  $K^+$  in  $Tl^+$ , ki imata primerljive ionske premere in enak naboj, kljub temu pa se  $Tl^+$  v primerjavi s  $K^+$  z ligandi veže tisočkrat močneje. Razlika med njima je v tem, da ima  $Tl^+$  več elektronov in se lažje polarizira. Takšnim kovinam tako pravimo mehka ('soft') kovina, medtem ko bi K uvrstili med trde ('hard') kovine. Za njihove ione je značilno, da so majhni, imajo velik naboj in se težko polarizirajo. Mednje uvrščamo esencialne kovine, med mehke kovine pa se uvrščajo toksične kovine, torej tudi Hg, ter Al, ki je med njimi izjema (Hughes in Poole, 1991). V splošnem velja, da se trde kovine vežejo s trdimi ligandi in mehke z mehkimi. V [Tabeli 1](#) so predstavljene kovine in preferenčni osrednji atom vezavne skupine liganda.

Preglednica 1: Preferenca posameznih kovin do osrednjega atoma vezavne skupine liganda  
(povzeto po Hughes in Poole, 1996)

O	O/N/S					N/S				
Na Al K Fe Mg Ca	V Cr Mn Fe Mo					Co Ni Cu Zn Hg				
	Pb Ga Tl Cd Pb									

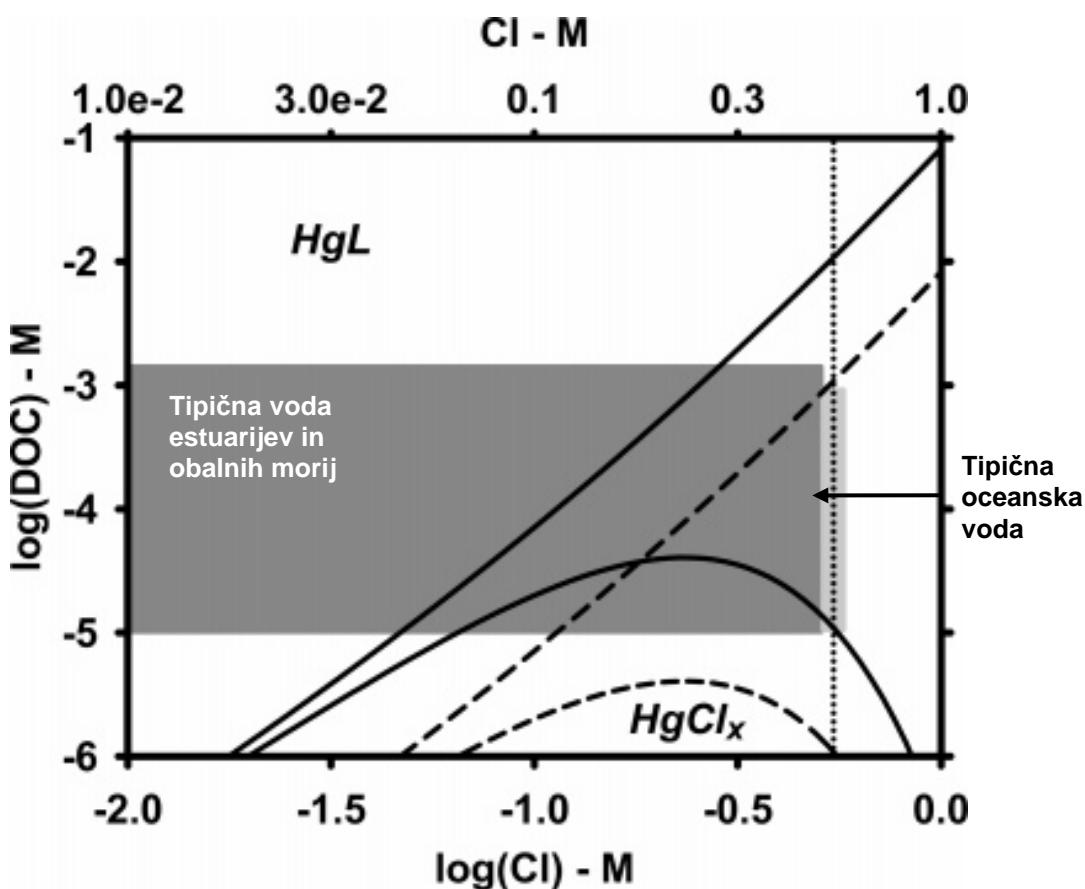
Na podlagi podatkov o konstantah tvorbe (angl. formation constant) je v teoriji mogoče napovedati, v kakšni obliki bo neka kovina prisotna v mediju oz. katera kovina se bo preferenčno vezala na določen ligand. Ena od pomembnih neznank v omenjeni enačbi, kadar jo apliciramo v okoljske študije, pa ostaja natančna karakterizacija liganda in natančna določitev njegove koncentracije ter tudi natančna speciacija preiskovane kovine. Največja ovira pri študiju povezav med OM in kovinami tako ostaja izbor primerne metodologije.

V grobem najpogosteje uporabljene metode za študije povezav med kolodi in kovinami delimo v dve skupini. Ena skupina se ukvarja z določevanjem količine in elementne ter molekularne sestave koloidov, druga pa z reaktivnostjo koloidov (Wells, 2002). Začetki raziskovanja in odkrivanja pomembnosti morskih koloidov v kroženju C in kovin segajo v 80. leta prejšnjega stoletja (Wells, 2002). Prvi pristopi so vključevali ultracentrifugiranje in uporabo elektronske mikroskopije, večinoma pa je šlo za kvalitativne študije, saj omenjene metode za potrebe kvantifikacije niso bile dovolj občutljive. Za poglobljeno analizo koloidne snovi so kmalu razvili ultrafiltracijo (tangencialno filtracijo), ki se je do danes ohranila kot najprimernejša metoda za izolacijo celokupne koloidne snovi. Njene kvalitete so, za razliko od izolacije na trdnih nosilcih (Gasper in sod., 2007), majhne izgube, relativna enostavnost uporabe kljub dolgotrajnosti izolacijskega postopka in veliki koncentracijski faktorji. Ena od pomembnih slabosti metode pa je predvsem vpliv konformacije molekul na izkoristek ultrafiltracije – v morskem okolju namreč obstaja veliko molekul, ki zavzamejo iztegnjeno konformacijo (polielektroliti) in lahko kljub veliki molekulski masi uidejo skozi pore ultrafiltracijskih membran. V procesu razvoja metode so poročali tudi o opaznem zadrževanju malih molekul, čemur pa se je mogoče izogniti z uporabo večjih koncentracijskih faktorjev ( $> 40$ ) (Guo in sod., 2000). Uporaba diafiltracije oz. dialize je nujna, kadar v morskem okolju preučujemo povezave med OM in kovinami,

vendar pa se moramo zavedati, da lahko ob zamenjavi  $Mg^{2+}$  in  $Ca^{2+}$  ionov, ki delujejo kot prečni mostovi med posameznimi molekulami, lahko pride so razpada koloidnih polimerov (Chin in sod., 1998). Kljub vsem omejitvam, ki jih ultrafiltracija potencialno prinaša, pa ostaja edina metoda, ki omogoča izolacijo zadostnih količin OM za analize njene molekularne sestave in vsebnosti kovin (Wells, 2002), njena razširjena uporaba pa omogoča primerjavo med posameznimi okolji, kjer so bile raziskave opravljene.

Interakcije med COM in kovinami potekajo na elektronegativnih funkcionalnih skupinah, na katerih prihaja do izmenjave kovinskih kationov. Najpomembnejše skupine so karboksilna (-COOH), hidroksilna (-OH) ter R-N-R ali R-S-R skupine. Titrimetrične analize protonske reaktivnosti funkcionalnih skupin lahko povedo marsikaj o količini potencialnih vezavnih mest, ne povedo pa nič o jakosti povezav. Prav tako tudi določitev celokupnega C v COM ni zadostna mera. Med COC in količino na koloide vezane kovine sicer obstaja korelacija, vendar ob primerjavi različnih študij (Wells, 2002) ta v različnih okoljih ni enaka, kar še dodatno kaže na pomembnost v interakcijah sodelujočih funkcionalnih skupin oz. potrjujejo obstoj že omenjenih močnih ligandov ( $L_1$ ).

V morskem okolju naj bi bili kloridni ioni tisti, ki pogojujejo speciacijo Hg, kljub temu pa so ugotovili, da je v oksičnem vodnem stolpcu estuariev in obalnih morij več kot dovolj organskih ligandov, ki lahko v teh okoljih popolnoma prevladajo nad  $Cl^-$  ioni (Han in sod. 2005; Fitzgerald in sod, 2007). Podrobnosti so prikazane na [Sliki 6](#).



Slika 6: Speciacija  $\text{Hg}^{2+}$  v oksičnem vodnem okolju kot ga opisuje kompleksacijski model  $\text{Hg-Cl-organski ligand (L)}$  (povzeto in prirejeno po Fitzgerald in sod., 2007).

Pogosto se v raziskavah uporabljajo t.i. sekvenčne ekstrakcije (viri iz Belzile, 2008), katerih skupna lastnost je uporaba različnih ekstrakcijskih spojin, ki selektivno izlužujejo posamezne oblike Hg. Na podlagi analiz vsebnosti Hg v posamezni frakciji je nato mogoče določiti kolikšen delež predstavlja posamezna oblika Hg.

Belzile in sod. (2008) ugotavljajo, da v oksigeniranih jezerskih sedimentih, kjer ni prisotnega  $\text{H}_2\text{S}$ , povečane koncentracije DOC vplivajo na večjo topnost Hg v pornih vodah. Nasprotno pa se je izkazalo za anoksične razmere, v katerih prihaja do pomembne kompeticije med  $\text{FeS}/\text{FeS}_2$  in DOC za vezavo Hg. Pokazali so tudi, da je zelo velik delež (do 80%) Hg, prisotnega v trdni fazi, vezan na HS, ta delež pa se z globino povečuje, kar dokazuje zmanjšan vpliv kovinskih sulfidov v podobnih okoljih.

### 1.3 POSEBNOSTI RAZISKOVANIH OBMOČIJ

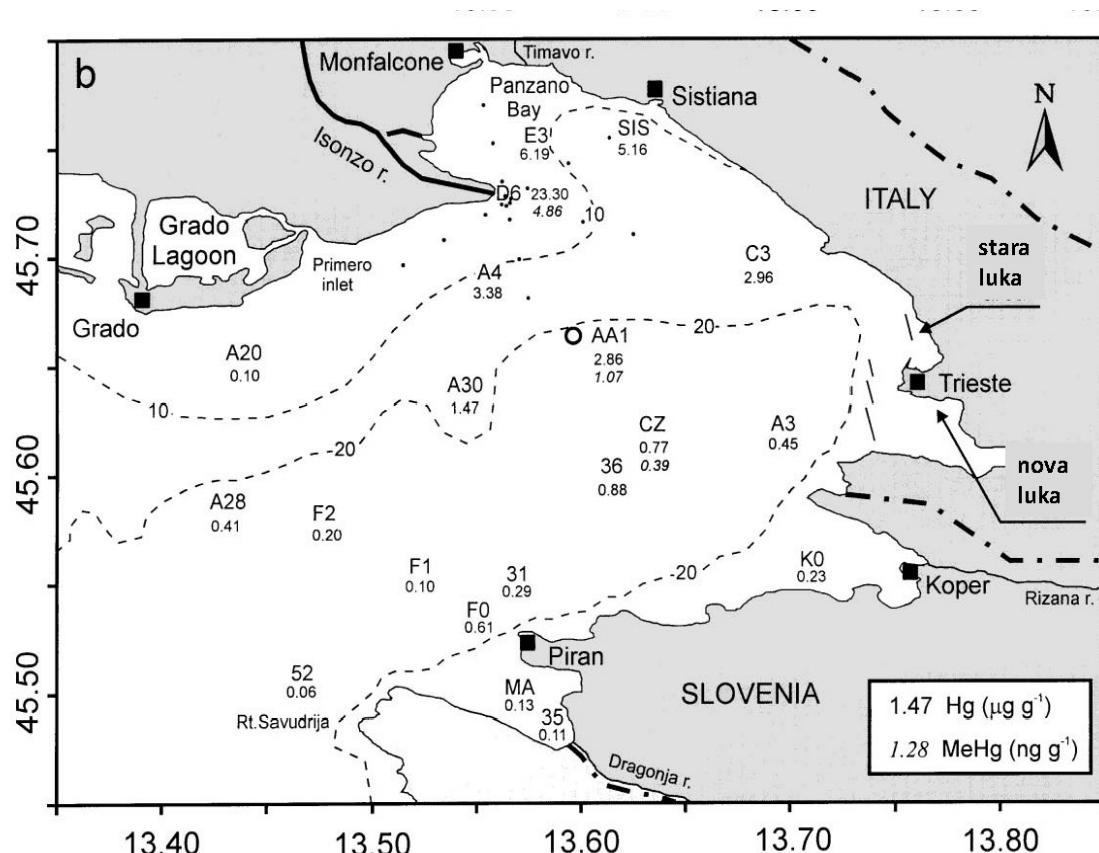
Vir: (Covelli in sod. 1999, 2012)

#### 1.3.1 Tržaški zaliv

Tržaški zaliv je najsevernejši del Jadranskega morja in se razprostira na 500 km<sup>2</sup>. Najgloblji del je centralni, kjer maksimalne globine dosegajo 25 m. Glavni pritok in vir sedimenta v zalivu predstavlja reka Soča oz. Isonzo, v morje se izliva v Italiji, pomembni pritoki pa so še Rosandra ter Rižana in Dragonja v jugovzhodnem delu zaliva. Kroženje površinskih vodnih mas poteka v nasprotni smeri urinega kazalca, medtem ko globlji sloji potujejo v nasprotni smeri. Višina bibavice v povprečju znaša 0,5 m, prevladujoči veter v zalivu pa je burja (severovzhodnik), ki vodne mase odriva iz zaliva proti odprtemu morju. Slanost vode se giblje v območju med 33 in 38,5 v vrhnjih slojih, ter 36 in 38,5 v globljih. Za zaliv so značilna sezonska nihanja v slanosti, ki so predvsem funkcija pretoka reke Soče, ki je v spomladanskih mesecih močno povečan. Različna slanost vodi v stratifikacijo vodnih mas, ki se lahko v poletnih mesecih manifestira v hipoksičnih in celo anoksičnih razmerah pri dnu. Sedimentološke značilnosti Tržaškega zaliva določa reka Soča, saj je vzorec razporeditve sedimentnih delcev okoli delte simetričen in je mogoče z odmikanjem od delte proti centralnemu delu zaliva zaznati postopno manjšanje velikosti delcev. Hitrost sedimentacije, določena z uporabo <sup>210</sup>Pb, v osrednjem delu zaliva znaša 1 mm leto<sup>-1</sup>, v smeri proti mestu izliva reke Soče pa se poveča na približno 2,5 mm leto<sup>-1</sup> (Ogorelec in sod., 1991). V sedimentih v bližini delte Soče prevladujejo karbonati, medtem ko se proti jugovzhodu povečuje delež feldšpara, nastalega ob eroziji fliša. Biološko komponento sedimentov sestavljajo morske zvezde, spužve in plaščarji, infauno sestavljajo mnogoščetinci in školjke, medtem ko je na površini sedimentov mogoče najti številčno in raznoliko združbo fototrofnih organizmov, med katerimi prevladujejo diatomeje.

Tržaški zaliv pa je poseben tudi v tem, da Soča vanj vnaša velike količine Hg, ki izvira iz idrijskega rudnika, drugega največjega rudnika Hg na svetu. Zaradi odlaganja žgalniških ostankov na obrežja reke Idrijce, v katerem naj bi bile prisotne še velike količine Hg, se ta ob eroziji obrežij v nespremenjenih količinah že več kot 500 let prenaša v Tržaški zaliv (Hines in sod., 2000, Horvat in sod., 1999). Največje koncentracije Hg je mogoče izmeriti v delti reke Soče, z razdaljo pa njegove koncentracije eksponencialno padajo, kar kaže na

pomembno vezavo Hg na delce in na njegovo usedanje v ustju reke, kjer prihaja do stika med sladko in slano vodo ter do sprememb v obliku kompleksov, ki vežejo Hg.



Slika 7: Shema raziskovalnega področja Tržaškega zaliva z označenimi raziskovalnimi točkami in izmerjenimi vrednostmi Hg v sedimentih (povzeto in pritejeno po Covelli in sod., 2001)

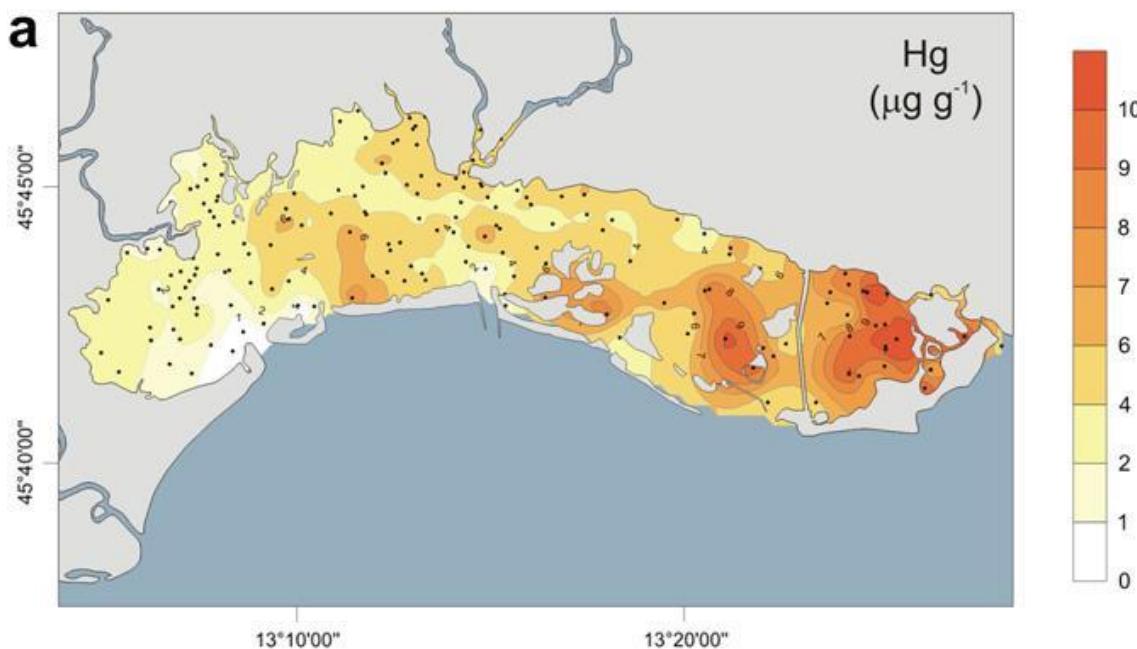
Hipoksične in anoksične razmere v sedimentih so v Tržaškem zalivu problematične tudi zaradi povečane proizvodnje MeHg, saj je ta povezana s povečano aktivnostjo sulfatnih reducentov (SRB – sulfate reducing bacteria). Sulfatna redukcija je pomemben mikrobnii proces, ki v globljih delih sedimentov Tržaškega zaliva poteka ves čas (Hines in sod., 1997, 2006), prav tako ves čas prihaja do metilacije Hg in tudi demetilacije MeHg, ob razvoju hipoksije ali anoksije v vodnem stolpcu pa se nastajajoči MeHg, ter tudi druge oblike Hg sproščajo v vodni stolpec (Covelli in sod., 1999; 2008; Emili in sod., 2011; Koron in Faganelli, 2012), od koder lahko vstopa v pelaške prehranjevalne splete.

### 1.3.2 Laguni Marano in Grado

Laguni Marano in Grado tvorita plitvo močvirnato področje, ki se razprostira na 160 km<sup>2</sup> vzdolž obale severnega Jadranskega morja. Laguni ležita med ustjema rek Tagliamento in Soče. Delimo ju na dva sektorja, gradeškega na vzhodu in maranskega na zahodu, med seboj pa sta ločena z 8 m globokim kanalom, namenjenim plovbi. Za laguni je značilna močna dnevna bibavica (povprečna višina znaša 65 cm, spomladanska pa do 105 cm). Slanost se giblje med 2 in 7 v bližini ustij rek, in 24 do 36 v bližini plimnih kanalov, ki laguni povezujejo z morjem. V laguno se izliva več manjših rek, ki v okolje vnašajo suspendirano snov. Če te količine primerjamo s količinami usedlin rek Tagliamento in Soče ter tistimi, ki nastajajo ob eroziji otokov, ki tvorijo mejo med laguno in morjem, ugotovimo, da je vpliv zanemarljiv. Preko plimnih kanalov vstopajo predvsem srednje veliki do majhni peščeni delci, medtem ko so glineni delci široko razširjeni po celotnem območju lagun. Območje lagun je pod velikim vplivom industrije, kmetijstva in urbanizacije v neposredni bližini. Za razliko od Tržaškega zaliva je v območju lagun mogoče najti Hg iz dveh različnih virov: iz idrijskega rudnika in iz lokalne kloralkalne tovarne. Iz nje so se v reko Aussa sproščale velike količine Hg. Kljub vsemu pa laguni veljata za eno najlepše ohranjenih mokrišč v Mediteranu in sta vključeni v evropski sistem Natura 2000.



