

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin**



**Schopnost půdních mikroorganismů kumulovat rtuť  
v kontaminované půdě**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Jitka Havlíčková**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Jiřina Száková, Csc.**

**2014**

# **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Schopnost půdních mikroorganismů kumulovat rtuť v kontaminované půdě vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne: .....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce prof. Ing. Jiríně Szákové, Csc. za trpělivou a laskavou pomoc.

## Souhrn

V modelovém experimentu byla sledována mobilita rtuti v kontaminované půdě se zaměřením na roli půdních mikroorganismů. V terénu byla odebrána zemina z lokality Trhové Dušníky na Příbramsku. Tato lokalita spadá do oblasti s významnou těžební aktivitou, díky níž se do okolního prostředí uvolnilo velké množství rizikových prvků, zejména kadmia, arsenu, olova a zinku. Zároveň se zde v minulosti ve velké míře mořilo osivo chloridem fenylrtuťnatým, který je na tomto místě zdrojem kontaminace okolního prostředí rtutí.

Byly provedeny 2 pokusy s časovým odstupem půl roku. V obou případech bylo sestaveno 6 rhizoboxů, které byly po dobu tří týdnů zavlažovány a udržovány při konstantní teplotě 21°C. Oproti původnímu účelu rhizoboxu, který je určen pro zkoumání interakce rostlin a půdních elementů, jsme na akrylovou destičku rhizoboxu vložili agarovou vrstvu obsahující druhy a rody mikroorganismů izolovaných z půdy kontaminované rtutí. Jedná se o druhy *Paenibacillus alginolyticus*, *Burkholderia glathei*, a zástupce rodů *Burkholderia sp.* a *Pseudomonas sp.*

Pro určení biologické dostupnosti rtuti z půdy a tedy míry její toxicity byla použita extrakce 0,11 M kyselinou octovou. Pro posouzení složení rtuti v půdním vzorku byla použita metoda postupné extrakce. Tímto postupem jsme zjišťovali rtuť uvolnitelnou vodou, uvolnitelnou v kyselém prostředí, rtuť vázanou na humínové kyseliny, množství elementární rtuti, sulfid rtuťnatý a residuální rtuť. Stanovení celkových obsahů rtuti v rhizoboxech bylo provedeno pomocí atomového absorpčního spektrometru AMA 254. V poslední řadě bylo měřeno množství rtuti v agarové vrstvě, tedy předpokládané množství, které mikroorganismy absorbovaly. Celkové obsahy rtuti v půdě byly velmi vysoké, přičemž kontaminace byla velmi heterogenní. Vzhledem k celkovému obsahu Hg v půdě byl podíl biologicky dostupné rtuti relativně nízký, ale nezanedbatelný, což naznačuje riziko vstupu rtuti do potravního řetězce. V rámci frakcionace byly zjištěny všechny zkoumané formy v poměrně nízkém množství. Významný poznatek však přineslo zjištěné množství rtuti v tělech mikroorganismů a agaru. V jejich tělech bylo zjištěno významně nižší množství než její celkové množství v půdě. Zdá se tedy, že sledované mikroorganismy jsou schopny přežít v kontaminované půdě, protože rtuť neakumulují. Je také možno předpokládat, že tyto mikroorganismy patří k těm druhům, které napomáhají volatilizaci rtuti do okolního prostředí.