Slika 8: Shema raziskovalnega področja v lagunah Grado in Marano z označenimi raziskovalnimi točkami (povzeto in prirejeno po Emili in sod., 2012)



Slika 9: Porazdelitev koncentracij THg v lagunah Grado in Marano (povzeto po Acquavita in sod., 2012)

Povečane koncentracije Hg v sedimentih lagun Grado in Marano se odražajo tudi kot povečane koncentracije tega elementa v vseh delih ekosistema, predvsem bioti (Brambati, 2001).

Laguni Marano in Grado sta pomembni za gospodarstvo regije, saj se v njiju ukvarjajo z marikulturo oz. gojenjem školjk. Glede na to, da sta laguni onesnaženi s Hg, je velika pozornost pri širjenju aktivnosti marikulture usmerjena prav v potencialno nevarnost, ki jo Hg predstavlja zdravju ljudi. Nekaj remediacijskih postopkov, s katerimi bi neposredno odstranili nevarno Hg je bilo že predstavljenih (povzeto v Covelli in sod., 2012), npr. odstranitev površinskega dela sedimenta, vendar pa se je postopek izkazal za precej zahtevnega, nepraktičnega ter tudi ekološko spornega.

#### 1.4 CILJI IN HIPOTEZE DOKTORSKE DISERTACIJE

Glavni cilj pričujočega doktorskega dela je ovrednotiti vlogo DOM pri kroženju Hg v Tržaškem zalivu in lagunah Grado ter Marano, na podlagi pridobljenih rezultatov poglobiti naše znanje o biogeokemijskem kroženju Hg in ob morebitnih opaženih spremembah v sestavi in strukturi OM predvideti vpliv na obnašanje Hg v okolju.

Že dolgo je znano, da igra OM v biogeokemijskem kroženju Hg pomembno vlogo, zato smo se v tem doktorskem delu ukvarjali s povezavami oz. interakcijami, do katerih prihaja med Hg in OM v vodnem stolpcu in sedimentih Tržaškega zaliva ter lagun Grado in Marano. Te povezave so odvisne predvsem od kemijske sestave in strukture OM, ki se od enega do drugega vodnega okolja lahko zelo razlikujeta. Do razlik prihaja zaradi samega izvora OM, pomemben vpliv pa imajo tudi kemijsko-biološke spremembe, ki potekajo v določenem okolju. Organske spojine imajo zaradi svoje raznolike sestave in strukture ter prisotnosti v različnih vodnih okoljih različna potencialna mesta vezave, kamor se Hg lahko veže z različnimi konstantami vezave (Lamborg in sod., 2004). Napredek v analiznih metodah in pristopu k problemu (Han in sod., 2006; Lamborg in sod., 2003) je pokazal, da so v okolju pomembne predvsem povezave med Hg in tistimi frakcijami DOM, ki vsebujejo funkcionalne skupine, v katerih vlogo osrednjega heteroatoma igrajo S, O in N (Aiken, 2006).

V obalnih morjih, kot je na primer Tržaški zaliv, je DOM pretežno fitoplanktonskega izvora in jo v glavnem sestavlja heteropolisaharidi različnih molekulskih mas (Kovač in sod., 2004), ki praviloma ne vsebujejo tiolnih funkcionalnih skupin, so pa zato pomembnejše druge, kjer vlogo osrednjega heteroatoma igrata O in N. COM se je izkazala za frakcijo, ki najaktivneje sodeluje pri vezavi Hg in tudi drugih kovin, pri čemer se deleži na koloide vezanega Hg med različnimi raziskovalnimi področji močno razlikujejo. Objavljeni deleži se gibljejo med 12 in 93 % (povzeto v Wells, 2002). V doktoratu smo raziskovali, kolikšen je ta delež v Tržaškem zalivu, pri izbiri metod pa smo se zanašali na priporočila drugih raziskovalcev, ki se ukvarjajo s podobno tematiko (Guo in sod, 2000, Wells, 2002, Schijf in Zoll, 2011; Nebbioso in Piccolo, 2013). Glede na to, da se v Severnem Jadranu periodično pojavljajo makroagregati, skupki agregiranih molekul DOM,

prisotnih v vodnem stolpcu, smo iz vzorcev teh makrogelov z uporabo enakih metod izolirali COM in določili vsebnosti Hg. Glede na to, da so molekule, ki sestavljajo vodotopno frakcijo makroagregatov enakega izvora kot normalno prisotna OM v vodnem stolpcu, smo predpostavili, da bo delež vezanega Hg enak kot pri analiziranem COM. Za matriks makroagregatov (netopno frakcijo) pa smo predpostavili, da bodo ti deleži večji, saj lahko prihaja do vgradnje mineralnih delcev v strukturo makroagregatov (Kovač in sod., 2004; 2008).

OM igra pomembno vlogo tudi v sedimentih, tako v njihovih pornih vodah kot tudi v trdi fazi. V veliki meri je njena osrednja vloga predvsem napajanje mikrobnega metabolizma, pa naj bo ta aeroben ali anaeroben. Struktura in sestava OM v sedimentih pa nista enotni in za razliko od vodnega stolpca je tukaj delež HS mnogo večji. HS so organske molekule z izrazito kompleksno sestavo in strukturo, ki je zelo odporna proti mikrobnii razgradnji. Zaradi kompleksnosti HS smo žeeli ugotoviti, v kolikšni meri je Hg vezano na to obliko OM. Pri tem smo preverjali tudi hipotezo, da anoksične razmere v sedimentu in vodnem stolpcu oz. na SWI vplivajo na tvorbo MeHg in DGM ter sproščanje Hg in HS v vodni stolpec. Z uporabo bentoških posod smo sproščanje tudi vrednotili, torej določali bentoške tokove. Pri tem smo raziskovali še, ali med tokovi, določenimi na kontaminiranih in relativno neonesnaženih območjih v Tržaškem zalivu, obstaja kakšna razlika.

Velik vpliv na interakcije med OM in Hg ima tudi slanost (Cauwet, 2002), saj pomembno deluje na adsorpcijo, desorpcijo, agregacijo, flokulacijo in deflokulacijo OM. S tega vidika je vključitev raziskav v prehodnem območju, ki ga predstavljajo lagune, izrednega pomena. Laguni Grado in Marano sta za razliko od območja Tržaškega zaliva v manjši meri zajeti v vplivno območje idrijskega rudnika, z vidika raziskovanja biogeokemijskih pretvorb Hg pa sta pomembni, saj se vanju izlivata reki oz. reka Aussa-Corno, ki vnaša Hg iz nekoč delajoče kloralkalne industrije, ki je bila locirana v višjem delu reke Aussa. Lagune so tudi območja, kjer je pomen alohtone OM večji. Tako smo v lagunah Marano in Grado izvedli podobne poskuse kot v Tržaškem zalivu in ugotavliali, kako anoksične razmere ter izvor OM in Hg vplivajo na obseg bentoških tokov v tem specifičnem okolju.

## 2 ZNANSTVENA DELA

### 2.1 OBJAVLJENA ZNANSTVENA DELA

#### 2.1.1 Koron in sod., 2011. Povezave med makroagregati in živim srebrom (Hg) v obalnih vodah (Tržaški zaliv, severno Jadransko morje)

**Interaction of macroaggregates and Hg in coastal waters (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea)**

Neža Koron, Jadran Faganeli, Ingrid Falnoga, Nives Kovač

Geomicrobiology Journal, 2011, 27: 615-624

Veliko število raziskav je pokazalo, da je živo srebro (Hg) v vodnem okolju pogosto vezano na koloidno organsko snov (COM – colloidal organic matter). Njuna interakcija vpliva na speciacijo, transport, biološko dostopnost in kroženje Hg v okolju. Interakcija je v veliki meri odvisna od kemijske sestave in strukture COM.

Makroagregati (makrogeli) so veliki skupki organske snovi, ki v morskem okolju nastanejo z aglomeracijo raztopljenih organskih makromolekul. Ti so zaradi količine organske snovi, ki jo vsebujejo, izrednega pomena za vezavo Hg in tudi drugih kovin. Obenem so tudi izjemni raziskovalni izzivi. Periodično in relativno pogosto se pojavljajo v severnem Jadranu, opisani pa so bili tudi v drugih morjih. Osnovni gradniki makroagregatov so heteropolisaharidi, ki jih proizvaja in v okolje sprošča fitoplankton, predvsem diatomeje.

Za potrebe kemijske speciacije organsko vezanega Hg v Tržaškem zalivu smo makroaggregate filtrirali in centrifugirali. Centrifugiranje je bilo potrebno za ločitev matriksa ali netopnega dela od intersticijske vode ali vodotopnega koloidnega dela makroagregatov. Nadalje smo vodotopni del ultrafiltrirali skozi membrane z različnimi velikostmi por, s čimer smo molekule razdelili v tri velikostne razrede, > 30 kDa, 10-30 kDa in 5-10 kDa. V posameznih frakcijah smo opravili serijo analiz. Med drugim smo

določali celokupno vsebnost ogljikovih hidratov, organskega C ( $C_{org}$ ), totalnega N ( $N_{tot}$ ), prav tako pa smo določili vsebnosti Hg in posneli spektre FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Izkazalo se je, da so največje vsebnosti ogljikovih hidratov in nižja razmerja  $C_{org}/N_{tot}$  povezani z največjo frakcijo ( $> 30$  kDa). Iz rezultatov smo sklepali, da to frakcijo večinoma sestavljajo aminopolisaharidi in glikoproteini. Z uporabo visokotlačne izključitvene kromatografije (HP SEC – high pressure size exclusion chromatography) pri analizi posameznih velikostnih frakcij smo ugotovili, da jih sestavljajo molekule z relativno ozkim spektrom mas. Analiza vsebnosti Hg v posameznih frakcijah je pokazala, da največ Hg najdemo prav v največji frakciji, ki vsebuje tudi največ N.

Z inkubacijskim eksperimentom smo pokazali, da so manjše frakcije organskih molekul, ki sestavljajo COM, lažje razgradljive in da ob njihovi razgradnji prihaja do sproščanja Hg v okoliško raztopino. Ob analizi matriksa (netopnega dela) smo dobljene visoke koncentracije Hg na podlagi ostalih informacij povezali tudi s prisotnostjo Hg v obliki delcev HgS, ki se lahko ujamejo v mrežo makrogela.





















**2.1.2 Koron in Faganeli, 2012. Bentoški tokovi živega srebra (Hg) med spremembami redoks razmer v neonesnaženih sedimentih Tržaškega zaliva (severno Jadransko morje)**

**Benthic fluxes of mercury during redox changes in pristine coastal marine sediments from the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea)**

Neža Koron, Jadran Faganeli

Journal of Soils and Sediments, 2012, 12, 10: 1604-1614

Tržaški zaliv (severno Jadransko morje) je primer obalnega morja, onesnaženega z živim srebrom (Hg). Onesnaženje je posledica 500 letne rudarske dejavnosti v idrijskem rudniku (zahodna Slovenija), ki velja za drugi največji rudnik Hg na svetu.

Za Tržaški zaliv je značilno pomanjkanje kisika ( $O_2$ ) v pridnenem sloju vodnega stolpca, ki je posledica sezonske stratifikacije in akumulacije lahko razgradljive organske snovi. Ker spremenljive okoljske redoks razmere močno vplivajo na pretvorbe Hg, smo v okviru tega dela preučevali vpliv pomanjkanja  $O_2$  na bentoške tokove celokupnega Hg ( $Hg_{tot}$ ) in metilnega Hg (MeHg) v oz. iz sedimenta. Vzporedno s pomanjkanjem  $O_2$  smo proučevali še vpliv prisotnosti oz. odsotnosti sulfida ( $H_2S$ ), železa (Fe), mangana (Mn), fluorescirajoče raztopljljene organske snovi (FDOM – fluorescent dissolved organic matter), dušika (N) in fosforja (P).

Bentoške tokove in koncentracije posameznih spojin v sedimentih in vodnem stolpcu smo spremljali s pomočjo dveh tipov eksperimentov. Eden je bil izveden *in situ*, drugi pa je potekal v nadzorovanih pogojih v laboratoriju. Oba sta vključevala uporabo bentoških posod in sta obsegala tri ločene stopnje: oksično, anoksično in stopnjo reoksidacije.

Med potekom eksperimentov smo lahko v oksični stopnji opazovali omejen iztok ali efluks MeHg iz sedimentov v vodni stolpec, ki se je opazno povečal v anoksični stopnji, v fazi reoksidacije pa drastično padel. V tej stopnji smo zaznali celo vtok ali influks. Dobljeni

rezultati potrjujejo našo hipotezo, da igra v anoksičnih pogojih pomembno vlogo pri določanju bentoških tokov MeHg sproščanje MeHg z reduciranih kovinskih oksihidroksidov, medtem ko v oksičnih pogojih na istih oksihidroksidih poteka koprecipitacija. Pomembno vlogo v oksičnem okolju lahko igra tudi proces demetilacije MeHg. Rezultati niso pokazali pomembne povezave med fluksoma Hg<sub>tot</sub> oz. MeHg in FDOM.

Na podlagi rezultatov je mogoče zaključiti, da med koncentracijami Hg v pornih vodah in njegovimi bentoškimi tokovi v posameznih eksperimentih ni opaznih razlik, četudi v enem eksperimentu opazujemo relativno onesnažena severni in centralni del Tržaškega zaliva, v drugem pa relativno nedotaknjen južni del. Trdimo lahko, da plitka in sezonsko stratificirana morska okolja v splošnem predstavljajo območja, kjer obstaja visoka stopnja tveganja, da bo prišlo do sproščanja toksičnega MeHg v okolje.























### **2.1.3 Acquavita in sod., 2012: Živo srebro (Hg) v sedimentih lagun Marano in Grado (severno Jadransko morje): Viri, porazdelitev in kemijske zvrsti**

#### **Mercury in the sediments of the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea): Sources, distribution and speciation**

Alessandro Acquavita, Stefano Covelli, Andrea Emili, Daniela Berto, Jadran Faganeli,  
Michele Giani, Milena Horvat, Neža Koron, Federico Rampazzo

Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2012, 113: 20-31

Rudniški ostanki, odloženi na obrežje reke Idrijce (Slovenija) in njihov nadaljnji transport z reko Sočo so bili prepoznani kot najpomembnejši vir onesnaženja z živim srebrom (Hg) v severnem Jadranskem morju. Onesnaženje, ki je neprekinjeno potekalo 500 let in poteka še danes, je povzročilo, da se Tržaški zaliv in bližnji laguni Marano in Grado uvrščajo med najbolj onesnažena morska okolja na svetu. Laguni sta v bili v bližnji preteklosti podvrženi tudi onesnaženju s Hg iz bližnje kloralkalne tovarne. V okviru projekta MIRACLE (Mercury Interdisciplinary Research for Appropriate Clam farming in a Lagoon Environment) in na podlagi rezultatov predhodnih raziskav smo raziskovali prostorsko razporeditev Hg in njeno povezavo z metilnim Hg (MeHg), organsko snovjo in številnimi drugimi geokemijskimi parametri sedimentov. Vpliv vnosa s Hg bogate suspendirane snovi v sedimente lagun je očiten in ga je mogoče prepoznati po padajočem koncentracijskem gradientu ( $> 11 \text{ mg g}^{-1}$  na vzhodnem proti  $0.7 \text{ mg g}^{-1}$  na zahodnem delu). Vpliv Hg, ki izvira iz kloralkalne industrije je očiten le v centralnem delu lagune.

Hg v laguni je večinoma povezano s finozrnatim sedimentom ( $< 16 \text{ mm}$ ), ki v to okolje vstopa z litoralnimi in bibavičnimi tokovi, čigar izvor je reka Soča. Speciacijske analize so v grobi peščeni frakciji sedimenta v vzhodnem delu raziskovalnega področja izpostavile prisotnost Hg-sulfidov, ki je pravzaprav pričakovana glede na izvor sedimentiranega materiala. Nasprotno pa porazdelitev MeHg ( $0.47 - 7.85 \text{ ng g}^{-1}$ ) ne kaže tako jasnega trenda kot THg. V povprečju MeHg predstavlja 0,08 % THg, kar je primerljivo z rezultati, dobljenimi v podobnem okolju.

Višje koncentracije MeHg v sedimentih, ki so malo do srednje obremenjeni s Hg, nakazujejo dejstvo, da dostopnost kovine ni tisti limitni dejavnik, ki bi vplival na nastanek MeHg, temveč da omejujoče delujejo drugi okoljski dejavniki. Korelacije med koncentracijami MeHg, normaliziranimi na vsebnost huminskih kislin (HA – humic acid) in huminsko  $\delta^{13}\text{C}$ , kažejo na to, da se MeHg preferenčno povezuje z avtohtonimi, z  $\delta^{13}\text{C}$  obogatenimi HA. To nakazuje na možnost, da lahko struktura avtohtonih 'morskih' HA, ki so manj razgrajene in vsebujejo manj aromatičnih funkcionalnih skupin, preferenčno veže in/ali celo vpliva na proizvodnjo MeHg.

Iz raziskave je tako mogoče skleniti, da je izbira primernega področja v lagunah Marano in Grado, kamor bi lahko razširili aktivnost gojenja školjk (glavni problem projekta MIRACLE, op. avtorice), odvisna od več dejavnikov in ne sme temeljiti le na analizi celokupne vsebnosti Hg v sedimentu.

























**2.1.4 Emili in sod., 2012: Meritve bentoških tokov živosrebrovih spojin v lagunah severnega Jadrana (laguni Marano in Grado, Italija)**

**Benthic flux measurements of Hg species in a northern Adriatic lagoon environment  
(Marano and Grado Lagoon, Italy)**

Andrea Emili, Alessandro Acquavita, Neža Koron, Stefano Covelli, Jadran Faganeli,  
Milena Horvat, Suzana Žižek, Vesna Fajon

Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2012, 113: 71-84

V okviru projekta MIRACLE (Mercury Interdisciplinary Research for Appropriate Clam farming in a Lagoon Environment) smo v lagunah Marano in Grado izvajali terenske eksperimente. Eksperimenti so bili zasnovani tako, da so zaobjeli različne sezonske razmere. V roku enega leta smo izpeljali tri eksperimente, v katerih smo uporabljali dve različni bentoški posodi: temno, neprepustno za svetlobo in prozorno, torej prepustno, pri čemer smo opazovali vpliv svetlobe na kroženje Hg. Med potekom eksperimenta smo spremeljali celokupni raztopljeni Hg (THg), metilno Hg (MeHg) in raztopljeno plinasto Hg (DGM – dissolved gaseous mercury).

Ugotovili smo, da so dnevni bentoški tokovi na vseh postajah veliko večji kot difuzijski. Na podlagi izračunov smo ugotovili, da se na letni ravni iz sedimenta, kjer nastaja, v vodni stolpec sprosti 99 % MeHg, medtem ko se vsega Hg reciklira nekje med 30 in 60 %.

MeHg tako še vedno predstavlja visoko stopnjo tveganja za bioakumulacijo v školjkah, čeprav je njegov vpliv lahko nekoliko zmanjšan zaradi redukcije Hg. Gre za pomemben proces, ki vodi v sproščanje Hg iz teh okolij. Naše ocene bentoških tokov so v laguni Grado pokazale bolj dinamično kroženje na meji sediment-voda (SWI – sediment-water interface) kot v maranskem delu. Iz tega smo zaključili, da je za gojenje školjk primernejši zahodni, torej maranski sektor.





























### **2.1.5 Koron in sod., 2012: Potenciala metilacije in redukcije živega srebra ( $Hg$ ) v morski vodi: nadgradnja metode z uporabo radioizotopa $^{197}Hg$**

#### **Mercury methylation and reduction potentials in marine water: An improved methodology using $^{197}Hg$ radiotracer**

Neža Koron, Arne Bratkič, Sergio Ribeiro Guevara, Mitja Vahčič, Milena Horvat

Applied Radiation and Isotopes, 2012, 70: 46-50

Razvili smo zelo občutljivo metodo, ki nam omogoča sočasno sledenje dvema procesoma pretvorb anorganskega Hg ( $Hg^{2+}$ ): metilaciji in redukciji. Za ta namen smo uporabili radioizotop  $^{197}Hg$ , ki smo ga z nevronsko aktivacijo v reaktorju IJS proizvedli iz obogatenega stabilnega izotopa  $^{196}Hg$ . Kot osnovo nove metode smo uporabili že obstoječ protokol ekstrakcije MeHg, vendar smo ga spremenili do te mere, da nam preostali označeni  $^{197}Hg^{2+}$ , ki se ni pretvoril v  $Me^{197}Hg$ , ni povzročal interferenc na detektorju sevanja gama. S tem smo dosegli, da lahko v vzorcu zaznamo nič manj kot 0.1 % dodanega radioizotopa, ki se je pretvoril v  $Me^{197}Hg$ . Postopek smo validirali v območju med 0.05 in 4 ng L<sup>-1</sup> dodanega radioizotopa.

Potencial redukcije  $^{197}Hg^{2+}$  v  $^{197}Hg^0$  smo merili z uporabo raztopine kalijevega permanganata, v katero smo izpihovali nastalo plinasto  $^{197}Hg^0$ . S to metodo smo bili sposobni zaznati 0.001 % začetno dodanega  $^{197}Hg^{2+}$ , ki se je pretvoril v  $^{197}Hg^0$ . S tem smo omogočili, da v eksperimentalne posode, za razliko od drugih metod, ni potrebno dodajati velikih količin radioizotopa, s čemer bi lahko prišlo do spremenjenega metabolizma in fiziologije organizmov ter do napačnih rezultatov, temveč se približamo naravnim vrednostim, ki se v našem okolju raziskovanja gibljejo med 1 in 10 ng L<sup>-1</sup>. Prednost uporabe  $^{197}Hg$  je tudi v njegovem kratkem razpolovnem času ( $t_{1/2} = 64$  h).











## 2.2 OSTALO POVEZOVALNO ZNANSTVENO DELO

### 2.2.1 Koron in sod., 2013: Povezave med kovinami in makroagregati v obalnem morju

(v recenziji)

#### Association of metals and macroaggregates in coastal waters

Neža Koron<sup>a,b</sup>, Jadran Faganeli<sup>a\*</sup>, Ingrid Farnoga<sup>b</sup>, Darja Mazej<sup>b</sup>, Katja Klun<sup>a</sup>, Nives Kovač<sup>a</sup>

<sup>a</sup>National Institute of Biology, Marine Biology Station, Fornace 41, 6330 Piran, Slovenia

<sup>b</sup>"Jozef Stefan" Institute, Department of Environmental Sciences, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenia

Makroagregati oz. makrogeli se v Tržaškem zalivu pojavljajo relativno pogosto in ponujajo izjemno priložnost za preučevanje interakcij med organsko snovjo in kovinami (Me). Makrogeli nastajajo z aglomeracijo raztopljenih heteropolisaharidov, za katere se ve, da so fitoplanktonskega izvora. Za ločitev intersticielne vode od matriksa makrogela smo uporabili filtracijo in centrifugiranje. Intersticielno vodo, ki je vsebovala koloidno organsko snov, smo uporabili v inkubacijskem eksperimentu, v katerem smo spremljali njihovo mikrobnno razgradnjo. Koloidno organsko snov smo z ultrafiltracijo ločili v tri velikostne razrede ( $>30$  kDa, 10-30 kDa and 5-10 kDa) in v vsaki od frakcij določili vsebnosti kovin, organskega ogljika ( $C_{org}$ ) in celokupnega dušika ( $N_{tot}$ ).

V matriksu smo našli višje koncentracije Me in nižja razmerja  $Me/C_{org}$ , kar smo povezali s prisotnostjo anorganskih delcev, ki vsebujejo večje količine Me. Analize vseh Me v koloidni frakciji makroagregatov, z izjemo Se, so pokazale, da so kovine večinoma vezane na večje frakcije ( $> 30$  kDa), ki jih sestavljajo glikoproteini in aminopolisaharidi. Degradacijski poskus je pokazal, da se aktivno razgrajujejo predvsem večje organske molekule, medtem ko mala frakcija (5-10 kDa) ostaja relativno nespremenjena. Kljub temu

pa se je izkazalo, da se delež Me, vezanih na največjo frakcijo ohranja, kar smo povezali z nastankom primernih vezavnih mest za Me.

Ob primerjavi  $Me/C_{org}$  razmerij z Irving-Williamsovim zaporedjem smo opažene razlike pripisali predvsem okoljskim koncentracijam Me v severnem Jadranu. Primerjava med koncentracijami Me v koloidih makroagregatov in naravno prisotne koloidne organske snovi, za katere se sklepa, da so prekurzorji makroagregatov, je pokazala primerljive rezultate. Koeficienti porazdelitev ( $K_d$ ) med koloidno vezanimi in raztopljenimi Me so nižji kot pri suspendirani snovi, kar kaže na relativno šibko vezavno sposobnost organskim koloidov. S tem smo potrdili tudi, da Me v obalnih vodah severnega Jadrana niso razporejene homogeno.

## Abstract

Macroaggregates (macrogels) occurring episodically in the northern Adriatic, offer a rare opportunity to study interactions between marine organic macromolecules, metals and metalloids (Me). Macrogels are formed by agglomeration of dissolved heteropolysaccharides, mostly of phytoplankton origin. Filtration and centrifugation were used to discriminate between macrogel matrix and interstitial water colloids. The interstitial fraction was then used in an incubation experiment to follow the progress of microbial degradation of colloids. The colloids were ultrafiltered through membranes and each size class of colloids ( $>30$  kDa, 10-30 kDa and 5-10 kDa) was analyzed for metal, metalloid, organic carbon ( $C_{org}$ ) and total nitrogen ( $N_{tot}$ ) content. Higher Me concentrations and lower Me/ $C_{org}$  ratios in matrix, which are an indicator of Me bound to organic matter, suggest that Me in a matrix can also be bound onto Me containing particles. All the studied Me in macroaggregate colloidal fraction, except Se, proved to be bound to large macromolecules ( $>30$  kDa), mainly glycoproteins and aminopolysaccharides. During the rapid degradation of all, except the 5-10 kDa fraction, the Me associated with the  $>30$  kDa fraction were markedly preserved. Consequently, the Me/ $C_{org}$  ratios increased due to the loss of  $C_{org}$  and relative increase of metal-binding sites. The observed differences between our Me/ $C_{org}$  ratios and the Irving-Williams series can be explained by variable background concentrations of the studied Me in the northern Adriatic. Comparison between Me levels in macroaggregate colloids and dissolved marine colloids, considered to be macroaggregate precursors, revealed similar values. Distribution coefficients ( $K_d$ ) between colloidal and truly dissolved Me were lower than  $K_d$  for particulate matter, suggesting that organic colloids, including macroaggregates, exhibit rather weak Me binding capacity and that Me are not distributed homogeneously in the various particle pools in the northern Adriatic coastal waters.

**Keywords:** metals, macroaggregates, colloids, speciation, fractionation, northern Adriatic

## 1. Introduction

The composition and structure of marine dissolved organic matter (DOM) are important features that can affect the rates and extent of its degradation (Kujawinski et al., 2004) and aggregation into colloids – aggregates and macrogels (Verdugo et al., 2004). It has been reported that quite a large fraction (30-50 %) of marine dissolved organic carbon (DOC) is associated with colloids (Buffe et al., 1998; Guo and Santschi, 1997; Mopper et al., 2007). The macromolecules are importantly involved in the biogeochemistry of carbon and metals because they contain numerous charged sites on functional groups which are able to bind trace elements with a range of binding constants (Benoit et al., 2001; Lamborg et al., 2004; van Leeuwen and Buffe, 2009). In addition, trace elements can associate with a range of size classes of colloids (Muller, 1996; Wells, 2002; Wells et al., 2000).

Colloidal organic matter (COM) in the water column not only acts as a retainer that slows the sorption of bioactive metals onto sinking particles (Wells, 2002), but also leads to reduced free metal ion concentrations in the surrounding aquatic environment. Since metal bioavailability is mostly proportional to its free ion concentrations, organic complexing decreases the immediate availability of metals to microorganisms (Wells, 2002). This suggests that complexation of essential metals along with scarcity of nutrients limits microbial activity in specific environments such as macrogels. The effect of COM on metal bioavailability also appears to be a function of the type (quality) and quantity of organic matter released by phytoplankton. Phytoplankton plays a pivotal role in the production of metal-binding polymers, while bacteria, mostly heterotrophs, split and transform organic matter (Doucet et al., 2007; Filella, 2007) rendering it more or less able to bind trace metals.

Hyperproduction of macroaggregates, i.e. formation of marine macrogels, has been observed and described in coastal waters worldwide, but the scale on which this phenomenon occurs in the northern Adriatic appears to be unique (Kovac et al., 2008). It has been observed for almost 300 years and normally appears in late spring and early summer. Heteropolysaccharides are the main constituents of macroaggregates and are believed to be primarily of diatom origin (Kovac et al., 2004). Extensive excretion of polysaccharides by phytoplankton appears to be more a response to nutritional stress caused by high dissolved inorganic nitrogen (DIN)/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ratios, rather than a consequence

of increased levels of a single nutrient (Kovač et al., 2008). In the Gulf of Trieste (northern Adriatic), high ratios are caused by nitrate (Faganeli et al., 2009) that is found in high concentrations in the surface sea layers due to rich freshwater inflows (Degobbis et al., 2005). Persistence of these ratios is enhanced by summer water stratification, typical of this area. Nutritional stress, however, not only affects phytoplankton but also heterotrophic bacteria, and therefore limits the rate of microbial degradation and transformation of macroaggregates (Turk et al., 2010).

The principal aim of this study was to investigate the interaction of macroaggregates with metals and metalloids, as a function of the metal and metalloid concentrations normally present in the marine organic matter that occurs in different sizes and forms in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). The uptake of metals by micro- and macrogels, prevalently composed of polysaccharides, is currently understudied (Ingrì et al., 2004). Metal-organic matter interactions are expected to be important, given that they are one of the most important metal immobilization pathways in coastal waters. Interactions lead to lower metal bioavailability and thus lower activity in biogeochemical processes and transport in food webs. Conversely, degradation of the macromolecules with bound metals would release the latter again into the water phase.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study site and sampling

Macroaggregate samples were collected in June, 2004 at sampling point F ( $45^{\circ} 31, 46' N$ ,  $13^{\circ} 33, 72' E$ ) in the southern part of the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea, at a depth of 10 m, just above the pycnocline (Faganeli et al., 2009). The Gulf is a shallow marine basin in the northernmost part of the Adriatic Sea with a depth not exceeding 25 m. The main freshwater inflow originates from the Isonzo/Soca River in the north that exhibits spring and autumn floods governed by snowmelt in Alps and rain, respectively. The salinity of surface waters in the gulf ranges roughly between 30 (in spring) and 38 psu, and surface water temperatures vary normally from  $8^{\circ}C$  (winter) to  $26^{\circ}C$  (summer). The vertical temperature and salinity gradients that occur in late summer can result in bottom water oxygen depletion and, occasionally, hypoxia and anoxia (Kemp et al., 1999).

Since the macroaggregates were in the form of macrogel, they were collected by hand into polyethylene bottles. After collection, the interstitial water was isolated by filtration of the macrogel through 50 µm mesh size plankton net, followed by centrifugation at 4000g. The interstitial water was filtered through pre-ignited, 0.7 µm pore size Whatman GF/F filters. Macrogel samples devoid of interstitial water (macroaggregate matrix) and subsamples of filtered interstitial water (macroaggregate interstitial water colloids) were immediately freeze-dried for further analysis. The remainder of the filtrate was used for degradation and fractionation studies (Fig. 1).

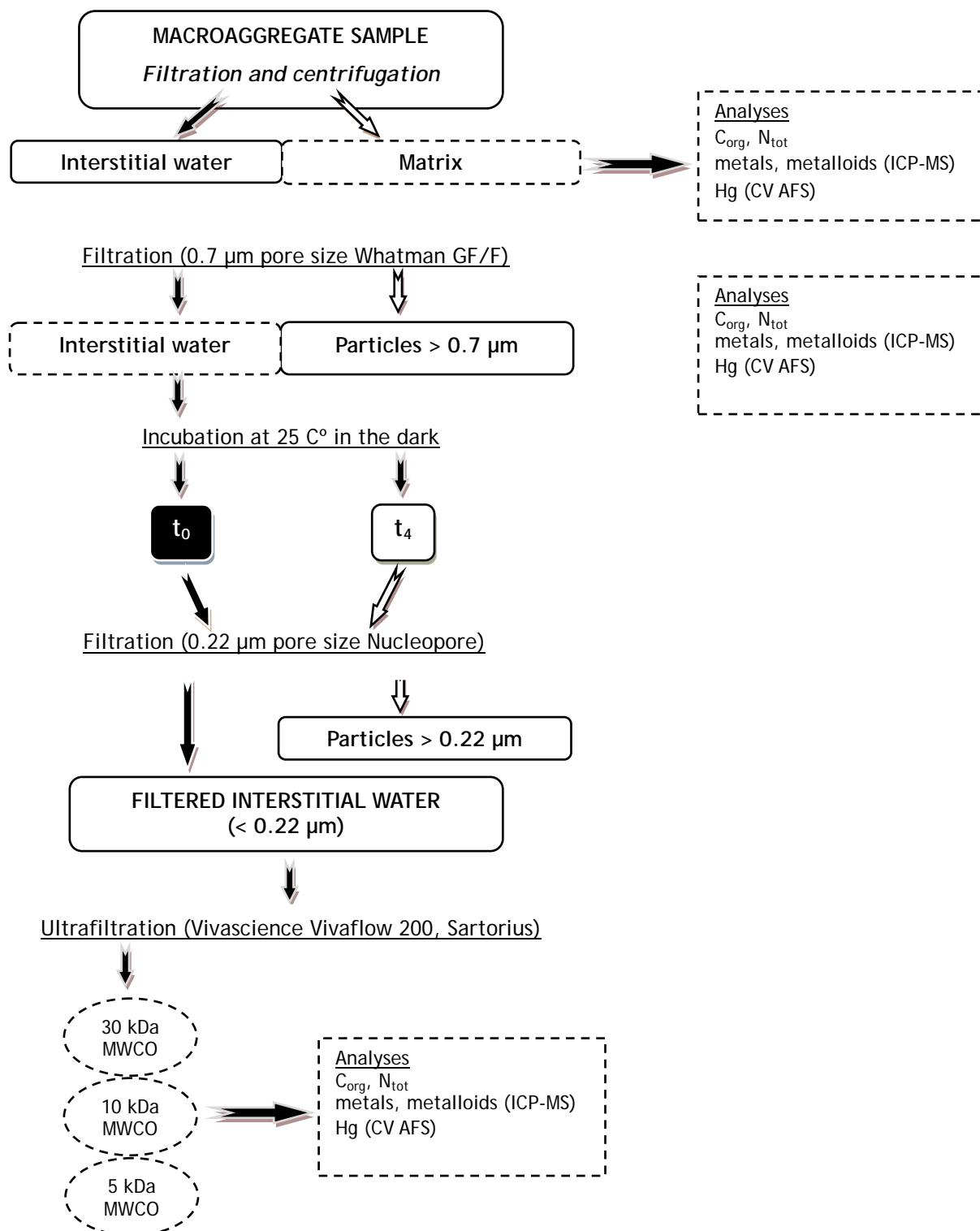


Fig. 1. A schematic diagram showing the macroaggregate sample processing procedure and operational terms used in this study (fractions encircled with broken line were analyzed)

Large (60 L) seawater samples, collected at the same sampling point, were immediately filtered, first through pre-ignited 0.7 µm pore size Whatman GF/F filters, followed by filtration through 0.22 µm pore size Nucleopore filters (Fig. 1). An aliquot (2 L) of filtrate was acidified with conc. HNO<sub>3</sub> (Suprapur, Merck) to a final concentration of 1% v/v and used for dissolved metal and metalloid analyses. To isolate COM, i.e. colloids, the bulk of the filtrate was ultrafiltered through membranes with a nominal molecular weight cut-off (MWCO) of 5 kDa using a Vivasience VivaFlow 200 unit (Sartorius) with a MasterFlex L/S membrane pump (Cole-Parmer) at a flow rate of 300 ml min<sup>-1</sup> at 2.5 bar (Fig. 1). The average concentration factor (CF) was about 46. Retentates were freeze-dried, dissolved in MQ water and desalinated by dialysis (Engel and Handel, 2011) using 1 kDa RC membranes (Spectrapor 7, Spectrum Labs) for 12 hours at 4 °C to reduce salinity from 36 psu to approximately <0.2 psu. The dialysates were freeze-dried again and used for metal, metalloid, C<sub>org</sub> and N<sub>tot</sub> analyses. The importance of final desalinization by dialysis is evident from differences in elemental analyses, for example Sr, between dialyzed and undialyzed seawater colloids (Table 2).

## 2.2. Degradation and fractionation of macroaggregate interstitial water COM

The filtered macroaggregate interstitial water was incubated in the dark for four weeks at 26 °C, the mean summer surface water temperature in the Gulf of Trieste, according to previously described degradation experiments (Faganeli et al., 2010; Koron et al., 2011). It was previously reported (Kovač et al., 2002) that the major *in situ* changes of the relative composition of macroaggregates occurred in the period of about one month. Metals and metalloids were hence analyzed at the beginning (t=0) and at the end of the experiment after four weeks (t=4). After each sampling, the samples were first filtered through 0.22 µm pore size Nucleopore filters and then fractionated sequentially by ultrafiltration (Fig. 1). Ultrafiltration was performed in a “cascade fashion” through membranes with nominal molecular weight cut-off (MWCO) values of 30, 10, 5 kDa, using a Vivasience VivaFlow 200 unit (Sartorius) with MasterFlex L/S membrane pump (Cole-Parmer) at a flow rate of 300 ml min<sup>-1</sup> at 2.5 bar. The average CF was about 5. Retentates were freeze-dried and used for analyses of metal, metalloid, C<sub>org</sub> and N<sub>tot</sub> concentrations.

### 2.3. Analyses

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used for determination of trace metal and metalloid contents in the macroaggregate matrix and interstitial water, surrounding seawater and isolated COM. For digestion of organic material in macroaggregate matrix and interstitial waters and ultrafiltered colloids from incubation experiment a microwave digestion system was applied. A small amount of sample (0.1 g) was weighed into quartz tubes, 1 ml of HNO<sub>3</sub> (65 %, Suprapur, Merck) and 1 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, Suprapur, Merck) added. Samples were subjected to closed vessel microwave digestion (Microwave system ETHOS 1, MILESTONE SN 130471) at max. power of 1500 W: ramp to 130 °C 10 min, ramp to 200 °C 10 min, held 20 min, cooling 20 min. Digested solutions were diluted to 10 mL. The same procedure was applied for blank samples and reference materials. For quality control, a reference material (RM) TORT-2, Lobster hepatopancreas (National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, Canada), was used. This reference material was chosen on a basis of matrix complexity, since no other more suitable CRM is commercially available. Results, normally reported in µg g<sup>-1</sup>, are presented in Table 1. Prior to measurement, the standard calibration solutions were prepared from ICP Multi Element Standard solution XXI (CertiPUR, Merck). Samples of COM and total dissolved metals in seawater were only diluted in 1% HNO<sub>3</sub> (Suprapur, Merck).

Measurements of prepared solutions were made by an Octapole Reaction System (ORS) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (7500ce, Agilent) equipped with an ASX-510 Autosampler (Cetac). Instrumental conditions: Babington nebulizer, Scott-type spray chamber, spray chamber temperature 5 °C, plasma gas flow rate 15 L/min, carrier gas flow rate 0.8 L/min, make-up gas flow rate 0.1 L/min, sample solution uptake flow rate 1 mL/min, RF power 1500 W, reaction cell gases helium or hydrogen 4 mL/min. Tuning of the instrument was made daily. Precision of the method ranged between 3-20% depending on the concentration range. Detection limits were calculated from values of blank samples and three standard deviations of determinations subjected to same procedure as corresponding samples. Detection limits for microwave digested samples were 130 nmol g<sup>-1</sup> for Al, 10 nmol g<sup>-1</sup> for Zn and Fe, 3 nmol g<sup>-1</sup> for Cu and Ni, 1 nmol g<sup>-1</sup> for Mn and Cr, 0.5 nmol g<sup>-1</sup> for Se, V, Ba and Sr, 0.05 nmol g<sup>-1</sup> for Co and 0.01 nmol g<sup>-1</sup> for U, Cd, As and Cs. Detection limits for undigested samples were 2 nmol g<sup>-1</sup> for Al, 1 nmol g<sup>-1</sup> for Cu and

Zn, 0.2 nmol g<sup>-1</sup> for Ba and V, 0.1 nmol g<sup>-1</sup> for Mn, Sr, and Cr, 0.05 nmol g<sup>-1</sup> for Se and Ni and 0.01 nmol g<sup>-1</sup> for Cd, As, Co, U and Cs.