**Klíčová slova:** rtuť, rhizobox, remediační metody, bakterie, půda, akumulace

## Summary

In a model experiment the mobility of mercury in contaminated soil was monitored with focus on the role of soil microorganisms. In the field, soil was removed from the site Trhové Dušníky, close to Příbram. This location falls into an area of substantial mining activity, therefore it produces large amount of traceable elements in surrounding area, such as cadmium, arsenic, lead and zinc. Together with stated above it was heavily infested phenylmercurid chloride seed used in the past, which became the source of environmental mercury contamination in this area. Two experiments were performed in interval of six months. In both cases six rhizoboxes were assembled and irrigated for three weeks and maintained at the constant temperature of 21°C. Against the original purpose of the rhizobox, which is designed for examination of interactions between plants and soil elements, we put agar layer containing species of microorganisms isolated from the soil contaminated by mercury on acrylic window. There are species of *Paenibacillus alginolyticus*, *Burkholderia glathei* and representatives of genres *Burkholderia sp.* and *Pseudomonas sp.* For determination of biologic availability of mercury from soil, thus rate of its toxicity, an extraction with 0,11M acetic acid was used. A method of successive extraction was used to assess the composition of mercury in a soil sample. We investigated mercury releasable under acidic conditions, mercury bonded to humic acids, the amount of elemental mercury, mercurid sulphide and residual mercury. Determination of total mercury content in rhizoboxes was performed using atomic absorption spectrometer AMA 254. Finally the amount of mercury in agar layer was measured, thus the estimated amount absorbed by microorganisms. Total amount of mercury in the soil was very high and contamination was heterogenous. In comparison with total content of mercury in the soil, the portion of biologically available mercury was relatively low but not negligible. That points to the risk of entering mercury to the food chain. Within fractionation there were detected all investigated forms of mercury in relatively low amount. Significant finding was the amount of mercury accumulated in bodies of microorganisms and agar, where significantly lower amount was found than total amount in the soil. Therefore it seems, that all organisms are able to survive in contaminated soil, because they don't accumulate mercury. It is possible to assume, that these microorganisms among species that volatilize mercury to the surrounding area.

**Key words:** mercury, rhizobox, remediation methods, bacteria, soil, accumulation

# Obsah

1. Úvod .....	8
2. Cíl práce.....	9
3. Literární přehled .....	10
3.1. Rtuť .....	10
3.2. Cirkulace rtuti.....	11
3.2.1. Přírodní emise rtuti .....	11
3.2.2. Výskyt rtuti na území České republiky.....	11
3.2.3. Antropogenní emise rtuti .....	12
3.2.4. Cirkulace rtuti v atmosféře .....	12
3.2.5. Cirkulace rtuti v terestriálním prostředí.....	13
3.2.6. Cirkulace rtuti ve vodních ekosystémech .....	14
3.2.7. Rtuť v půdě .....	15
3.3. Škodlivost rtuti pro organismy.....	16
3.3.1. Škodlivost rtuti pro rostliny .....	16
3.3.2. Škodlivost rtuti pro živočichy a člověka.....	17
3.4. Remediační techniky.....	19
3.4.1. Stabilizace/solidifikace .....	19
3.4.2. Imobilizace.....	19
3.4.3. Termální desorpce.....	20
3.4.4. Vymývání půdy.....	21
3.4.5. Fytostabilizace .....	21
3.4.6. Fytoextrakce.....	22
3.4.7. Fytovolatilizace.....	22
3.5. Bioremediace pomocí mikroorganismů .....	23
3.5.1. Systém mer operonů v buňce mikroorganismu .....	23
3.5.2. Detoxikace pomocí mer operonů.....	24
3.5.3. Bakterie použité při remediaci .....	24
4. Metodika.....	26
4.1. Půdní vzorky a popis lokality.....	26
4.2. Založení pokusů .....	27

4.3.	Metody jednoduché a postupné extrakce .....	29
4.3.1.	Extrakce kyselinou octovou.....	29
4.3.2.	Postupná extrakce .....	29
4.3.3.	Stanovení obsahu rtuti v pevných vzorcích a extraktech .....	29
5.	Výsledky a diskuze.....	31
5.1.	Celkové obsahy Hg a pH půdy ve sledované lokalitě.....	31
5.2.	Ostatní prvky .....	32
5.3.	Celkové a mobilní obsahy rtuti v půdě závislé na vzdálenosti od agarové vrstvy.....	33
5.3.1.	Výsledky 1. pokusu.....	34
5.3.2.	Výsledky 2. pokusu.....	38
5.4.	Frakcionace .....	44
5.5.	Agary.....	47
6.	Závěr.....	50
7.	Seznam literatury.....	51