For determination of Hg<sub>tot</sub> in isolated organic matter, a double amalgamation system with detection by cold vapor atomic fluorescence spectrometry (CV AFS) was used (Horvat et al., 1991). Briefly, after the decomposition of samples in the presence of strong acid, Hg<sup>2+</sup> is reduced, with excess SnCl<sub>2</sub>, to volatile elemental mercury (Hg<sup>0</sup>). The elemental Hg is concentrated on a gold trap and detected after desorption at 600 °C by CV AFS Tekran mod. 2500. For method validation and further quality and accuracy control, two commercially available reference materials were used, BCR-61, Aquatic Moss (IRMM) and IAEA-140/TM, Seaweed (IAEA) and the results, usually reported in µg g<sup>-1</sup>, are presented in Table 1. As an external standard, gas phase Hg (Hg<sup>0</sup>) kept at 10 °C in a mercury vapor calibration unit (Tekran, mod. 2505) was used. Precision of the method ranged between 5-8% and the detection limit 0.005 nmol g<sup>-1</sup>.

C<sub>org</sub> and N<sub>tot</sub> were analyzed using a Carlo Erba model EA 1108 CHNS analyzer and Elementar varioMICRO CUBE at a combustion temperature of 1020 °C after vapor phase acidification with 1M HCl to remove inorganic C (Hedges and Stern, 1984). Precision of the method was 3%.

Table 1: Metal and metalloid yields in certified TORT-2 reference material (Lobster Hepatopancreas) from National Research Council of Canada. For Hg determinations two reference materials were used, BCR-61 (Aquatic Moss) (IRMM) and IAEA-140/TM, Seaweed (IAEA). Results are presented as arithmetical means of two determinations for TORT-2 and six determinations  $\pm$  standard deviation for BCR-61 and IAEA-140/TM, respectively.

Element	TORT-2 reference material		
	Certified	Measured	Yield [%]
<b>Zn</b>	180 $\pm$ 6	188	105
<b>Se</b>	5.63 $\pm$ 0.67	8.03	143
<b>Ni</b>	2.50 $\pm$ 0.19	2.16	86
<b>Cr</b>	0.77 $\pm$ 0.15	0.72	93
<b>Sr</b>	45.2 $\pm$ 1.9	43.6	96
<b>Cd</b>	26.7 $\pm$ 0.6	29.2	110
<b>As</b>	21.6 $\pm$ 1.8	26.8	124
<b>Mn</b>	13.6 $\pm$ 1.2	13.3	98
<b>Co</b>	0.51 $\pm$ 0.09	0.55	108
<b>V</b>	1.64 $\pm$ 0.19	1.91	116
<b>Fe</b>	105 $\pm$ 13	112	106
<b>Cu</b>	106 $\pm$ 10	102	97
<b>Pb</b>	0.35 $\pm$ 0.13	0.41	116
<b>BCR-61 reference material</b>			
[ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]			
<b>Hg</b>	0.23 $\pm$ 0.02	0.233 $\pm$ 0.017	
<b>IAEA-140/TM reference material</b>			
[ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]			
<b>Hg</b>	0.038 $\pm$ 0.006	0.039 $\pm$ 0.002	

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Metals and metalloids in macroaggregate matrix and interstitial water colloids and partition coefficients

Concentrations of metals and metalloids in macroaggregate matrix, presented in Table 2, ranged from 0.15 nmol g<sup>-1</sup> (Hg) to 50000 nmol g<sup>-1</sup> (Al). The concentrations of As, Ni, Cr, V and Ba ranged between 30 and 80 nmol g<sup>-1</sup>, while those of Se, Cs, Cd, Co, Hg and U were less than 10 nmol g<sup>-1</sup>. Concentrations of Zn, and Mn and Sr were >700 and >2000 nmol g<sup>-1</sup>, respectively. In the bulk interstitial water colloidal fraction, the concentrations of studied metals and metalloids, except Sr and Al, were up to 1-2 orders of magnitude lower

than those in macroaggregate matrix (Table 2) and were, apart from Se, mainly bound to large (>30 kDa) macromolecules (Table 4). Comparing the concentrations of metals and metalloids in the macroaggregate matrix and bulk interstitial water colloids (Table 2), it appears that most of the studied metals in the matrix, except Cr, Sr and Ni, can be present as particles embedded in an organic matrix, since centrifugation and filtering removed organic and inorganic particles. Especially high concentrations of Al in the matrix indicated the presence of particles as a result of natural weathering processes and particle resuspension. In the complex macroaggregate matrix, containing also microbial cells and inorganic particles, the inorganic component constitutes 20 to 80 % of the total amount of material, depending on the location of macrogel formation in the water column (Kovač et al., 2008). There was also a marked difference between the chemical composition of the macroaggregate matrix and the interstitial water fraction, since the latter is more homogenous in composition, containing higher concentrations of carbohydrates and less lipids and proteins (Koron et al., 2011; Kovac et al., 2004).

Comparison of metal and metalloid concentrations in the macroaggregate matrix and its interstitial water with data on COM isolated from the Gulf of Trieste and those published elsewhere can be instructive (Table 2), since we hypothesized that levels in the interstitial water, mostly composed of colloids, would be comparable to normally occurring COM. It transpired, however, that the content of metals and metalloids in the macroaggregate matrix was of the same order of magnitude as the values in colloids from other coastal (Guo et al., 2000; Sigleo and Helz, 1981) and ocean (Guo et al., 2000) environments, while the levels of metals and metalloids in interstitial water colloids were one to two orders of magnitudes lower than other reported data, but close to values found in colloids isolated from the Gulf of Trieste (Table 2). In this context, high Al concentration found in seawater colloids suggests the presence of inorganic clay matter together with organic component (Sigleo and Helz, 1981).

The comparison of levels of colloid-bound metals (Table 2) with dissolved metals in the Gulf of Trieste is instructive in order to assess the percentage of colloid-bound metals in coastal waters. Most values of dissolved metals in the Gulf of Trieste were mostly similar to those reported for average seawater (Chester, 1990) but with slightly elevated concentrations of Al, V, Mn, Co, As, Cr and Ni, most probably due to the riverine inflows containing elevated concentrations of these metals (Turk and Potočnik, 2001). It appears

that, except Hg, Cu, Ba and V representing nearly 100, 50, 20 and 18% of the total dissolved metals in seawater, respectively, the majority of colloidal metals represent < 15% of the total dissolved metal levels in the Gulf of Trieste. It is interesting to note that  $C_{org}$  and  $N_{tot}$  in the high-molecular-weight (colloidal) organic matter (>5 kDa) isolated from the Gulf of Trieste by ultrafiltration constitute to about 40% and 60% of DOC and TDN, respectively. Our colloidal  $C_{org}$  data are, however, at the upper limit of published values (Mopper et al., 2007). Macroaggregate interstitial water and colloidal  $C_{org}/N_{tot}$  ratios (molar) were similar, 7.4 and 8.0, respectively, but differed from the matrix ratio (27).

The partition coefficient ( $K_d$ ) is an important parameter for assessing the mobility of solutes (metals) through the seawater column (Sanudo-Wilhelmy et al., 1996). It can be expressed as the ratio of the concentration of a solute (metal) in organic colloid fraction ( $[Me_{coll}]$ , mol kg<sup>-1</sup>) to its concentration as free ion ( $[Me_{free}]$ , mol L<sup>-1</sup>) and inorganically complexed ( $[Me_{inorg}]$ , mol L<sup>-1</sup>) in the solution (truly dissolved in seawater)

$$K_d = [Me_{coll}] / ([Me_{free}] + [Me_{inorg}]). \quad (1)$$

Since the metal concentration in the seawater solution  $[Me_{sw}]$  is equivalent to

$$[Me_{sw}] = [Me_{free}] + [Me_{coll}] + [Me_{inorg}] \quad (2)$$

(Escher and Sigg, 2004), it follows that

$$[Me_{free}] + [Me_{inorg}] = [Me_{sw}] - [Me_{coll}] \quad (3)$$

and

$$K_d = [Me_{coll}] / ([Me_{sw}] - [Me_{coll}]). \quad (4)$$

$Me_{sw}$  denotes the concentration of dissolved metals in seawater of the Gulf of Trieste (Table 2). The same approach can be used for the partition coefficients between metal and metalloid in macroaggregate interstitial water colloids ( $K_{dm.coll.}$ ) and macroaggregate matrix ( $K_{dm.mat.}$ ) and dissolved phase. Similarly, the partitioning of metal between its particulate fraction ( $[Me_p]$ , mol kg<sup>-1</sup>) and free ion and inorganic complexes in the water can be written as:

$$K_{dp} = [Me_p] / ([Me_{sw}] - [Me_{coll}]). \quad (5)$$

Values of  $K_{dm.mat.}$ ,  $K_{m.mat}$  and  $K_{dcoll}$  being lower than that for  $K_{dp}$  (Table 2) suggest a rather weak metal binding capacity of marine colloids compared to that of particulate matter. Only for Mn,  $K_{dm.mat}$  appears similar to  $K_{dp}$  probably due to the presence of inorganic particles in macroaggregate matrix. Conversely, very high  $K_d$  values for Hg confirm its

strong association with all studied fractions. The  $K_d$  values consequently support the expectations that metals are not distributed homogenously in the various particle size pools of the Gulf of Trieste.

### *3.2. Metal/organic carbon ( $Me/C_{org}$ ) ratios*

Since  $C_{org}$  is a major organic constituent in marine colloids and carrier of accompanying metals (Guo and Santschi, 1997), the metal concentrations can be normalized to  $C_{org}$  concentrations (Table 3). This can bypass the effects of different sample handling and permits comparison of our results with those of marine colloids reported elsewhere (Guo et al., 2000). Comparing the  $Me/C_{org}$  ratios of macroaggregate matrix with data of macroaggregate interstitial water colloids (Table 3) it appears that, even though the matrix contains much higher  $C_{org}$  content compared to interstitial water colloids (Koron et al., 2011), the concentrations of metals and metalloids, and consequently the  $Me/C_{org}$  ratios, do not follow this difference. The  $Me/C_{org}$  ratios do not take into account the composition of organic matter present, since the macroaggregate matrix consists of a large number of C atoms per mass of organic matter, but it should be pointed out that in macromolecules the number of free or potentially free functional groups, with different affinities for various metal ions, are limited and some occupied by cross-linking (Verdugo and Santschi, 2010). Therefore, the “metal-binding potential” of matrix is probably weaker than the “binding potential” of polymers and oligomers alone composing the macroggregate matrix. The  $Me/C_{org}$  ratios in ultrafiltrates (Table 3) support this statement, since in most cases the ratios are increasing not only due to decreasing  $C_{org}$  contents but also probably due to the lack of availability of appropriate binding sites. The  $C_{org}$  normalization reveals that the majority of  $Me/C_{org}$  ratios, except Ni, Cr and Mn, of the interstitial water colloids appear more comparable, than the  $Me/C_{org}$  ratios of the macroaggregate matrix, to those of colloids isolated from the Gulf of Trieste and other reported data on marine colloids. Some differences noted between Irving-Williams series, reflecting the increasing binding strength of the metals with organic ligands in the following order  $Mg < Ca = Cd < Mn < Co < Zn < Ni < Cu < Hg$  (Chester, 1990), together with our macroaggregate colloidal  $Me/C_{org}$  ratios, i.e.  $Hg, Cd, Cs, U < Se, Co < As, Ba, V, Cu, Zn < Al, Ni, Mn, Cr, Fe, Sr$ , can be explained by variable (higher/lower) background concentrations of the metals and metalloids and composition of colloids. Our macroaggregate colloidal  $Me/C_{org}$  ratio series appears not to

differ much from that of marine colloids, isolated by ultrafiltration and subsequent dialysis, from the Gulf of Trieste, i.e. Cs, Hg < Co, Cd, Cs, Se < As, Mn, Ba, V, U, Cr, Ni < Zn, Cu, Al, Sr and elsewhere, i.e. Cd, Pb < Co < Mn < Zn, Cr, Ni < Cu (Table 3), and metal-humics stabilities (Sholkovitz, 1978). The latter is not surprising since humics also contain “carbohydrate components” in various proportions (Killops and Killops, 2005). On the other hand, the particulate Me/C<sub>org</sub> ratios are higher, probably due to the presence of inorganically bound metals, but the Me/C<sub>org</sub> ratio series, e.g. Hg < Cd < Ni < Cu < Cr < Mn < Zn < Fe, appears not to be very different from other Me/C<sub>org</sub> ratio series in the Gulf of Trieste.

### *3.3. Metals and metalloids during degradation of the macroaggregate interstitial water colloids*

Because of their higher MW, macromolecules (10-30 kDa, >30 kDa) in the macroaggregate colloidal fraction are more prone to degradation than smaller macromolecules (5-10 kDa) (Koron et al., 2011) and the metals associated with higher MW seem markedly preserved (Table 4). The degradation experiment, studied by C<sub>org</sub> and N<sub>tot</sub> contents in three different size fractions of macroaggregate interstitial water ultrafiltrates, showed that at the beginning of the experiment the highest MW fraction (>30 kDa) contained the highest levels of C<sub>org</sub> and the lowest C<sub>org</sub>/N<sub>tot</sub> ratios (Koron et al., 2011). The faster degradation of higher MW fractions (Table 4) was recently explained by a faster degradation of polysaccharides (Faganelli et al., 2010). N-containing polysaccharides (Faganelli et al., 2009) were less degraded contributing to preservation of the total organic N in mature macroaggregates (Kovac et al., 2002). The majority of metals can be associated with N-containing macromolecules, probably aminopolysaccharides, where amino (Hunter and Beveridge, 2008) as well as sulphydryl (Ciglenecki et al., 2000), sulphonic (Alvarado Quiroz et al., 2006) and carboxyl groups (Quigley et al., 2002; Giani et al., 2005), can contribute to the metal sorption potential of the heteropolysaccharide colloids (Escher and Sigg, 2004; Hunter and Beveridge, 2008). Conversely, the lower MW fraction (5-10 kDa), mostly composed of oligo- and polysaccharides (Koron et al., 2011), is less prone to degradation (Benner, 2002). The increase with time of Me/C<sub>org</sub> ratios (Fig. 2) in all macroaggregate colloid fractions was probably due to the loss of C<sub>org</sub> during the organic matter degradation and to relative increase of the number of metal-binding sites.

#### 4. Summary and environmental implications

Macroaggregates of mainly phytoplanktonic origin form periodically in the northern Adriatic - Gulf of Trieste, and produced by agglomeration of dissolved organic macromolecules and composed mainly of heteropolysaccharides, carry metals and metalloids because of their relatively slow degradation (Turk et al., 2010). Fractionation into interstitial water and matrix and their analysis revealed significantly higher metal, especially Al as an indicator of continental weathering or particle resuspension, and metalloid contents in the matrix, suggesting that the latter (and the bulk macroaggregate sample) contains inorganic metal-containing particles. In the colloidal fractions, that contain higher concentrations of carbohydrate and less lipid (Faganelli et al., 2010), most observed metals and metalloids, except Se, are bound mainly onto large macromolecules (>30 kDa). The Me/C<sub>org</sub> ratios, that provide data on metals (Me) bound to organic matter, are higher in the macroaggregate interstitial water colloids than the matrix indicating that the “metal-binding potential” of matrix is probably weaker than the “binding potential” of polymers and oligomers in the macroaggregate interstitial water. Differences, especially in Hg, between Irving-Williams series and macroaggregate Me/C<sub>org</sub> ratio series are explicable in terms of the variable background concentrations of metals and metalloids and the colloid composition.

Despite the fact that the larger macromolecules (10-30 kDa, >30 kDa) are more prone to microbial degradation than smaller macromolecules (5-10 kDa), mostly composed of oligo- and polysaccharides, the metals associated with higher MW, composed of N-containing heteropolysaccharides, are markedly retained in this fraction. The temporal increase of Me/C<sub>org</sub> ratios can be due to the loss of organic C because of organic matter degradation and to relative increase of number of metal-binding sites.

Our findings could have an important implication on the composition and properties of the northern Adriatic DOM, originating mainly from phytoplankton, where binding of metals by macromolecules (heteropolysaccharides) is possible. They can agglomerate into macroaggregates (Svetličić et al., 2005; Turk et al., 2010) and can be considered as a precursor of macroaggregate colloids. Since the polysaccharide component in the higher MW fraction appears to be more susceptible to degradation than N-containing

macromolecules, they constitute a possible path of metal immobilization and preservation. The proportion of macromolecular-bound metals (other than Hg and Cu), and metalloids in the pool of total dissolved metals and metalloids in the coastal seawater appears to be rather low. Hence, the majority of dissolved metals are bound in the low MW (<5 kDa) organic compounds and inorganic complexes, while Cu and especially Hg are associated with the high MW organic colloids. Especially for Hg, nearly all colloid-bound metal is immobilized (and slowly degraded), and therefore probably less prone to biogeochemical transformation (Lin et al., 2012). According to the distribution coefficients, the northern Adriatic organic colloids, including macroaggregates, exhibit rather weak metal-binding capacity compared to particulate matter.

Table 2: Metal and metalloid concentrations in the macroaggregate matrix and bulk interstitial water colloids and dissolved metal and metalloid concentrations in seawater, marine colloids and particulate matter (Kovač et al., 2008) from the Gulf of Trieste. Corresponding distribution coefficients ( $L \text{ kg}^{-1}$ ) of metals and metalloids for macroaggregate matrix ( $\text{Log Kd}_{m,\text{mat}}$ ) and interstitial water colloids ( $\text{Log Kd}_{m,\text{coll}}$ ), marine colloids ( $\text{Log Kd}_{\text{coll}}$ ) and particulate matter ( $\text{Log Kd}_p$ ) are included.

Me	Macroagg. matrix	Macroagg. int. water colloids	Seawater colloids		Seawater		Particles <sup>2</sup>	$\text{Log Kd}_{m,\text{mat}}$	$\text{Log Kd}_{m,\text{coll}}$	$\text{Log Kd}_{\text{coll}}$	$\text{Log Kd}_p$
	[nmol g <sup>-1</sup> ]	[nmol g <sup>-1</sup> ]	Undialyzed	Dialyzed	Dissolved	Colloids					
Al	49600	12	24	1570	490	20	-	4.4	1.5	3.5	-
Cu	82	3	LOD	95	14	7	770	4.1	2.6	4.2	5.1
Zn	757	LOD	3	810	< 31	3	275900	4.4	-	4.1	6.0
Se	3	0.5	0.5	1	4	0.5	-	2.9	4.2	2.5	-
Cs	1	0.03	-	-	2	-	-	2.7	1.2	-	-
Ni	58	27	1	20	334	0.8	400	2.3	2.0	2.8	2.0
Cr	85	77	0.8	9	78	0.6	1260	3.1	3.0	2.0	4.2
Fe	-	622	-	-	-	-	4	-	-	-	-
Cd	0.5	0.06	-	0.1	0.5	-	38	3.0	2.0	2.3	3.6
As	30	3	1.3	9	94	1.2	-	3.6	2.5	3.0	3.0
Mn	2034	57	0.4	12	47	0.4	5360	4.7	3.1	2.5	4.2
Co	12	0.5	-	1	4	-	-	3.5	2.0	2.5	-
V	73	2	2	6	104	2	-	2.8	1.3	2.0	-
Ba	46	2	1.5	5	42	1.3	-	3.0	1.7	2.0	-
U	0.5	0.2	0.4	15	10	0.4	-	1.7	1.3	3.1	-
Sr	2420	1560	4090	1750	76000	3690	-	1.3	1.2	1.2	-
Hg	0.15 <sup>1</sup>	0.01 <sup>1</sup>	0.01	0.08	5	5	30	>> 6	>> 6	>> 6	>> 6
C <sub>org</sub> *	13667	158.3	38	2300	119 <sup>3</sup>	44.8	11250				
N <sub>tot</sub> *	500	21.4	7.14	288.6	12.6 <sup>4</sup>	7.64	1643				

\* Concentrations are reported in  $\mu\text{mol g}^{-1}$  and  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , LOD below limit of detection

<sup>1</sup>(Koron et al., 2011), <sup>2</sup>(Kovač et al., 2008), <sup>3</sup>De Vittor, pers. comm., <sup>4</sup>MBSS data

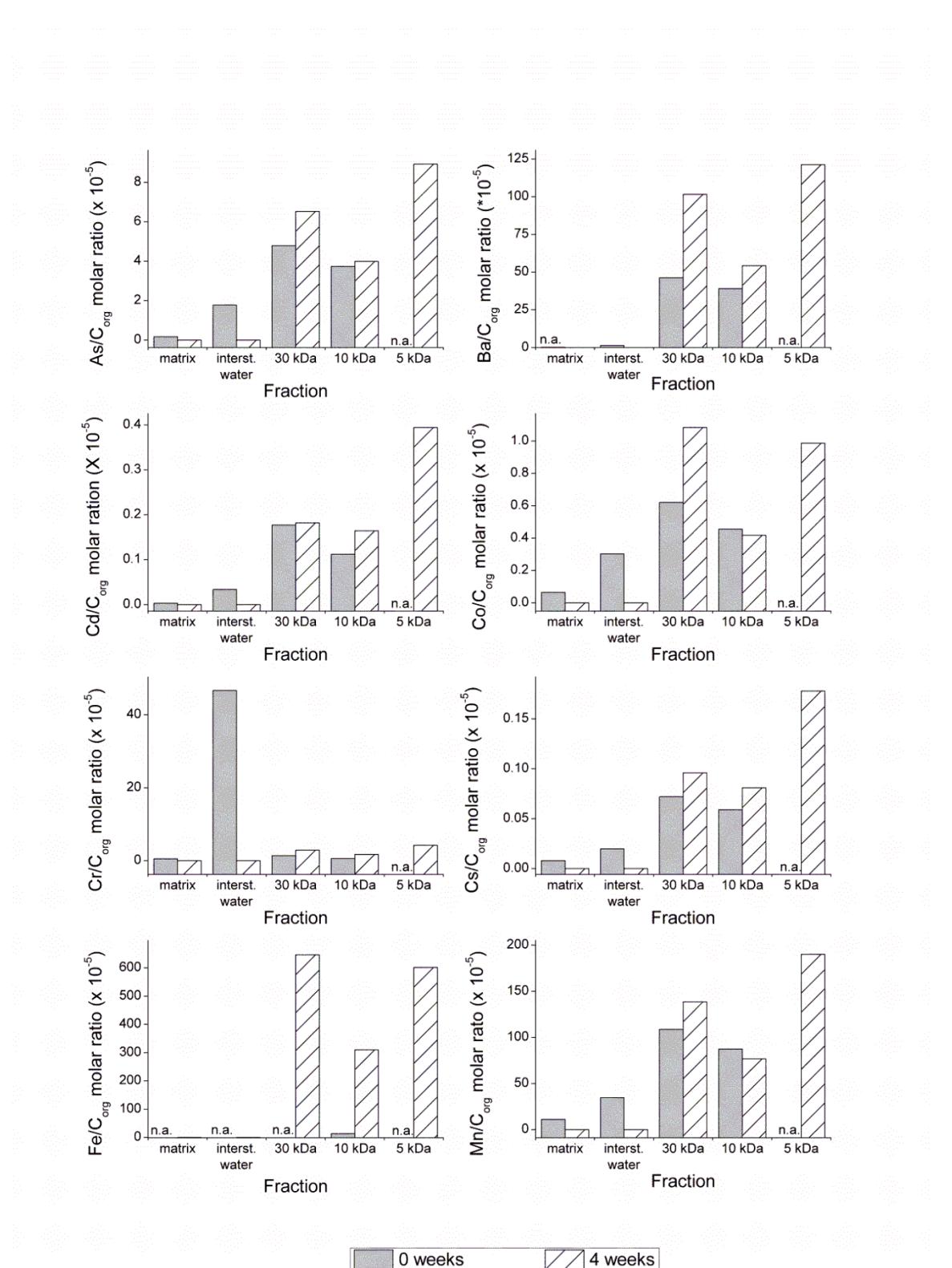
Table 3: Me/C<sub>org</sub> (molar) ratios x 10<sup>-5</sup> in marine colloids, macroaggregate matrix and interstitial water colloids and particulate matter (Kovac et al., 2008) from the Gulf of Trieste compared with some reported ratios for marine colloids.