# 1. Úvod

Rtuť se v lidské historii objevuje od nepaměti a patří k nejdéle známým toxickým kovům. Čínané ji užívali již od roku 1000 př. n. l. jako červené barvivo. V období Říma její toxicitu popsali již Hippokrates a Galen, navzdory tomu se však stále používala. Od 15. století do začátku 2. světové války se hojně užívala k léčbě syfilidy (Ferner a Langford, 1999). Archeologové zároveň našli stopy rtuti v egyptských hrobkách, které se datují v období 1500 let př.n.l. (Ontario ministry of the environment a kol., 2003). Závažnost přítomnosti rtuti v prostředí se projevila poté, co se prokázalo, že se akumuluje v živočišných tkáních (nejprve to bylo prokázáno u ryb) a vstupuje tak do potravního řetězce a ohrožuje i člověka (Haq a kol., 2005). Dále bylo zjištěno, že se každý rok v USA narodí 630 000 novorozenců, u kterých bylo v krvi nalezeno zvýšené množství rtuti (Li a kol., 2013).

Trend současnosti je přistupovat k přírodě neinvazivním, tzv. zeleným metodám remediace životního prostředí, které jsou k přírodě šetrné, většinou finančně méně nákladné a často velmi snadno proveditelné. Jako jedna z perspektivních variant se jeví akumulace rtuti mikroorganismy. Nejedná se o samostatnou remediační metodu, nicméně se dobře hodí jako doprovodný prvek k jiným přírodě neinvazivním postupům.



## 2. Cíl práce

Cílem práce je nejdříve v úvodním literárním přehledu shrnout hlavní problémy týkající se působení rtuti na živé organismy, tedy živočichy, rostliny a člověka a její cyklus v přírodě. Důraz bude kladen na možnosti a způsoby její remediace.

Experimentální část práce bude zaměřena na studium změn mobility Hg v půdě působením vybraných mikroorganismů v modelových pokusech s využitím rhizoboxů. V pokusech budou využity tolerantní kmeny mikroorganismů, které jsou schopny přežít i v extrémně kontaminované půdě a půda kontaminovaná rtutí z antropogenních zdrojů.

Hypotéza: V kontaminované půdě přežívají specifické druhy mikroorganismů adaptované na toto prostředí. Jejich chování a schopnost akumulace rtuti je možno popsat pomocí rhizoboxů, tedy zařízení, které napomáhá k popisu procesů v rhizosféře.

## 3. Literární přehled

### 3.1. Rtuť

Mezní hodnota koncentrace rtuti v běžné půdě, písku, hlinitém písku a štěrkopísku je  $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Kafka a Punčochářová, 2002). Všechny formy rtuti jsou v prostředí toxické, za nejvíce problémovou se však širokou veřejností považuje methylrtuť (Barkay a Wagner-Dobler, 2005). Vyznačuje se silnou afinitou k síře, tvoří pevné vazby s thiolovými skupinami bílkovin a enzymů a narušuje jejich funkčnost (Kafka a Punčochářová, 2002). Brooks a kol. (2009) zjistili, že forma rtuti uvolněná do prostředí antropogenní činností se může od jejích přírodních forem značně lišit. EPA popisuje 500 míst v Americe, kde hrozí nebezpečí kontaminace rtutí v prostředí a ohrožuje lidské zdraví. Na těchto místech byla identifikována elementární rtuť v souvislosti s průmyslovou činností, jako například dolování minerálů s obsahem rtuti, těžba zlata atp. (Lester a kol., 2008). Kafka a Punčochářová (2002) ve své publikaci uvádějí nejznámější zdroje kontaminace rtutí, a to zpracování rud, zemědělství, elektrochemie, katalytické procesy, baterie, lékařství (zubní amalgamy, teploměry) a spalování fosilních paliv. Rtuť má mnoho jedinečných vlastností. Je to jediný kov, který se za pokojové teploty vyskytuje ve formě kapaliny. Kapalná rtuť se velmi snadno odpařuje, tvoří velmi nebezpečné jedovaté páry. Je dobrý vodič, v závislosti na tlaku a teplotě rozvádí elektřinu (na základě této vlastnosti byla rtuť používána v teploměrech, elektrických vypínačích, barometrech atp). V plynném stavu se rtuť spojuje s jinými plyny, tvoří složitější molekuly, které když se nabijí elektřinou, mohou vyzařovat světlo, proto se užívá jako náplň do zářivek a neonových světel. S většinou kovů tvoří tvárné slitiny, jako jsou například dentální amalgamy (Ontario ministry of the environment a kol., 2003).

Množství rtuti uvolněné do atmosféry při těžbě a rafinaci kovů se odhaduje na 12% z celkového objemu zdrojů způsobených lidskou činností (Han a kol., 2006). Zároveň se do prostředí uvolňuje spolu s nekvalitní likvidací odpadů obsahujících rtuť (Lester a kol., 2008). V ekosystémech se vyskytuje zejména ve vodním prostředí ve formě methylrtuti a někteří mořští živočichové ji akumulují ve svých tkáních ve zvýšené míře, jako např. tuňák a žralok. V humózních půdách je vázána do stabilních komplexů s organickými složkami, proto není dobře dostupná pro rostliny, výjimku tvoří např. obiloviny, kde byl na silně kontaminované půdě zjištěn zvýšený výskyt tohoto kovu (Kafka a Punčochářová, 2002). Současné studie uvádějí, že se vlivem antropogenní činnosti zvýšilo celkové množství rtuti v atmosféře až

tříkrát a v porovnání s 18. stoletím se do životního prostředí uvolnilo její dvakrát až třikrát větší množství (Hoserová a kol., 2006).

### **3.2. Cirkulace rtuti**

#### **3.2.1. Přírodní emise rtuti**

Primární emise pocházejí z geologických zdrojů, tedy ze sopek nebo souvisejících geologických činností, jako jsou emise z půdy, která rtuť obsahuje přirozeně. Celkové množství rtuti emitované z těchto zdrojů se odhaduje na  $500 \text{ T.rok}^{-1}$  (Selin, 2009). Existuje více než 25 minerálů obsahujících rtuť. Za jeden z nejznámějších je považován cinabarit (HgS), který je znám a využíván po více než 2300 let. Hlavní ložiska rtuti se nachází ve Španělsku (Almadén), Slovinsku (Idria) a Itálii (Monte Amiata) (Munthe a Schroeder, 1998). Množství a obsah rtuti v litosféře je cca  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , atmosféře  $0,002 - 0,2 \text{ pg} \cdot \text{l}^{-1}$  a hydrosféře cca  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (Edmonds a kol., 1998). Varekamp a Buseck (1986) ve své publikaci uvádějí, že na základě měření z horkých pramenů a geotermálního tepla činí emise za rok z těchto zdrojů cca  $60 \text{ mg} \cdot \text{rok}^{-1}$ . Gustin a kol. (2008) naopak popisují, že celkové množství rtuti uvolněné ze sedimentů a půdy v Americe se pohybuje v rozmezí  $10-20 \text{ t.rok}^{-1}$ .