Me	Gulf of Trieste (this study)					Gulf of Mexico (Guo et al., 2000)	Middle Atlantic Bight (Guo et al., 2000)	Galveston Bay (Benoit et al., 1994)
	Macroagg. matrix	Macroagg. interstitial water colloids	Seawater colloids (Undialyzed)	Seawater colloids (Dialyzed)	Suspended particles (surface)			
<b>Al</b>	274	7.32	62.3	68.4	-	2.8 ± 2.5	3.3 ± 2.6	4.2 ± 3.6
<b>Cu</b>	0.45	1.59	19.2	4.13	5.1	1.93 ± 0.40	2.5 ± 1.9	4.9 ± 1.1
<b>Zn</b>	4.19	3.24	8.92	34.9	171	8.8 ± 6.7	2.8 ± 2.6	2.0 ± 0.7
<b>Se</b>	0.017	0.27	1.36	0.043	-	-	-	-
<b>Cs</b>	0.008	0.019	-	0.001	-	-	-	-
<b>Ni</b>	0.33	16.47	2.45	0.93	2.5	1.6 ± 1.0	5.5 ± 4.3	2.9 ± 0.7
<b>Cr</b>	0.47	46.5	1.83	0.37	7.1	2.6 ± 1.1	20 ± 24	2.7 ± 1.8
<b>Fe</b>	-	368	-	-	231	22 ± 9	82 ± 11	41 ± 32
<b>Cd</b>	0.003	0.033	-	0.005	0.25	0.013 ± 0.008	0.059 ± 0.052	0.014 ± 0.007
<b>As</b>	0.17	1.77	3.46	0.40	-	-	-	-
<b>Mn</b>	11.3	34.7	0.98	0.55	30.4	0.23 ± 0.18	1.1 ± 1.2	0.2 ± 0.3
<b>Co</b>	0.065	0.30	-	0.044	-	0.083 ± 0.053	0.12 ± 0.10	0.28 ± 0.07
<b>V</b>	0.40	1.16	6.08	0.27	-	0.26 ± 0.31	0.34 ± 0.39	0.35 ± 0.31
<b>Ba</b>	0.25	1.32	3.81	0.19	-	0.031 ± 0.014	0.084 ± 0.050	1.2 ± 2.3
<b>U</b>	0.003	0.15	1.15	0.66	-	-	-	-
<b>Sr</b>	13.4	950	4560	178	-	-	-	-
<b>Hg</b>	0.001	0.004	0.03	0.003	0.15	-	-	-

Table 4: Distribution of metals, metalloids and organic carbon ( $C_{org}$ ) and total N ( $N_{tot}$ ) among size fractions during degradation of the macroaggregate interstitial water colloids in the Gulf of Trieste. Concentrations of metals and metalloids are in  $\text{nmol g}^{-1}$  and  $C_{org}$  and  $N_{tot}$  are in  $\mu\text{mol g}^{-1}$ .

Size Fraction	$C_{org}$	$N_{tot}$	Zn	Se	Cs	Ni	Cr	Sr	Cd	As	Mn	Co	V	Ba	U	Hg
<b>beginning (t=0)</b>																
>30 kDa	126	60.7	43.0	LOD	0.09	LOD	LOD	3995	0.22	6.0	137	0.8	3.3	58.3	0.5	0.01
10-30 kDa	127	49.3	25.3	0.8	0.07	LOD	LOD	3367	0.14	4.7	111	0.6	2.3	49.6	0.4	0.03
5-10 kDa	698	39.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01
<b>4 weeks (t=4)</b>																
>30 kDa	39	27.9	-	LOD	0.04	LOD	LOD	1723	0.07	2.6	54	0.4	1.2	39.6	0.2	0.65
10-30 kDa	65	17.9	38.5	LOD	0.05	LOD	LOD	1769	0.11	2.6	50	0.3	1.1	35.3	0.2	0.02
5-10 kDa	102	22.9	112.4	1.0	0.18	5.2	4.3	6734	0.40	9.1	194	1.0	4.8	123.7	0.8	0.07

LOD: below limit of detection



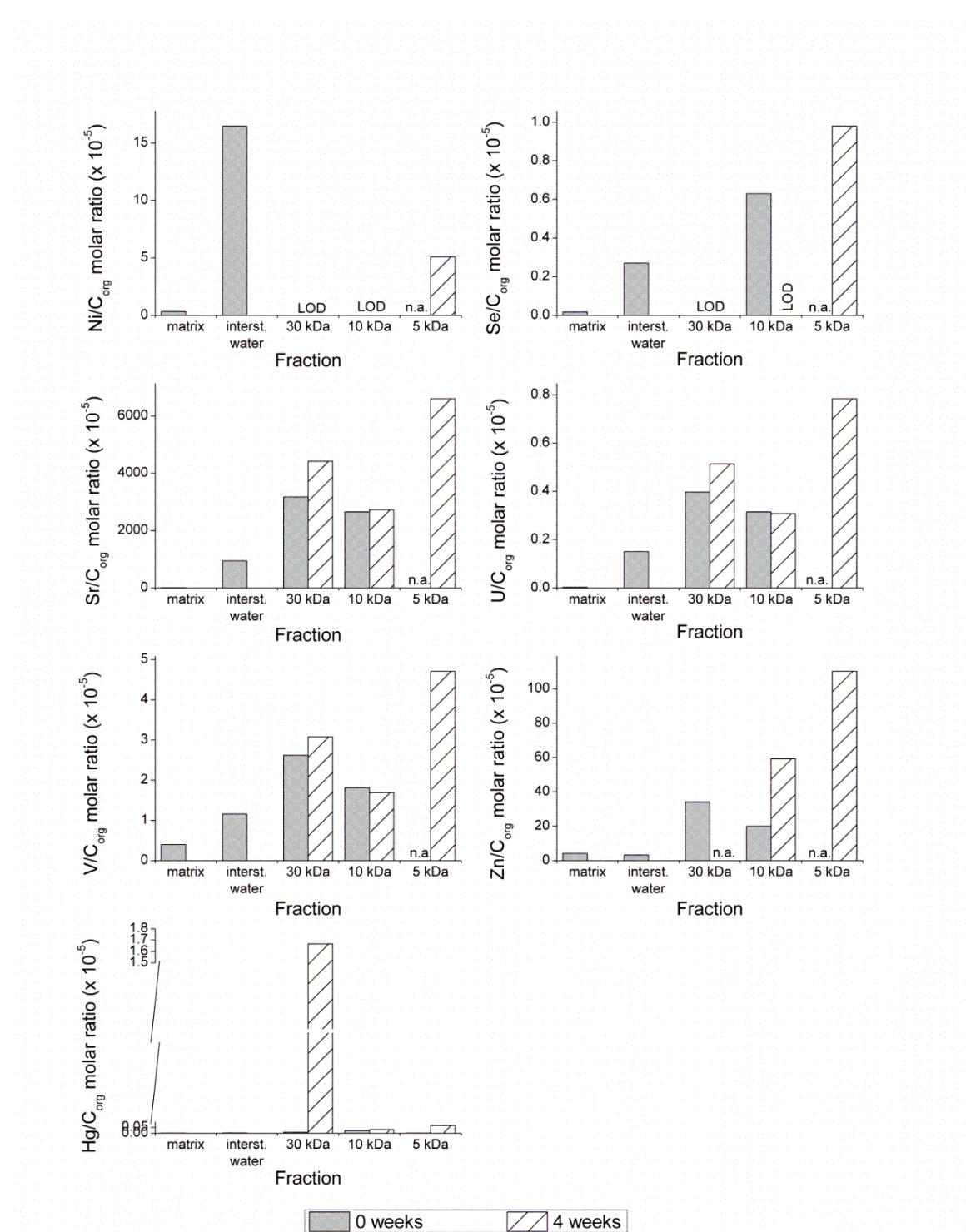


Fig. 2: Metal/organic carbon (Me/C<sub>org</sub>) ratios (molar) in macroaggregate matrix, bulk colloids of interstitial water and ultrafiltered fractions at the beginning (0 weeks) and after 4 weeks of degradation experiment

## References

- Alvarado Quiroz, N.G., Hung, C.-C., Santschi, P.H., 2006. Binding of thorium (IV) to carboxylate, phosphate and sulfate functional groups from marine exopolymeric substances (EPS). Mar. Chem. 337-353
- Benner, R., 2002. Chemical composition and reactivity. In: D.A. Hansell, D.A., Carlson, C.A. (Eds.), Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Elsevier, San Diego, California, pp. 59-90.
- Benoit, G., Oktay, S., Cantu, A., Hood, M.E., Coleman, C., Corapcioglu, O., Santschi, P.H., 1994. Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al, and Mn between filter-retained particles, colloids, and solution in six Texas estuaries. Mar. Chem. 45, 307-336.
- Benoit, J.M., Mason, R.P., Gilmour, C.C., Aiken, G.R., 2001. Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolates from the Florida Everglades. Geochim. Cosmochim. Acta 65, 4445-4451.
- Buffle, J., Wilkinson, K.J., Stoll, S., Filella, M., Zhang, J., 1998. A generalized description of aquatic colloidal interactions: The three-colloidal component approach. Environ. Sci. Technol. 32, 2887-2899.
- Chester, R., 1990. Marine Geochemistry. Chapman & Hall, London.
- Ciglenecki, I., Čosović, B., Plavšić, M., Furić, K., Minacci, A., Baldi, F., 2000. The role of reduced sulfur species in the coalescence of polysaccharides in the Adriatic Sea. Mar. Chem. 71, 233-249.
- Degobbis, D., Precali, R., Ferrari, C.R., Djakovac, T., Rinaldi, A., Ivančić, I., Gismondi, M., Smidlaka, N., 2005. Changes in nutrient concentrations and ratios during mucilage events in the period 1999-2002. Sci. Tot. Environ. 353, 103-114.
- Doucet, F.J., Lead, J.R., Santschi, P.H., 2007. Colloid-trace element interactions in aquatic systems. In: Wilkinson, K.J., Lead, J.R. (Eds.), Environmental colloids and particles: Behaviour, separation and characterisation. IUPAC series on analytical and physical chemistry of environmental system. John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 95-158.
- Engel, A., Handel, N., 2011. A novel protocol for determining the concentration and composition of sugars in particulate and high molecular dissolved organic matter (HMW-DOM) in sea water. Mar. Chem. 127, 180-191.

- Escher, B.I., Sigg, L., 2004. Chemical speciation of organics and of metals at biological interphases. In: van Leeuwen, H.P., Kostner, W. (Eds.), *Physicochemical kinetics and transport in biointerfaces*. John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 205-269.
- Faganeli, J., Ogrinc, N., Kovac, N., Kukovec, K., Falnoga, I., Mozetic, P., Bajt, O., 2009. Carbon and nitrogen isotope composition of particulate organic matter in relation to mucilage formation in the northern Adriatic Sea. *Mar. Chem.* 114, 102-109.
- Faganeli, J., Mohar, B., Kofol, R., Pavlica, V., Marinsek, T., Rozman, A., Kovac, N., Vuk Surca, A., 2010. Nature and lability of northern Adriatic macroaggregates. *Mar. Drugs* 8, 2480-2492.
- Filella, M., 2007. Colloidal properties of submicron particles in natural waters. In: K.J. Wilkinson and J.R. Lead (Editors), *Environmental colloids and particles*. IUPAC series on analytical and physical chemistry of environmental systems. John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 17-94.
- Giani, M., Savelli, F., Berto, D., Zangrandi, V., Čosović, B., Vojvodić, V., 2005. Temporal dynamics of dissolved and particulate organic carbon in the northern Adriatic Sea in relation to the mucilage events. *Sci. Tot. Environ.* 353, 126-138.
- Guo, L., Santschi, P.H., 1997. Composition and cycling of colloids in marine environments. *Rev. Geophys.* 35, 17-40.
- Guo, L.D., Santschi, P.H., Warnken, K.W., 2000. Trace metal composition of colloidal organic material in marine environments. *Mar. Chem.* 70, 257-275.
- Hedges, J.I., Stern, J.H., 1984. Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnol. Oceanogr.* 29, 657-663.
- Hunter, R.C., Beveridge, T.J., 2008. Metal-bacteria interactions at both the planktonic cell and biofilm levels. In: A. Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. (Eds.), *Metal ions in life sciences*. John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 127-165.
- Ingri, J., Nordling, S., Larsson, J., Ronnegard, J., Nilsson, N., Rodushkin, I., Dahlqvist, R., Andersson, P., Gustafsson, O., 2004. Size distribution of colloidal trace metals and organic carbon during a coastal bloom in the Baltic Sea. *Mar. Chem.* 91, 117-130.
- Kemp, M., Faganeli, J., Puškarić, S., Smith, E.M., Boynton, W.R., 1999. Pelagic-benthic coupling and nutrient cycling. In: Malone, T.C., Malej, A., Harding, L.W. Jr., N. Smolak, N., Turner, R.E. (Eds.), *Ecosystems at the land-sea margin: drainage basin to coastal sea*. American Geophysical Union, Washington DC, USA, pp. 295-339.

- Killops, S.D., Killops, V.J., 2005. Introduction to organic geochemistry. Blackwell, Oxford, United Kingdom.
- Koron, N., Faganeli, J., Falnoga, I., Kovac, N., 2011. Interaction of macroaggregates and Hg in coastal waters (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). Geomicrobiol. Jour. 27, 615-624.
- Kovac, N., Bajt, O., Faganeli, J., Sket, B., Orel, B., 2002. Study of macroaggregate composition using FTIR and H-NMR spectroscopy. Mar. Chem. 78, 205-215.
- Kovac, N., Faganeli, J., Bajt, O., Sket, B., Orel, B., Penna, N., 2004. Chemical composition of macroaggregates in the northern Adriatic Sea. Org. Geochem. 35, 1095-1104.
- Kovač, N., Faganeli, J., Bajt, O., 2008. Mucous macroaggregates in the Northern Adriatic. In: Stefansson, O. (Ed.), Geochemistry Research Advances. Nova Science Publishers, Hauppauge, N.Y., pp. 119-141.
- Kujawinski, E.B., Del Vecchio, R., Blough, N.V., Klein, G.C., Marshall, A.G., 2004. Probing molecular-level transformations of dissolved organic matter: insights on photochemical degradation and protozoan modification of DOM from electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Mar. Chem. 92: 23-37.
- Lamborg, C.H., Fitzgerald, W.F., Skoog, A., Visscher, P.T., 2004. The abundance and source of mercury-binding organic ligands in Long Island Sound. Mar. Chem. 90, 151-163.
- Lin, C.-C., Yee, N., Barkay, T., 2012. Microbial transformations in the mercury cycle. In: Liu, G., Cai, Y., O'Driscoll, N. (Eds.), Environmental chemistry and toxicology of mercury. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 155-191.
- Mopper, K., Stubbins, A., Ritchie, J.D., Bialk, H.M., Hatcher, P.G., 2007. Advanced instrumental approaches for characterization of marine dissolved organic matter: Extraction techniques, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Chem. Rev. 107, 419-442.
- Muller, F.L.L., 1996. Interaction of copper, lead and cadmium with the dissolved, colloidal and particulate components of estuarine and coastal waters. Mar. Chem. 52, 245-268.

- Quigley, M.S., Santschi, P.H., Hung, C.-C., Guo, L., Honeyman, B.D., 2002. Importance of acid polysaccharides for  $^{234}\text{Th}$  complexation to marine organic matter. Limnol. Oceanogr. 47, 367-377.
- Sanudo-Wilhelmy, S.A., Rivera-Duarte, I., Russell Flegal, A., 1996. Distribution of colloidal trace metals in the San Francisco Bay Estuary. Geochim. Cosmochim. Acta 60, 4933-4944.
- Sholkovitz, E.R., 1978. The flocculation of dissolved Fe, Mn, Al, Cu, Ni, Co and Cd during estuarine mixing. Earth Planet. Sci. Lett. 41, 77-86.
- Sigleo, A.C., Helz, G.R., 1981. Composition of estuarine colloidal material: major and trace elements. Geochim. Cosmochim. Acta 45, 2501-2509.
- Svetličić, V., Žutić, V., Hozić Zimmermann, A., 2005. Biophysical scenario of giant gel formation in the northern Adriatic Sea. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1048, 524-527.
- Turk, V., Hagstrom, A., Kovač, N., Faganeli, J., 2010. Composition and function of mucilage macroaggregates in the northern Adriatic. Aquat. Microb. Ecol. 61, 279-289.
- Turk, V., Potočnik, B., 2001. Pollution hot spots and sensitive areas along the Slovenian coast. Ann. Ser. hist. nat. 11, 239-252.
- van Leeuwen, H.P., Buffel, J., 2009. Chemodynamics of aquatic metal complexes: from small ligands to colloids. Environ. Sci. Technol. 43, 7175-7183.
- Verdugo, P., Alldredge, A.L., Azam, F., Kirchman, D.L., Passow, U., Santschi, P.H., 2004. The oceanic gel phase: a bridge in the DOM-POM continuum. Mar. Chem. 92, 67-85.
- Verdugo, P., Santschi, P.H., 2010. Polymer dynamics of DOC network and gel formation in seawater. Deep Sea Res. II 57, 1486-1493.
- Wells, M.L., 2002. Marine colloids and trace metals. In: D.A. Hansell, D.A., Carlson, C.A. (Eds.), Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Elsevier, San Diego, California, pp. 367-404.
- Wells, M.L., Smith, G.J., Bruland, K.W., 2000. The distribution of colloidal and particulate bioactive metals in Narragansett Bay, RI. Mar. Chem. 71, 143-163.

### 3 RAZPRAVA IN SKLEPI

#### 3.1 RAZPRAVA

Fenomen morskih makroagregatov, ki ga je mogoče relativno redno opazovati v Tržaškem zalivu, ni omejen le na to območje, temveč so ga opazili tudi v drugih obalnih morjih. Je pa obseg, v katerem se pojavlja pri nas, edinstven (Kovač in sod., 2008). Glavni gradniki makroagregatov so heteropolisaharidi, ki jih v stanju prehranskega stresa v povečanih količinah izločajo diatomeje oz. fitoplankton (Del Negro in sod., 2005; Kovač in sod., 2004). Visoko razmerje raztopljenega anorganskega N (DIN – dissolved inorganic nitrogen)/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, ki se odraža kot prehranski stres, je posledica velikega vnosa nitratov z rekami. Neugodne razmere se lahko v tem okolju zaradi stratifikacije vodnega stolpca, pri čemer je manj slana oz. manj gosta voda pri vrhu, ohranijo dlje (Faganelli in sod., 2009), kar pa ne vpliva le na aktivnost primarnih producentov, temveč tudi na hitrost in učinkovitost mikrobne razgradnje oz. na aktivnost heterotrofnih organizmov (Pettine in sod., 2001; Turk in sod., 2010). De Vittor in sod. (2008) ter Fonda Umani in sod. (2007) so pokazali, da ob pojavu makroagregatov prihaja do statistično značilnega znižanja koncentracij DOC v vodnem stolpcu, kar nedvoumno kaže na dejstvo, da je naravno prisotna DOM prekurzor makroagregatov. Struktura in sestava makroagregatov sta tako odvisni od sestave in vsebine morske vode, v kateri prihaja do njihovega nastanka (Del Negro in sod., 2005), pri čemer potekajo interakcije med raztopljeno snovjo, okoliškimi organizmi ter delci. V naši raziskavi (Koron in sod., 2011; Coron in sod., v recenziji), v kateri smo se ukvarjali s povezavo med makroagregati, DOM in kovinami, še posebno Hg, smo ugotovili, da matriks makroagregatov, t. j. netopni del, vsebuje zelo velike količine kovin, kot je npr. Al, kar je mogoče povezati le s prisotnostjo alumosilikatnih oz. tudi drugih mineralnih delcev. Ob primerjavi naših rezultatov z rezultati, pridobljenimi v podobnih študijah (Guo in sod., 2000), smo ugotovili, da se večina kovin pojavlja v pretežno primerljivih koncentracijah oz. primerljivih Me/C<sub>org</sub> razmerjih, izstopajoče rezultate pa smo povezali z drugačnimi naravnimi koncentracijami opazovanih kovin v vodnem stolpcu Tržaškega zaliva (Koron in sod., v recenziji). Večivalentne kovine lahko v strukturi makroagregatov igrajo pomembno vlogo prečnih povezovalcev posameznih organskih monomerov (Chin in sod., 1998).

Naravno DOM in OM makroagregatov smo z uporabo ultrafiltracije ločili v več velikostnih razredov. V primeru naravne DOM smo se ukvarjali predvsem s celokupnimi koloidi (COM, 1 kDa – 0,2 µm), medtem ko smo koloide v porni vodi makroagregatov ločili v tri velikostne razrede: > 30 kDa, 15-30 kDa in 5-15 kDa, da bi lahko opazovali, ali mikrobnja razgradnja preferira določeno velikostno frakcijo OM. COM je v morskem okolju pomembna frakcija OM, saj po naših podatkih predstavlja okoli 40 % celotne DOM, kar sovpada tudi z rezultati drugih raziskav (Benner in sod., 1992, 1997; Chin in sod., 1998). Ugotovili smo, da najpomembnejšo vlogo igra velika frakcija COM (> 30 kDa), katere pomembnost so opisali že Pettine in sod. (1999). Pomembnost koloidne frakcije se je izrazila zlasti v primeru Hg, saj koloidno vezano Hg predstavlja kar 100 % vsega raztopljenega Hg v vodnem stolpcu Tržaškega zaliva. Za večino preostalih kovin smo ugotovili, da koloidno vezana frakcija predstavlja približno 15 % vse raztopljene kovine, pri nekaterih je ta odstotek nekoliko višji, razlika med odstotki koloidno vezane kovine pa kaže na specifičnost interakcij med OM in posameznimi kovinami. Podobne deleže so ob razgradnji fitoplanktona opazili tudi Wang in Guo (2001) ter Wells in sod. (2000). Visoki deleži koloidno vezanega Hg niso presenetljivi, saj so za Hg značilne velike konstante vezave in njegova visoka afiniteta do OM (Ravichandran, 2004). Babiarz in sod. (2003) so z uporabo ultrafiltracije in stabilnih izotopov prišli do nekoliko nižjih deležev na koloidno snov vezanega Hg (57,5 % za THg in 60% za MeHg), vendar so bili koloidi v njihovem delu definirani v drugačnem velikostnem razponu, in sicer 10 kDa – 0,7 µm, kar pomeni, da je bila lahko ocena nekoliko prenizka. Z nadzorom in izračunom masne bilance tako DOC kot Hg so pokazali, da je uporaba ultrafiltracije in stabilnih izotopov zelo zanesljiva in primerna metoda za tovrstne študije. Nižje deleže koloidno vezanega Hg v morskem okolju so izmerili tudi Guentzel in sod. (1996), nasprotno pa so Guo in sod. (2002) izmerili, da je več kot 90 % Hg vezanega v/na koloide. Iz teh razlik lahko sklenemo, da sta pomembna tudi izvor, sestava in struktura organskih ligandov, saj so ti očitno specifični za vsak sistem. Z izvedbo inkubacijskega poskusa, v katerem je bila COM vodotopnega dela makroagregatov štiri tedne izpostavljena mikrobnji razgradnji smo ugotovili, da prihaja do preferenčne razgradnje velikih molekul COM (> 30 kDa), pri čemer se količina vezanega Hg ohranja. Hg, vezano na manjše molekule COM, sestavljene iz poli- in oligosaharidov, pa se sprošča v vodno raztopino in ga v frakciji COM ne zaznamo.

Guentzel in sod. (1996) so s pomočjo modela izračunali, da bi bilo, ob predpostavki, da v okolju z visoko slanostjo na COM prevladujejo karboksilne in fenolne funkcionalne skupine, za 85-90% organsko kompleksacijo Hg potrebne kar 18-30 mM COC, kar je za velikostni razred več, kot so normalne koncentracije DOC v okolju. Pri uporabi modela so očitno zanemarili pomen funkcionalnih skupin, ki vsebujejo N, saj se je za slednje izkazalo, da igrajo pomembno vlogo (Bronk, 2002).

Sezonska dinamika DOC v Tržaškem zalivu je relativno stalna z nekaterimi izjemami, ki so po navadi posledica suše in s tem manjših pretokov rek. V pomladanskih in poletnih mesecih se DOC v vodnem stolpcu nakopiči na račun povečane aktivnosti fitoplanktona in zmanjšane aktivnosti heterotrofov, v zimskih mesecih, ko pride do mešanja stratificiranih vodnih mas, pa koncentracije DOC močno padejo. Na znižanje koncentracij DOC dejansko vplivajo trije mehanizmi: odmik vodnih mas v južnejše dele Jadranskega morja, razgradnja OM v vodnem stolpcu ali pa agregacija in potopitev DOC/POC na morsko dno, kjer poteka aktivni mikrobeni metabolizem (De Vittor in sod., 2008). Razlike med dinamiko DOC v posameznih letih so pokazale, da igra tudi pretok rek in s tem vnos alohtone OM v tem okolju pomembno vlogo. Ob sušnih obdobjih se namreč celokupne koncentracije DOC močno znižajo (De Vittor in sod., 2008).

OM, ki jo najdemo v vodnem stolpcu, vanj vstopa z rekami ali pa se tvori ob delovanju planktonskih primarnih producentov. Ta naprej vstopa v prehranjevalne splete in tako podpira heterotrofni metabolizem. Novonastala OM se v vodnem stolpcu nikoli ne mineralizira v celoti, temveč je nekaj vedno ostane v vodnem stolpcu ali pa sedimentira na morsko dno (Jiao in sod., 2010). Velike količine relativno lahko razgradljive OM ob zadostni dostopnosti še ostalih potrebnih nutrientov napajajo mikrobeni metabolizem v sedimentih, kar lahko vodi do hitre porabe O<sub>2</sub> in razvoja hipoksije ter anoksije po celotni globini sedimenta in celo vodnem stolpcu nad sedimentom. V plitvih morskih bazenih, kot je Tržaški zaliv, predstavlja pomemben vir lahko razgradljive OM v sedimentih tudi aktivna združba bentoških primarnih producentov. Anoksija je v sedimentu sicer normalen pojav, saj ti pogoji vladajo že na globini kakega centimetra, vendar lahko ob pojavi anoksičnih razmer v višjih delih sedimenta in v vodnem stolpcu prihaja do sprememb v smeri in obsegu difuzijskih in bentoških tokov različnih kemijskih spojin. Spremenjene

redoks razmere v sedimentih povzročijo premik oksičnega metabolizma proti anoksičnem, pri čemer v okolju kot je Tržaški zaliv prevladujejo predvsem redukcija Fe in Mn ter sulfatna redukcija. Ob odsotnosti O<sub>2</sub> se reducirane oblike spojin, ki v omenjenih procesih nastajajo (Fe(II), Mn(II) in S<sup>2-</sup>), ob prehajanju proti površini sedimenta ne oksidirajo (Hines in sod., 1997), kar zaznamo kot povečan tok teh spojin v vodni stolpec (Covelli in sod., 1999, 2008; Emili in sod., 2011, 2012; Koron in Faganeli, 2012).

V našem delu (Koron in Faganeli, 2012) nas je zanimalo, ali sta tokova Hg in fluorescirajoče raztopljljene organske snovi (FDOM – fluorescent dissolved organic matter) povezana, kar bi lahko nakazovalo interakcije med njima, vendar korelacije med tokovoma nismo zaznali. Iz tega smo zaključili, da se v sedimentih v tem okolju Hg ne povezuje z FDOM, ki jo večidel sestavljajo HS. Podobno so opazili tudi Skoog in sod. (1996), ki so korelacijo FDOM in reduciranih Fe in Mn spojin povezali z raztpljanjem Fe in Mn mineralov, na katere je vezana OM. Omenjeni oksidi in hidroksidi so v sedimentih poznani kot pomembni vezalci Hg v oksičnih razmerah. Ob spremembah redoks razmer, do katerih pride, ko sistem postaja anoksičen, sta tokova THg in MeHg lahko prav tako povezana z raztpljanjem mineralnih frakcij Fe in Mn (Muresan in sod., 2007). Kljub temu da sta tokova posameznih opazovanih spojin med seboj primerljiva, je nemogoče zaključiti ali se OM in Hg na okside in hidrokside vežeta ločeno ali skupaj.

Ob pregledu rezultatov inkubacijskega laboratorijskega poskusa smo ugotovili, da se je tekom razvoja anoksije delež MeHg v THg povečeval, kar bi lahko nakazovalo aktivno potekajočo metilacijo Hg. Ob kasnejši izpostavitvi eksperimentalnega sistema oksičnim pogojem se je opazovani delež MeHg hitro zmanjševal, kar pa bi lahko kazalo na zelo aktivno demetilacijo Hg, ki sicer lahko poteka v anoksičnih, še intenzivneje pa v oksičnih pogojih (Barkay in sod., 2010; Lambertsson in Nilsson, 2006).

Pri raziskovanju vpliva OM na usodo Hg v Tržaškem zalivu smo le malo pozornosti namenili suspendirani OM v pornih vodah sedimentov. Ogrinc in sod. (2000) so pokazali, da je alohton POC v delti reke Soče predstavlja približnih 63 % vsega POC, medtem ko v centralnem delu Tržaškega zaliva ta odstotek znaša samo še 8 %. V omenjenem delu so avtorji pokazali na dobro korelacijo med odstotkom alohtonega POC in koncentracijo THg,

korelacije med POC in MeHg pa niso zaznali, kar še dodatno potrjuje tezo, da so vir MeHg v Tržaškem zalivu morski sedimenti (Covelli in sod., 1999).

Podobne spremembe je mogoče opazovati tudi v lagunskem okolju, kjer sicer vladajo drugačne okoljske razmere. Drugačen nabor okoljskih dejavnikov nudi možnosti raziskovanja vplivov posameznih dejavnikov na pretvorbe Hg. Območja lagun so podvržena večjim nihanjem v slanosti, kar je posledica tako bibavice kot spremenljivih pretokov rek, so precej plitvejša, prav tako pa so večja tudi temperaturna nihanja. Za raziskovanje biogeokemije Hg je posebno zanimivo področje lagun Marano in Grado, saj gre za okolje, v katerem je mogoče najti Hg iz dveh različnih virov: idrijskega rudnika in sedaj že zaprte kloralkalne industrije. Ta je locirana v zgornjem delu reke Aussa, ki se kot rečni sistem Aussa-Corno izliva v maranski del lagune. Hg iz rudnika Idrija v laguno vstopa z morsko vodo preko plimnih kanalov med otočki, ki področje lagune ločujejo od morja. Glede na geografske in hidrografske razmere, ki vladajo v laguni, je vplivu Hg iz idrijskega rudnika bolj podvržen vzhodni oz. gradeški del lagune (Covelli in sod., 2008), medtem ko Hg iz kloralkalne tovarne vpliva pretežno na zahodni del lagune (Acquavita in sod., 2012). Čeprav so Emili in sod. (2012) ugotovili, da so celokupne koncentracije Hg v sedimentih višje v zahodnem, maranskem sektorju, pa je tam kopičenje MeHg v vodnem stolpcu manj obsežno kot v vzhodnem, gradeškem sektorju, kar lahko kaže na manj primerne pogoje za metilacijo, potencialno nedostopnost HgS kot substrata za metilacijo ali pa povečano aktivnost razgradnje MeHg (Hines in sod., 2012). HgS je v gradeškem sektorju prevladujoča oblika Hg (Acquavita in sod., 2012), ki je v vodi slabo topna. Njena topnost in s tem dostopnost za mikrobne pretvorbe pa se lahko poveča v prisotnosti OM (Ravichandran, 2004; Slowey, 2010). V obeh delih lagune so bentoski tokovi MeHg v vodni stolpec povečani poleti. Izkazalo se je tudi, da v lagunah poteka intenzivna tvorba raztopljenih oblik Hg (DGM – dissolved gaseous mercury). Z uporabo temne bentoske posode, s katero smo simulirali nočne pogoje oz. izločili vpliv fotokemijskih pretvorb Hg, smo pokazali pomemben vpliv biološke redukcije Hg, kar so potrdili tudi drugi avtorji (Baldi in sod., 2012a, 2012b; Hines in sod., 2012).

Ob podrobnem preučevanju vpliva sedimentne OM, prisotne v obliki HS, smo se opirali predvsem na dosedanja dognanja, da lahko HS povečajo topnost HgS (Ravichandran,

2004) in s tem igrajo pomembno vlogo pri biološki dostopnosti Hg. Pokazali smo, da se HS v sedimentih povezujejo predvsem s fino frakcijo sedimenta ( $< 16 \mu\text{m}$ ). Z isto velikostno frakcijo se preferenčno povezuje tudi Hg. Na podlagi naših rezultatov smo zaključili, da gre za frakcijo glin z veliko aktivno površino, na katero se vežejo tako HS kot Hg, nedvoumne povezave med Hg in HS pa nismo uspeli potrditi. Prav tako nismo mogli potrditi povezave med HS in MeHg, saj gre v primeru HS za širok spekter organskih molekul, ki niso najbolj primerne za analize. Izkazalo se je tudi, da smo z analizo HS zajeli maksimalno 30 % vse OM v raziskovanih sedimentih. Kljub temu smo uspeli pokazati, da bi lahko HS, prisotne na SWI, pomembno vplivale na nastanek MeHg v površinskih sedimentih in njegovo akumulacijo, kar se sklada z opazovanji drugih raziskovalcev (Mason in sod., 1994; Ullrich in sod., 2001). V primerjavi z rečno OM so HS, določene v sedimentih lagun, pokazale dobro korelacijo z MeHg, kar smo pripisali predvsem strukturi HS, saj je slednja manj refraktorna in vsebuje manj aromatskih spojin. Ali gre za favoriziranje vezave ali za spodbujanje tvorbe MeHg, pa je ostalo neodgovorjeno. Za podrobnejše rezultate in zanesljivejše zaključke o OM se je v prihodnosti potrebno poslužiti še drugih izolacijskih in analiznih metod, s katerimi bi določili predvsem kvaliteto OM in ne le njene celokupne količine oz. količine posamezne frakcije (Acquavita in sod., 2012).

Izbira primernih metod za raziskovanje procesov v okolju še zdaleč ni trivialna. Za potrebe raziskovanja bioloških in/ali kemijskih pretvorb Hg v vodnem stolpcu smo v našem laboratoriju razvili oz. nadgradili metodo (Ribeiro Guevara in sod., 2007; Žižek in sod., 2008), ki vključuje uporabo radioaktivnega sledilca  $^{197}\text{Hg}$  (Koron in sod., 2012). Prednosti uporabe radioaktivnih izotopov in tudi stabilnih izotopov so predvsem v njihovi specifičnosti oz. specifičnosti postopkov, s katerimi jih zasledujemo, pa tudi njihova široka aplikabilnost. Prednost naše metode je vse našteto, predvsem pa nam omogoča uporabo zelo nizkih koncentracij sledilca, saj s tem ne vplivamo na ravnotežja, ki v okolju vladajo med posameznimi spojinami. Metodo smo razvili in tudi validirali za potrebe sledenja sezonskim spremembam v tvorbi MeHg in  $\text{Hg}^0$  v vodnem stolpcu Tržaškega zaliva (Bratkič in sod., v pripravi). Predstavljena metoda bi bila v prihodnosti lahko uporabna tudi pri študiju vezave Hg ali MeHg na OM pri različnih okoljskih pogojih ter npr. pri študiju,

ali in kako različna OM vpliva na pretvorbe in privzem Hg v organizme, podobno kot so pokazali tudi Guo in sod. (2002).

### 3.2 SKLEPI

- DOM in makroagregati v vodnem stolpcu Tržaškega zaliva so se izkazali za zelo pomembne vezalce in prenašalce Hg, pa tudi drugih kovin. Koloidna ali HMW-DOM frakcija predstavlja kar 40 % vse DOM, ki smo jo iz morske vode ali porne vode makroagregatov izolirali z uporabo ultrafiltracije. Ugotovili smo, da netopni del makroagregatov, t.i. matriks, vsebuje velike količine kovin, kar smo pripisali vključitvi mineralnih delcev v strukturo. Koloidi makroagregatov vsebujejo molekule različnih molekulskih mas, za biološko najbolj dostopne pa so se izkazale prav velike molekule ( $> 30$  kDa). Te molekule so imele tudi največjo kapaciteto za vezavo Hg, kar je verjetno posledica velike vsebnosti funkcionalnih skupin, ki vsebujejo N in O, količina z njimi povezanega Hg pa se je kljub njihovi pretvorbi, kar smo dokazali z izvedbo inkubacijskega poskusa, v katerem smo molekule izpostavili mikrobnii razgradnji, ohranjala. Ugotovili smo, da je skoraj vse Hg, definirano kot raztopljeno, dejansko vezano na COM.
- V sedimentih Tržaškega zaliva med Hg in FDOM, ki jo pretežno sestavljajo HS, nismo zaznali pomembne povezave. Domnevamo, da se tako Hg kot FDOM ločeno povezujeta z Fe in Mn mineralnimi frakcijami, ki pa se ob spremenjenih redoks razmerah raztapljajo, ob čemer se vezana FDOM in Hg sproščata v vodni stolpec. Ugotovili smo, da se delež MeHg v THg v anoksičnih pogojih močno poveča in lahko predstavlja kar 50-100 %, ne glede na to ali gre za s Hg razmeroma neonesnaženo območje ali pa za območje, kjer so celokupne koncentracije Hg v sedimentih zelo visoke. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da so obalna morja, v katerih prihaja do stratifikacije vodnega stolpca in občasne pridnene anoksijske, mesta, ki predstavljajo pomembna območja tveganja za nastanek in sproščanje strupenega MeHg v okolje, pri čemer pa celokupne koncentracije Hg niso merilo za obseg nastanka MeHg.