#### **3.2.2. Výskyt rtuti na území České republiky**

V rámci České republiky se vyskytuje cinabarit v lokalitách: Jedová hora u Hořovic, Horní Luby u Chebu, Svatá u Berouna, Bezdrůžice u Mariánských lázní a Jesenné u Semil. Zde se zároveň ve velké míře těžily rudy, na které je rtuť vázána (Velebil, 2009). Rozšíření rtuti do půdy je úzce spojeno s antropogenními vlivy, zejména důlní činností a tavením rud. Významnou lokalitou s historickým záběrem v těchto odvětvích je Příbram. Lokalita Jedová hora se stala významným producentem již v polovině 18. století, přičemž její získávání pokračovalo až do druhé půle 19. století. Vedle přirozeně se vyskytující se formy rtuti ve formě cinabaritu na tomto území byla zjištěna také mobilní rtuť v galenitu (PbS) a sfaleritu (ZnS) (Hojdová a kol., 2011). Dolování v Horních Lubech je pokládáno za historicky nejvýznamnější. Cinabarit byl zde dobýván od poloviny 16. století. Cinabarit byl na místě taven a byla z něj vyráběna rtuť (Velebil, 2009). Další významnou lokalitou je Svatá u Berouna, zhruba 50 km jihozápadně od Prahy. Zde se těžily rudy obsahující rtuť od konce 16. století do druhé poloviny 18. století (Hojdová a kol., 2008). Dolování v Bezdrůžicích a v Jesenném mělo velice malý, pouze lokální význam (Velebil, 2009).

### 3.2.3. Antropogenní emise rtuti

Množství emisí uvolněných antropogenní činností je mnohonásobně vyšší. Pohybuje se v rozmezí 2 200 – 2 400 t.rok<sup>-1</sup> Pacyna a kol. (2006). Autoři dále uvádějí, že množství rtuti uvolněné antropogenní činností pro rok 2000 je průměrně 2 200 t . rok<sup>-1</sup>. Zároveň zmiňují, že nadpoloviční podíl na takovém množství emisí má spalování fosilních paliv, zejména uhlí, které se podílí zhruba ze 60%. Celkové množství emitované rtuti se od roku 1990 nezměnilo, zůstává konstantní. Technologie používané ke kontrole síry nebo jejích částic, odsíření kouřových plynů nebo elektrostatické odlučovače mohou pomoci se snížením emisí rtuti do ovzduší . V Americe byly sníženy emise v letech 1990, neboť byla zavedena omezení na odpad ze zdravotnictví a spalování odpadu (Strode a kol., 2009). Zdroje emisí rtuti jsou více popsány ve vyspělých zemích Ameriky a Evropy než v rozvíjejících se státech. Dalším zdrojem rtuti je dolování zlata, s touto činností se do ovzduší dostane zhruba 450 t . rok<sup>-1</sup> , tento údaj je však nejistý, starší studie uvádějí, že množství rtuti uvolněné s touto činností se pohybuje kolem hodnoty 800 t . rok<sup>-1</sup> (Selin, 2009). Pacyna a kol. (2006) předpokládají, že celkové emise rtuti budou v roce 2020 o 20 % vyšší. Streets a kol. (2009) uvádějí, že v roce 2050 se bude její množství pohybovat v rozmezí 2 390 – 4 860 t. rok<sup>-1</sup>, toto velké rozpětí je však závislé na socioekonomickém a technologickém vývoji.

### 3.2.4. Cirkulace rtuti v atmosféře

Rtuť je transportována z půdy do povrchových vod, odkud se odpařuje z vody do vzduchu, který ji přenáší zpět na půdu a celý proces se opakuje. Konečným úložištěm rtuti jsou oceánské sedimenty, které rtuť uvolňují velmi pomalu. Doba její životnosti v procesu atmosféra – oceán, podzemní voda a převod do sedimentů se odhaduje na 3 000 let (Selin, 2009). Volné atomy rtuti (Hg<sup>0</sup>) se uvolňují z půdy např. vlivem vodní eroze nebo vstupují do atmosféry ve formě páry z vulkánů. Tato přírodní zásoba rtuti není však zdaleka tak podstatná jako antropogenní vlivy, o kterých se v dnešní době domníváme, že tvoří více než polovinu toho množství, které koluje ekosystémy (Ontario ministry of the environment a kol., 2003). Volná rtuť vstupuje do koloběhu, kde prochází různými procesy, které napomáhají k jejímu dálkovému transportu, nebo naopak k jejímu zachycení na aktivním místě, ovlivnění živé či neživé složky přírody a vstupuje do potravního řetězce (Hoserová a kol., 2006). Munthe a kol. (1998) uvádějí, že ročně se do atmosféry antropogenními a přírodními vlivy uvolní celkem 741 000 t.