- Ob študiju pretvorb Hg v sedimentih lagun Grado in Marano smo ugotovili, da je kljub temu, da v lagunah obstajata dva vira Hg in da je celokupnega Hg v vzhodnem, gradeškem sektorju več, očitno tisti v maranskem sektorju bolj biodostopen, zato tam prihaja do intenzivnejšega nastajanja MeHg in njegovega kopičenja v vodnem stolpcu; je pa na tem mestu očitno pomemben tudi proces demetilacije. Na povečano tvorbo MeHg v splošnem vpliva tudi povisana temperatura, saj so koncentracije MeHg poleti veliko višje kot v drugih sezонаh. Pomemben dejavnik, ki vpliva na opažene razlike, pa je tudi izvor Hg v enem in drugem sektorju. Vzhodni, gradeški sektor, je podvržen vplivu Hg iz idrijskega rudnika, ki se preko reke Soče ob delovanju specifičnih tokov preko plimnih kanalov vnaša v laguno, medtem ko je zahodni, maranski sektor, izpostavljen vplivom lažje dostopnega Hg, ki se je v okolje sprostilo v času obratovanja kloralkalne tovarne, locirane v vrhnjem delu toka reke Aussa. Izkazalo se je, da je najpomembnejši proces, ki poteka v laguni, redukcija Hg oz. nastanek DGM. S posluževanjem različnih pristopov k problemu smo ugotovili, da je tam prisotna aktivna proti Hg odporna mikrobna združba, ki aktivno reducira Hg. Še enkrat smo pokazali, da celokupna količina Hg v sedimentu ni primeren kazalec za napoved potencialne tvorbe MeHg, temveč so pomembni še številni drugi okoljski dejavniki, predvsem pa oblika, v kateri nastopa Hg kot substrat.
- Ob preučevanju povezav med HS in Hg v sedimentih lagun smo ugotovili, da med njimi ne prihaja do očitnih interakcij. Vseeno pa smo zaznali, da bi lahko HS pretežno avtohtonega izvora pomembno vplivale na mesto nastanka in akumulacije MeHg. Ugotovili smo, da bi bilo, kljub temu da HS predstavljajo okoli 40 % vse OM v sedimentu, v prihodnje potreбno analizirati še druge frakcije OM, saj bomo le tako dobili bolj jasno sliko o obsegu njenega vpliva na biogeokemijo Hg.
- Tekom priprave doktorskega dela in tudi v literaturi se vedno znova izpostavlja pomembnost razvoja novih metod in njihove validacije. Metoda, ki smo jo razvili oz. izpopolnili, bi se lahko v prihodnosti izkazala kot zelo primeren pripomoček pri študiju vezave anorganskega Hg ali MeHg na organske molekule, saj nam omogoča uporabo koncentracij, ki so primerljive z okoljskimi, detekcija Hg pa je zelo natančna in specifična.

- Ozko grlo raziskav OM v morskem okolju ostaja predvsem njena izolacija in pravilna karakterizacija, kar ni nujno vedno posledica pomanjkanja primernih analiznih metod, temveč tudi kompleksnosti in neskončne raznolikosti molekul, ki so predmet našega raziskovanja.

## 4 POVZETEK (SUMMARY)

### 4.1 POVZETEK

OM v morskem okolju predstavlja pomemben in aktiven rezervoar C in s tem nezanemarljiv del v globalnem biogeokemijskem kroženju C. Z njim so neločljivo povezana kroženja še mnogih drugih elementov, med drugim tudi strupenih kovin kot je Hg. OM, ki jo najdemo v obalnih morjih in lagunah lahko izvira s kopnega, torej gre za alohtono snov, ali pa nastaja v vodnem stolpcu, kar jo dela avtohtono. Alohtono OM v obalnih delih in lagunah severnega Jadrana s kopnega v morsko okolje vnašajo reke. Avtohtona nastaja v vodnem stolpcu, kjer jo proizvaja fitoplankton, plitkost morskega bazena, kakršen je Tržaški zaliv, pa omogoča občasno osvetljenost sedimenta in zagotavlja obstoj pomembne bentoške združbe avtotrofnih organizmov.

V morskem okolju igra OM več vlog; z vidika tega doktorskega dela pa nas je zanimala predvsem kot vezalec kovin, saj lahko ta vpliva na imobilizacijo kovin v morskem okolju in s tem na delovanje okolja.

Glede na mesto nastanka in zadrževanja OM se pomembno spreminja njen sestava in struktura. Tako se OM v vodnem stolpcu občutno razlikuje od OM v sedimentih. Sestava in struktura OM pomembno vplivata na biološko dostopnost C in z njim povezanih elementov. Iz raziskav, opravljenih v okviru pričujočega doktorskega dela, smo ugotovili, da DOM, še posebno njen koloidna frakcija, definirana v velikostnem območju 1 kDa – 0,2 µm, v vodnem stolpcu veže skoraj vso Hg, ki ga izmerimo kot raztopljenega. Primerjava preostalih odstotkov koloidno vezanih kovin z odstotkom koloidno vezanega Hg kaže na specifičnost posameznih interakcij. Ob primerjavi naših rezultatov z rezultati podobnih raziskav (Guo in Santschi, 1997; Guo in sod., 2000) je mogoče zaključiti, da so morebitne razlike lahko posledica uporabe različnih analiznih pristopov ali pa specifičnosti posameznih okolij, v katerih so raziskave potekale.

Ob izjemnih (epizodnih) dogodkih, je v Tržaškem zalivu ter celotnem Severnem Jadranu tvorba morskih makroagregatov, agregatov DOM, je poznavanje dinamike njihovega

nastanka in razgradnje pomembno tudi za opis in napoved dinamike kroženja vseh elementov, povezanih z njimi. Ob analizi njihove netopne frakcije ali matriksa smo izmerili visoke koncentracije nekaterih kovin, kar smo povezali z vgradnjo mineralnih delcev (Koron in sod., v recenziji; Koron in sod., 2011; Kovač in sod., 2004, 2008). Ob analizi topnega dela makroagregatov pa smo ugotovili, da ima COM enake lastnosti in sposobnosti vezave kot naravna DOM oz. COM, primerljiva pa je tudi količina vezanih kovin. Na podlagi lastnih izkušenj in izkušenj drugih raziskovalcev smo ugotovili, da je uporaba ultrafiltracije kot postopka izolacije COM iz vodnih vzorcev sicer zamudna, ampak daje zadovoljive in zanesljive rezultate (Schijf in Zoll, 2011). Če bomo v prihodnje metodo ultrafiltracije združili še z uporabo radioaktivnih ali stabilnih izotopov, bo to pomembno pripomoglo k še natančnejšemu poznavanju mehanizmov, ki vodijo do povezav med organsko snovjo in kovinami v okolju.

V tem doktorskem delu smo pokazali tudi, da med OM morskih in lagunskih sedimentov ter Hg povezave ni oz. je ni bilo mogoče zaznati. Zaključili smo, da gre predvsem za posledico sestave in strukture organske snovi, ki je v sedimentu izrazito rekalcitrantna, saj gre večinoma za avtohtone HS, te pa ne omogočajo vezave kovin, vsaj ne v tolikšnem obsegu kot DOM.

Ob spremembah redoks razmer v sedimentih, ki so posledica anoksičnih pogojev, prihaja do raztpljanja Fe in Mn oksidov in hidroksidov. Ob tem se v vodni stolpec sproščata tako DOM kot Hg. Zasledovanje tokov posameznih spojin nam je sicer omogočilo določitev obsega tega sproščanja, ne gre pa za metodo, primerno za študije povezav med Hg in OM v pornih vodah sedimentov.

Bentoški inkubacijski poskusi, ki smo jih izvedli v okoljih, v katerih vladajo različne fizikalne in kemijske razmere, so nam omogočili vpogled tudi v posredni vpliv, ki ga ima lahko OM na biogeokemijsko kroženje Hg. Pomembna je namreč predvsem z vidika napajanja mikrobnega metabolizma, s tem tudi tistih mikrobov, ki vodijo metilacijo Hg ali demetilacijo MeHg. Z izvedbo eksperimentov v okoljih, v katerih ima OM različen izvor, različen izvor ima pa tudi Hg, smo tako potrdili hipotezo o pomembnosti biološke dostopnosti tako OM kot Hg pri tvorbi MeHg.

## 4.2 SUMMARY

OM in marine environment represents an important and very active C reservoir, and thus acts as an important player in a global C cycle. Global C cycle is inseparably involved with biogeochemical cycles of other elements as well, including toxic ones such as Hg. OM found in coastal marine and lagoon environments has two origins. Allochthonous OM originates from terrestrial ecosystems and is to marine environment transported mostly via rivers, whereas autochthonous originates in water column where it is synthesized by phytoplankton, or in surface sediments where shallow waters enable light protrusion and therefore support active benthic autotrophic community.

Marine OM has many roles in marine environment however the primary scope of this work was its function as a metal (Hg) chelator or complexation agent. Detailed knowledge on its behavior enables us to presume or predict its influence on normal ecosystem functioning. The place of origin and subsequent retention of OM determines its composition and structure, which explains a significant difference between water column and sediment OM. Composition and structure influence also the bioavailability of OM and associated elements.

Results presented in this work suggest that DOM, especially its colloidal fraction, defined as organic matter with sizes ranging between 1 kDa – 0,2 µm, play an important role in water column. Namely, all of the Hg, determined as dissolved Hg, turned out to be associated with COM, which suggests an existence of specific interactions. Comparison with other similar works (Guo and Santschi, 1997; Guo et al., 2000) was possible and led to conclusion that some discrepancies observed could be linked to usage of different methodological approach or even specificity of research area.

Description and projection of the outcome of specific events, such as appearance of macroaggregates in the Gulf of Trieste, require deepened and extensive knowledge on dynamics of macroaggregate formation and degradation. Analyses performed on macroaggregate matrix (insoluble portion) showed high metal concentrations, which suggested an incorporation of mineral particles (Koron et al., in rev.; Koron et al., 2011;

Kovač et al., 2004, 2008), whereas results on interstitial soluble portion of macroaggregates revealed that macroaggregate COM and naturally occurring DOM have similar to identical properties in terms of structure and metal binding capacity. Experiences gained during present work and experiences of other researchers reassure us that ultrafiltration is a method of choice in this kind of work (Schijf and Zoll, 2011). Combined usage of ultrafiltration and stable or radioactive isotopes could in our opinion serve as an important upgrade of the method and could provide a detailed insight into mechanisms behind interactions between organic matter and metals in the environment.

Results of our work also showed that there is limited or no interaction between OM in the marine and lagoon sediments. Our conclusion was that the lack of detectable interaction is a consequence of OM structure. OM present in sediments is present mostly in the form of HS i.e. very recalcitrant form which obviously does not support metal binding to the same extent as DOM. Changes in redox conditions in sediments, being a consequence of anoxia, lead to dissolution of Fe and Mn oxides and hydroxides. This dissolution is accompanied with release of DOM and Hg to the water column. Benthic flux measurements give an insight into the extent of phenomena connected to redox changes, however fail to give a concise answer whether the DOM and Hg are released in form complexes or separately.

Benthic incubation experiments proved to be an invaluable tool for comparison of the role OM plays in biogeochemical cycle of Hg in different environments. OM acts primarily as a microbial metabolism fuel, supporting also the microbes that act as methylators of Hg or demethylators of MeHg. Performing incubation experiments in environments, which have different sources of OM and Hg enabled us to again corroborate the hypothesis on importance of bioavailability of both OM and Hg in processes of MeHg formation.

## 5 VIRI

- Acquavita A., Covelli S., Emili A., Berto D., Faganeli J., Giani M., Horvat M., Koron N., Rampazzo F. 2012. Mercury in sediments of the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea): Sources, distribution and speciation. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 113: 20-31
- Ahel M., Tepić N., Terzić S. 2005. Spatial and temporal variability of carbohydrates in the northern Adriatic - a possible link to mucilage events. *Science of the Total Environment*, 353: 139-150
- Aiken, G.R., 2006. Challenges in the study of mercury-dissolved organic matter interactions. V: 8th International conference on mercury as a global pollutant, Madison, 6-11 avg. 2006
- Amon R.M.W., Benner R. 1996. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 41, 1: 41-51
- An Introduction to Global Carbon Cycle. University of New Hampshire.  
<http://globecarboncycle.unh.edu/CarbonCycleBackground.pdf> (4.4.2013)
- Azam F., Malfatti F. 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 782-791
- Babiarz C.L., Hurley J.P., Krabbenhoft D.P., Gilmour C. and Branfireun B.A. 2003. Application of ultrafiltration and stable isotopic amendments to field studies of mercury partitioning to filterable carbon in lake water and overland runoff. *Science of the Total Environment*, 304, 1-3: 295-303
- Baldi F., Gallo M., Marchetto D., Fani R., Maida I., Horvat M., Fajon V., Žižek S., Hines M. 2012a. Seasonal mercury transformation and surficial sediment detoxification by bacteria of Marano and Grado lagoon. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 113: 105-115
- Baldi F., Marchetto D., Gallo M., Fani R., Maida I., Covelli S., Fajon V., Žižek S., Hines M., Horvat M. 2012b. Chlor-alkali plant contamination of Aussa River sediments induced a large Hg-resistant bacterial community. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 113: 96-104

- Baldock J.A., Masiello C.A., Gelinas Y., Hedges J.I. 2004. Cycling and composition of organic matter in terrestrial and marine ecosystems. *Marine Chemistry*, 92, 1-4: 39-64
- Barkay T., Kritee K., Boyd E., Geesey G. 2010. A thermophilic bacterial origin and subsequent constraints by redox, light and salinity on the evolution of the microbial mercuric reductase. *Environmental Microbiology*, 12, 11: 2904-2917
- Barkay T., Miller S.M., Summers A.O. 2003. Mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 355-384
- Barkay T. and Wagner-Dobler I. 2005. Microbial transformations of mercury: potential, challenges, and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Advances in applied microbiology*, 57: 1-50
- Belzile N., Lang C.Y., Chen Y.W. and Wang M. 2008. The competitive role of organic carbon and dissolved sulfide in controlling the distribution of mercury in freshwater lake sediments. *Science of the Total Environment*, 405, 1-3: 226-238
- Benner R. 1991. Ultrafiltration for the concentration of bacteria, viruses, and dissolved organic matter. V: *The Analysis and Characterization of Marine Particles*. Hurd D.C., Spencer D.W. (ur.). Washington DC, American Geophysical Union: 181-186
- Benner R. 2002. Chemical composition and reactivity. V: *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Hansell D.A., Carlson C.A. (ur.). San Diego, Elsevier Science: 59-90
- Benner R., Biddanda B., Black B. and McCarthy M. 1997. Abundance, size distribution, and stable carbon and nitrogen isotopic compositions of marine organic matter isolated by tangential-flow ultrafiltration. *Marine Chemistry*, 57, 3-4: 243-263
- Benner R., Paulski J.D., McCarthy M., Hedges J.I., Hatcher P.G. 1992. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science*, 255: 1561-1564
- Benoit J.M., Gilmour C.C., Heyes A., Mason R.P., Miller, C.L. 2003. Geochemical and biological controls over methylmercury production and degradation in aquatic ecosystems. V: *Biogeochemistry of Environmentally Important Trace Elements*. Cai Y., Braids O.C. (ur.). American Chemical Society: 262-297

- Brambati A. 2001. Coastal sediments and biota as indicators of Hg contamination in the Marano and Grado Lagoon. *RMZ Materials and Geoenvironment*, 48: 165-171
- Bratkič A., Koron N., Tinta T., De Vittor C., Ribeiro Guevara S., Faganeli J., Horvat M. V pripravi. Seasonal dynamics of microbial mercury transformations in water column and sediments of Gulf of Trieste
- Bronk D.A. 2002. Dynamics of DON. V: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (ur.). San Diego, Elsevier Science: 153-247
- Burdige D.J. 2002. Sediment pore waters. V: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (ur.). San Diego, Elsevier Science: 611-663
- Carlson C.A. 2002. Production and removal processes. V: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (ur.). San Diego, Elsevier Science: 91-151
- Cauwet G. 2002. DOM in the coastal zone. V: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (ur.). San Diego, Elsevier Science: 579-609
- Celo V., Lean D.R.S., Scott S.L. 2006. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 368: 126-137
- Chin W.-C., Orellana M.V., Verdugo, P. 1998. Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature*, 391, 5: 568-572
- Compeau G.C., Bartha R. 1985. Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 498-502
- Cordy P., Veiga M.M., Salih I., Al-Saadi S., Console S., Garcia O., Mesa L.A., Velásquez-López P.C., Roeser M. 2011. Mercury contamination from artisanal gold mining in Antioquia, Colombia: The world's highest per capita mercury pollution. *Science of the Total Environment*, 410-411: 154-160

- Covelli S., Faganeli J., De Vittor C., Predonzani S., Acquavita A., Horvat M. 2008. Benthic fluxes of mercury species in a lagoon environment (Grado Lagoon, Northern Adriatic Sea, Italy). *Applied Geochemistry*, 23, 3: 529-546
- Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Brambati A. 1999. Porewater distribution and benthic flux measurements of mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 48, 4: 415-428
- Covelli S., Faganeli J., Horvat M. and Brambati A. 2001. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic sea). *Applied Geochemistry*, 16, 5: 541-558
- Covelli S., Langone L., Acquavita A., Piani R., Emili A. 2012. Historical flux of mercury associated with mining and industrial sources in the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 113: 7-19
- De Vittor C., Paoli A., Fonda Umani, S. 2008. Dissolved organic carbon variability in a shallow coastal marine system (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 78: 280-290
- Del Negro P., Crevatin E., Larato C., Ferrari C., Totti C., Pompei M., Giani M., Berto D., Fonda Umani S. 2005. Mucilage microcosms. *Science of the Total Environment*, 353, 1/3: 258-269
- Doucet F.J., Lead J.R., Santschi P.H. 2007. Colloid-trace element interactions in aquatic systems. V: Environmental colloids and particles: Behaviour, separation and characterisation. IUPAC series on analytical and physical chemistry of environmental system. Wilkinson K.J., Lead J.R. (ur.). West Sussex, John Wiley & Sons: 95-158
- Emerson S.R., Hedges J.I. 2008. Life processes in the ocean. V: Chemical Oceanography and the Marine Carbon Cycle. Emerson S.R., Hedges J.I. (ur.). Cambridge: Cambridge University Press: 173-218
- Emili A., Acquavita A., Koron N., Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Žižek S., Fajon V. 2012. Benthic flux measurements of Hg species in a northern Adriatic lagoon

- environment (Marano and Grado Lagoon, Italy). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 113: 71-84
- Emili A., Koron N., Covelli S., Faganeli J., Acquavita A., Predonzani S., De Vittor C. 2011. Does anoxia affect mercury cycling at the sediment-water interface in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea)? Incubation experiments using benthic flux chambers. *Applied Geochemistry*, 26, 2: 194-204
- Ertel J.R., Hedges J.I., Devol A.H., Richey J.E., 1986. Dissolved humic substances of the Amazon River system. *Limnology and Oceanography*, 31, 4: 739-754
- Faganeli J., Ogrinc N., Kovač N., Kukovec K., Falnoga I., Mozetič P., Bajt O. 2009. Carbon and nitrogen isotope composition of particulate organic matter in relation to mucilage formation in the northern Adriatic Sea. *Marine Chemistry*, 114: 102-109
- Falter R. 1999. Experimental study on the unintentional abiotic methylation of inorganic mercury during analysis. Part 1: Localisation of the compounds effecting the abiotic mercury methylation. *Chemosphere*, 39, 7: 1051-1073
- Falter R. 1999. Experimental study on the unintentional abiotic methylation of inorganic mercury during analysis: Part 2: Controlled laboratory experiments to elucidate the mechanism and critical discussion of the species specific isotope addition correction method. *Chemosphere*, 39, 7: 1075-1091
- Fitzgerald W.F., Lamborg C.H. 2007. Geochemistry of mercury in the environment. V: Environmental Geochemistry: Treatise On Geochemistry. Sherwood-Lollar B. (ur.). Elsevier: 107-148
- Fitzgerald W.F., Lamborg C.H., Hammerschmidt C.R. 2007. Marine biogeochemical cycling of mercury. *Chemical Reviews*, 107, 2: 641-662
- Fitzgerald W.F., Mason R.P., Vandal, G.M. 1991. Atmospheric cycling and air-water exchange of mercury over mid-continental lacustrine regions. *Water Air and Soil Pollution*, 56: 745-767

- Fleming E.J., Mack E.E., Green P.G., Nelson D.C. 2006. Mercury methylation from unexpected sources: Molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1: 457-464
- Fonda Umani S., Del Negro P., Larato C., De Vittor C., Cabrini M., Celio M., Falconi C., Tamberlich F., Azam F. 2007. Major inter-annual variations in microbial dynamics in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea) and their ecosystem implications. *Aquatic Microbial Ecology*, 46: 163-175
- Gardfeldt K., Munthe J., Stromberg D., Lindqvist O. 2003. A kinetic study on the abiotic methylation of divalent mercury in the aqueous phase. *Science of the Total Environment*, 304, 1-3: 127-136
- Gasper J. D., Aiken G. R., Ryan J. N. 2007. A critical review of three methods used for the measurement of mercury ( $Hg^{2+}$ )-dissolved organic matter stability constants. *Applied Geochemistry*, 22, 8: 1583-1597
- Gosar M., Pirc S., Bidovec M. 1997. Mercury in the Idrijca river sediments as a reflection of mining and smelting activities of the Idrija mercury mine. *Journal of Geochemical Exploration*, 58, 2-3: 125-131
- Goto N., Kawamura T., Mitamura O., Terai, H. 1999. Importance of extracellular organic carbon production in the total primary production by tidal-flat diatoms in comparison to phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 19: 289-295
- Guentzel J.L., Powell R.T., Landing W.M., Mason, R.P. 1996. Mercury associated with colloidal material in an estuarine and an open-ocean environment. *Marine Chemistry*, 55, 1-2: 177-188
- Guo L., Santschi P.H. 1997. Composition and cycling of colloids in marine environments. *Reviews of Geophysics*, 35: 17-40
- Guo L.D., Santschi P.H., Ray, S.M. 2002. Metal partitioning between colloidal and dissolved phases and its relation with bioavailability to American oysters. *Marine Environmental Research*, 54, 1: 49-64
- Guo L.D., Santschi P.H., Warnken K.W., 2000. Trace metal composition of colloidal organic material in marine environments. *Marine Chemistry*, 70, 4: 257-275

- Gustafsson O., Gschwend P.M. 1997. Aquatic colloids: Concepts, definitions, and current challenges. *Limnology and Oceanography*, 42, 3: 519-528
- Gustin M.S., Lindberg S.E., Weisberg P.J. 2008. An update on the natural sources and sinks of atmospheric mercury. *Applied Geochemistry*, 23, 3: 482-493
- Hall B. 1995. The gas phase oxidation of elemental mercury by ozone. *Water Air and Soil Pollution*, 80, 1-4: 301-315
- Han S., Gill G.A. 2005. Determination of mercury complexation in coastal and estuarine waters using competitive ligand exchange method. *Environmental Science and Technology*, 39: 6607-6615
- Han S., Gill G.A., Lehman R.D., Choe K. 2006. Complexation of mercury by dissolved organic matter in surface waters of Galveston Bay, Texas. *Marine Chemistry*, 98: 156-166
- Han S., Obraztsova A., Pretto P., Choe K., Gieskes J., Deheyn D.D., Tebo B.M. 2007. Biogeochemical factors affecting mercury methylation in sediments of the Venice Lagoon, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 4: 655-663
- Hansell D.A., Carlson C.A. 1998. Net community production of dissolved organic carbon. *Global Biogeochemical Cycles*, 12, 3: 443-453
- Hedges J.I., 2002. Why Dissolved Organic Matter? V: Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (ur.). San Diego, Elsevier Science: 1-33
- Hedges J.I., Baldock J.A., Gelinas Y., Lee C., Peterson M., Wakeham S.G. 2001. Evidence for non-selective preservation of organic matter in sinking marine particles. *Nature*, 409: 801-804
- Hines M.E., Horvat M., Faganeli J., Bonzongo J.-C. J., Barkay T., Major E. B., Scott K. J., Bailey E. A., Warwick J. J., Lyons W. B. 2000. Mercury biogeochemistry in the Idrija River, Slovenia, from above the Mine into the Gulf of Trieste. *Environmental Research Section A*, 83, 129-139

- Hines M.E., Faganeli J., Adatto I., Horvat M. 2006. Microbial mercury transformations in marine, estuarine and freshwater sediment downstream of the Idrija Mercury Mine, Slovenia. *Applied Geochemistry*, 21: 1924-1939
- Hines M.E., Faganeli J., Planinc R. 1997. Sedimentary anaerobic microbial biogeochemistry in the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea: Influences of bottom water oxygen depletion. *Biogeochemistry*, 39: 65-86
- Hines M.E., Poitras E.N., Covelli S., Faganeli J., Emili A., Žižek S., Horvat M. 2012. Mercury methylation and demethylation in Hg-contaminated lagoon sediments (Marano and Grado Lagoons, Italy). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 113: 85-95
- Hirose K., Dokiya Y., Sugimura Y. 1982. Determination of conditional stability constants of organic copper and zinc complexes dissolved in seawater using ligand exchange method with EDTA. *Marine Chemistry*, 11: 343–354.
- Hirose K. 2000. Strong organic ligands in seawater: peculiar functional groups in oceanic organic matter. *Synthesis. V: Dynamics and Characterization of Marine Organic Matter*. Handa N., Tanoue E., Hama T. (ur.). Springer: 339-382
- Hirose K. 2007. Metal-organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Applied Geochemistry*, 22, 8: 1636-1645
- Horvat M., Covelli S., Faganeli J., Logar M., Mandić V., Rajar R., Širca A., Žagar D. 1999. Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste. *The Science of the Total Environment*, 237/238: 43-56
- Hughes M.N., Poole R.K. 1991. Metal speciation and microbial growth – the hard (and soft) facts. *Journal of General Microbiology*, 137: 725-734
- Hylander L.D., Meili M. 2003. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Science of the Total Environment*, 304, 1-3: 13-27
- Jiao N., Herndl G.J., Hansell D.A., Benner R., Kattner G., Wilhelm S.W., Kirchman D.L. Weinbauer M.G., Luo T., Chen F., Azam F. 2010. Microbial production of

- recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean.  
*Nature Reviews Microbiology*, 8, 8: 593-599
- Jones M.N., Bryan N.D. 1998. Colloidal properties of humic substances. *Advances in Colloid and Interface Science*, 78, 1: 1-48
- Koron N., Bratkič A., Ribeiro Guevara S., Vahčič M., Horvat M. 2012. Mercury methylation and reduction potentials in marine water: An improved methodology using  $^{197}\text{Hg}$  radiotracer. *Applied Radiation and Isotopes*, 70: 46-50
- Koron N., Faganeli J. 2012. Benthic fluxes of mercury during redox changes in pristine coastal marine sediments from the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *Journal of Soils and Sediments*, 12, 10 : 1604-1614
- Koron N., Faganeli J., Farnoga I., Kovač N. 2011. Interaction of macroaggregates and Hg in coastal waters (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Geomicrobiology Journal*, 27: 615-624
- Kovač N., Bajt O., Faganeli J., Šket B., Orel B. 2002. Study of macroaggregate composition using FTIR and H-NMR spectroscopy. *Marine Chemistry*, 78: 205-215
- Kovač N., Faganeli J., Bajt O. 2008. Mucous macroaggregates in the Northern Adriatic. V: *Geochemistry Research Advances*. Stefansson O. (ur.). New York, Nova Science Publishers: 119-141
- Kovač N., Faganeli J., Bajt O., Sket B., Orel B., Penna N. 2004. Chemical composition of macroaggregates in the northern Adriatic Sea. *Organic Geochemistry*, 35: 1095-1104
- Kovač N., Faganeli J., Sket B., Bajt O. 1998. Characterization of macroaggregates and photodegradation of their water soluble fraction. *Organic Geochemistry*, 29, 5-7: 1623-1634
- Lambertsson L., Nilsson M. 2006. Organic material: The primary control on mercury methylation and ambient methyl mercury concentrations in estuarine sediments. *Environmental Science and Technology*, 40: 1822-1829

- Lamborg C.H., Fitzgerald W.F., Skoog A., Visscher P.T. 2004. The abundance and source of mercury-binding organic ligands in Long Island Sound. *Marine Chemistry*, 90, 1-4: 151-163
- Lamborg C.H., Tseng C.-M., Fitzgerald W.F., Balcom P.H., Hammerschmidt C.R. 2003. Determination of the mercury complexation characteristics of dissolved organic matter in natural waters with 'reducible Hg' titrations. *Environmental Science and Technology*, 37: 3316-3322
- Libes S.M. 2009. The marine carbon cycle and global climate change. V: Introduction to marine biogeochemistry. Libes S.M. (ur.) Burlington, Elsevier:709-758
- Lin C., Pehkonen S.O. 1997. Aqueous free radical chemistry of mercury in the presence of iron oxides and ambient aerosol. *Atmospheric Environment*, 31, 24: 4125-4137
- Lin C.-C., Yee N., Batkay T. 2012. Microbial transformations in the mercury cycle. V: Environmental chemistry and toxicology of mercury. Liu G., Cai Y., O'Driscoll N. (ur.) Hoboken, John Wiley & Sons: 155-192
- Mason R.P., Fitzgerald W.F., Morel F.M.M. 1994. The biogeochemical cycling of elemental mercury - anthropogenic influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58, 15: 3191-3198
- Merritt K.A., Amirbahman A. 2009. Mercury methylation dynamics in estuarine and coastal marine environments - A critical review. *Earth-Science Reviews*, 96: 54-66
- Munthe J. 1992. The aqueous oxidation of elemental mercury by ozone. *Atmospheric Environment*, 26, 8: 1461-1468
- Munthe J., Xiao Z.F., Lindqvist O. 1991. The aqueous reduction of divalent mercury by sulfite. *Water Air and Soil Pollution*, 56, 1 : 621-630
- Muresan B., Cossa D., Jezequel D., Prevot F., Kerbellec S. 2007. The biogeochemistry of mercury at the sediment-water interface in the Thau lagoon. 1. Partition and speciation. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 72: 472-484
- Nebbioso A., Piccolo A. 2013. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 109-124

- Ogorelec B., Mišič M., and Faganeli J. 1991. Marine geology of the Gulf of Trieste (northern Adriatic): Sedimentological aspects. *Marine Geology*, 99: 79-92
- Ogrinc N., Fontolan G., Faganeli J., Covelli S. 2005. Carbon and nitrogen isotope compositions of organic matter in coastal marine sediments (the Gulf of Trieste, N Adriatic Sea): indicators of sources and preservation. *Marine Chemistry*, 95: 163-181
- Ogrinc N., Horvat M., Covelli S., Faganeli J., Fajon V. 2000. The role of sedimentary organic carbon and nitrogen in mercury cycling in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). V: International Conference on Heavy Metals in the Environment, Ann Arbor, 6-10 avg. 2000
- Opsahl S., Benner R., Amon R.M.W. 1999. Major flux of terrigenous dissolved organic matter through the Arctic Ocean. *Limnology and Oceanography*, 44, 8: 2017-2023
- Pettine M., Capri S., Manganelli M., Patrolecco L., Puddu A., Zoppini A. 2001. The dynamics of DOM in the Northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 52: 471-489
- Pettine M., Patrolecco L., Manganelli M., Capri S., Farrace M.G. 1999. Seasonal variations of dissolved organic matter in the northern Adriatic Sea. *Marine Chemistry*, 64: 153-169
- Poerschmann J., Fabbri D., Gorecki T. 2007. Investigation of the solvent extracts of humic organic matter (HOM) isolated from the Ravenna Lagoon to study environmental pollution and microbial communities. *Chemosphere*, 70, 2: 206-214
- Ravichandran M., 2004. Interactions between mercury and dissolved organic matter - a review. *Chemosphere*, 55: 319-331
- Ribeiro Guevara S., Žižek S., Repinc U., Pérez Catán S., Jaćimović R., Horvat M. 2007. Novel methodology for the study of mercury methylation and reduction in sediments and water using  $^{197}\text{Hg}$  radiotracer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 2185-2197

- Schijf J., Zoll A.M. 2011. When dissolved is not truly dissolved - The importance of colloids in studies of metal sorption on organic matter. *Journal on Colloid and Interface Science*, 361: 137-147
- Schlesinger W.H. 1997. The global carbon cycle. V: *Biogeochemistry: an analysis of global change*. San Diego, Academic Press: 358-382
- Siciliano S.D., O'Driscoll N. J., Tordon R., Hill J., Beauchamp S., Lean D.R. 2005. Abiotic production of methylmercury by solar radiation. *Environmental Science and Technology*, 39: 1071-1077
- Skoog A., Hall P.J., Hulth S., Paxeus N., Rutgers van der Loeff M, Westerlund S. 1996. Early diagenetic production and-sediment water exchange of fluorescent dissolved organic matter in the coastal environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60, 19: 3619-3629
- Slowey A.J. 2010. Rate of formation and dissolution of mercury sulfide nanoparticles: The dual role of natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74: 4693-4708
- Stordal M.C., Santschi P.H., Gill G.A. 1996. Colloidal pumping: Evidence for the coagulation process using natural colloids tagged with Hg-203. *Environmental Science and Technology*, 30, 11: 3335-3340
- Tanaka T. 1992. Phase transitions of gels. V: *Polyelectrolyte gels: Properties, Preparation, and Applications*. Harland R.S., Prud'homme R.K. (ur.). American Chemical Society: 1-21
- Teran-Mita T.A., Faz A., Salvador F., Arocena J.M., Acosta J.A. 2013. High altitude artisanal small-scale gold mines are hot spots for mercury in soils and plants. *Environmental Pollution*, 173: 103-109
- Tipping E. 2004. Cation binding by humic substances. 1<sup>st</sup> ed. Cambridge University Press: 434 str.
- Turk V., Hagstrom A., Kovač N., Faganeli J. 2010. Composition and function of mucilage macroaggregates in the northern Adriatic. *Aquatic Microbial Ecology*, 61: 279-289

- Ullrich S.M., Tanton T.W., Abdrashitova S.A. 2001. Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31, 3: 241-293
- UNEP. 2013. Global Mercury Assessment 2013: Sources, emissions, releases and environmental transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland
- Veiga M.M., Hinton J.J. 2002. Abandoned artisanal gold mines in the Brazilian Amazon: A legacy of mercury pollution. *Natural Resources Forum*, 26: 15-26
- Verdugo P., Alldredge A.L., Azam F., Kirchman D.L., Passow U., Santschi P.H. 2004. The oceanic gel phase: a bridge in the DOM-POM continuum. *Marine Chemistry*, 92: 67-85
- Wang W.-X., Guo L. 2001. Production of colloidal organic carbon and trace metals by phytoplankton decomposition. *Limnology and Oceanography*, 46, 2: 278-286
- Wells M.L. 2002. Marine colloids and trace metals. V: *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Hansell D.A., Carlson C.A. San Diego, Elsevier Science: 367-404
- Wells M.L., Smith G.J., Bruland K.W. 2000. The distribution of colloidal and particulate bioactive metals in Narragansett Bay, RI. *Marine Chemistry*, 71: 143-163
- Zepp R.G., Braun A.M., Hoigne J., Leenheer, J.A. Photoreduction of hydrated electrons from natural organic solutes in aquatic environments. *Environmental Science and Technology*, 21, 5: 485-490
- Zhang D., Pan X., Mostofa K.M.G., Chen X., Mu G., Wu F., Liu J., Song W., Yang J., Liu Y., Fu Q. 2010. Complexation between Hg(II) and biofilm extracellular polymeric substances: An application of fluorescence spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials*, 175: 359-365
- Zhong H., Wang W.-X. 2009. Controls of dissolved organic matter and chloride on mercury uptake by a marine diatom. *Environmental Science and Technology*, 43, 23: 8998-9003

Zoppini A., Puddu A., Fazi S., Rosati M., Sist P. 2005. Extracellular enzyme activity and dynamics of bacterial community in mucilaginous aggregates of the northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353: 270-286

Žižek S., Ribeiro Guevara S., Horvat M. 2008. Validation of methodology for determination of the mercury methylation potential in sediments using radiotracers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390: 2115-2122

## **ZAHVALA**

Prvo mesto v moji zahvali si zasluži mentor, prof. dr. Jadran Faganeli, za njegovo vodenje in usmerjanje, pa tudi svobodo, pri opravljanju doktorskega dela. Posebno se zahvaljujem tudi prof. dr. Mileni Horvat za odprt sprejem v njen raziskovalno skupino in vse izkušnje, ki sem si jih tam nabrala.

Neskončne in nemerljive zasluge in zahvale gredo tudi mojim sodelavcem, ki so z leti postali mnogo več kot to.

## PRILOGE

### Priloga A

Dovoljenje založnika Taylor & Francis za objavo članka z naslovom Interaction of macroaggregates and Hg in coastal waters (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea) v tiskani verziji doktorske disertacije

4.04.13

Rightslink® by Copyright Clearance Center



**RightsLink®**

[Home](#)

[Account Info](#)

[Help](#)



**Geomicrobiology  
Journal**

**Title:** Interaction of Macroaggregates and Hg in Coastal Waters (Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea)  
**Author:** Neza Koron, Jadran Faganeli, Ingrid Farnoga et al.  
**Publication:** Geomicrobiology Journal  
**Publisher:** Taylor & Francis  
**Date:** Sep 1, 2011  
Copyright © 2011 Taylor & Francis

Logged in as:  
Neza Koron  
Account #:  
3000642219

[LOGOUT](#)

#### **Thesis/Dissertation Reuse Request**

Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2013 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#).  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customerservice@copyright.com](mailto:customerservice@copyright.com)

## Priloga B

Dovoljenje založnika Springer za objavo članka z naslovom Benthic fluxes of mercury during redox changes in pristine coastal marine sediments from the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea) v tiskani verziji doktorske disertacije

4. 04. 13

RightsLink Printable License

### SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 04, 2013

This is a License Agreement between Neža Koron ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	3121880193366
License date	Apr 04, 2013
Licensed content publisher	Springer
Licensed content publication	Journal of Soils and Sediments
Licensed content title	Benthic fluxes of mercury during redox changes in pristine coastal marine sediments from the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea)
Licensed content author	Neža Koron
Licensed content date	Jan 1, 2012
Volume number	12
Issue number	10
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Full text
Number of copies	8
Author of this Springer article	Yes and you are the sole author of the new work
Order reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Povezave med organsko snovjo in živim srebrom v obalnem morju in lagunah/Interaction of natural organic matter with mercury in coastal marine and lagoon environments
Expected completion date	Jun 2013
Estimated size(pages)	147
<b>Total</b>	<b>0.00 EUR</b>

## Priloga C

Dovoljenje založnika Elsevier za objavo članka z naslovom Mercury in the sediments of the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea): Sources, distribution and speciation v tiskani verziji doktorskega dela

4. 04. 13

Rightslink Printable License

### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 04, 2013

---

This is a License Agreement between Neža Koron ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Neža Koron
Customer address	Sv. Trojica 12 Dob, 1233
License number	3121871260985
License date	Apr 04, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Estuarine, Coastal and Shelf Science
Licensed content title	Mercury in the sediments of the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea): Sources, distribution and speciation
Licensed content author	Alessandro Acquavita, Stefano Covelli, Andrea Emili, Daniela Berto, Jadran Faganeli, Michele Giani, Milena Horvat, Neža Koron, Federico Rampazzo

4. 04. 13 Rightslink Printable License

Licensed content date 10 November 2012

Licensed content volume number 113

Licensed content issue number

Number of pages 12

Start Page 20

End Page 31

Type of Use reuse in a thesis/dissertation

Intended publisher of new work other

Portion full article

Format both print and electronic

Are you the author of this Elsevier article? Yes

Will you be translating? No

Order reference number

Title of your thesis/dissertation Povezave med organsko snovjo in živim srebrom v obalnem morju in lagunah/Interaction of natural organic matter with mercury in coastal marine and lagoon environments

Expected completion date Jun 2013

Estimated size (number of pages) 147

Elsevier VAT number GB 494 6272 12

Permissions price 0.00 USD

VAT/Local Sales Tax 0.0 USD / 0.0 GBP

Total 0.00 USD

## Priloga D

Dovoljenje založnika Elsevier za objavo članka z naslovom Benthic flux measurements of Hg species in a northern Adriatic lagoon environment (Marano and Grado Lagoon, Italy) v tiskani verziji doktorskega dela

4. 04. 13

Rightslink Printable License

### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 04, 2013

---

---

This is a License Agreement between Neža Koron ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Neža Koron
Customer address	Sv. Trojica 12 Dob, 1233
License number	3121870876627
License date	Apr 04, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Estuarine, Coastal and Shelf Science
Licensed content title	Benthic flux measurements of Hg species in a northern Adriatic lagoon environment (Marano and Grado Lagoon, Italy)
Licensed content author	Andrea Emili, Alessandro Acquavita, Neža Koron, Stefano Covelli, Jadran Faganelli, Milena Horvat, Suzana Žižek, Vesna Fajon
Licensed content date	10 November 2012

4.04.13

Rightslink Printable License

Licensed content volume number	113
Licensed content issue number	
Number of pages	14
Start Page	71
End Page	84
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Povezave med organsko snovjo in živim srebrom v obalnem morju in lagunah/Interaction of natural organic matter with mercury in coastal marine and lagoon environments
Expected completion date	Jun 2013
Estimated size (number of pages)	147
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
Total	0.00 EUR

## Priloga E

Dovoljenje založnika Elsevier za objavo članka z naslovom Mercury methylation and reduction potentials in marine water: An improved methodology using  $^{197}\text{Hg}$  radiotracer v tiskani verziji doktorskega dela

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 04, 2013

This is a License Agreement between Neža Koron ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Neža Koron
Customer address	Sv. Trojica 12 Dob, None 1233
License number	3121871432965
License date	Apr 04, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Applied Radiation and Isotopes
Licensed content title	Mercury methylation and reduction potentials in marine water: An improved methodology using Hg radiotracer
Licensed content author	Neža Koron, Arne Bratkič, Sergio Ribeiro Guevara, Mitja Vahčič, Milena Horvat
Licensed content date	January 2012
Licensed content volume number	70
Licensed content issue number	1
Number of pages	5
Start Page	46
End Page	50
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	None
Title of your thesis/dissertation	Povezave med organsko snovo in živim srebrom v obalnem morju in lagunah/Interaction of natural organic matter with mercury in coastal marine and lagoon environments
Expected completion date	Jun 2013
Estimated size (number)	147