Bylo již řečeno, že nejčastější forma rtuti, uvolněná z půdy, sedimentů a oceánů ale i spalováním fosilních paliv, je elementární rtuť  $\text{Hg}^0$ . Antropogenní zdroje však mohou emitovat rtuť ještě ve formě divalentní, tedy  $\text{Hg}^{+II}$ . Nicméně elementární rtuť je nejhojnější forma vyskytující se v atmosféře s globálním průměrem koncentrace  $1,6 - 3 \text{ ng.m}^{-3}$ , zároveň má atmosférickou životnost 0,5-1 rok (Lin a Pehkonen, 1999). Forma  $\text{Hg}^{+II}$  je více rozpustná ve vodě, je to tedy forma, která do prostředí vstupuje formou mokré a suché depozice. Zároveň má kratší životnost, v atmosféře zůstává v rozmezí dnů až týdnů a její koncentrace nad povrchem Země je cca  $1 - 100 \text{ pg.m}^{-3}$  (Selin, 2009).

### 3.2.5. Cirkulace rtuti v terestriálním prostředí

Mokrá a suchá depozice přináší rtuť z atmosféry na povrch země. Nejvýznamější forma rtuti uložená v půdě je  $\text{Hg}^{+II}$ . Po její depozici se jí část okamžitě volatilizuje zpět do atmosféry a část zůstává v půdních zásobách, odkud se uvolňuje zpět jen velmi pomalu, v rozmezí století až tisíciletí (Selin, 2009). Bylo dokázáno, že čerstvě uložená rtuť je dostupnější k redukci a opětovné emisi ve formě  $\text{Hg}^0$  než rtuť, která se již v prostředí vyskytovala. Studie dále ukazují, že 5 – 60% je emitováno do atmosféry, vyšší procento bylo zjištěno pro povrchy s vodou, popřípadě sněhem (Hintelmann a kol., 2002). 90% z celkového množství uloženého v půdě je vázáno na organickou hmotu, kde se váže velmi silnými vazbami na redukované sírné skupiny. Na základě těchto údajů bylo zjištěno, že celosvětové množství rtuti uložené v půdě se pohybuje cca kolem  $10^6 \text{ T}$  a že je uloženo ve svrchních 15ti centimetrech půdy a činnost člověka zvyšuje její obsahy cca o 15 %. Absorbovaná rtuť zůstává v půdě, může být methylována nebo se může připojit k odtoku spolu s vodou (Selin, 2009).

Autor dále uvádí, že rtuť, která se do půdy uložila, může vstupovat do vegetace. V pozemní vegetaci pochází rtuť uložená v nadzemních částech rostliny z atmosféry a rtuť uložená v kořenech přichází z půdy (Obris, 2007).  $\text{Hg}^{+II}$  se ukládá v listech díky atmosferickým srážkám a suchým depozicím (Selin, 2009). Lindberg a kol. (1998) uvádějí, že celkové množství rtuti emitované vegetací se pohybuje v rozmezí  $1400 - 3200 \text{ t.rok}^{-1}$ . Z půdy se pak uvolní celkově  $2300 \text{ t.rok}^{-1}$  rozkladem biomasy. Mezi půdní reduktanty rtuti řadíme železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ), humínové a fulvo kyseliny (Gabriel a Williamson, 2004). Redukce a volatilizace může být závislá na teplotě a slunečním záření. V sušších ekosystémech je po srážkách a zvýšení půdní vlhkosti zaznamenán zvýšený výpar rtuti (Gustin a Stamenkovic, 2005). Zároveň se rtuť může uvolňovat při spalování biomasy, kdy emise z takového

spalování představují zhruba  $700 \text{ t.rok}^{-1}$ . Spalování a změny vázané na změnu klimatu, jako jsou například ztráty rašelinišť, mohou být příčinou větší mobility rtuti a jejího zvýšeného uvolňování do atmosféry (Selin, 2009).

### 3.2.6. Cirkulace rtuti ve vodních ekosystémech

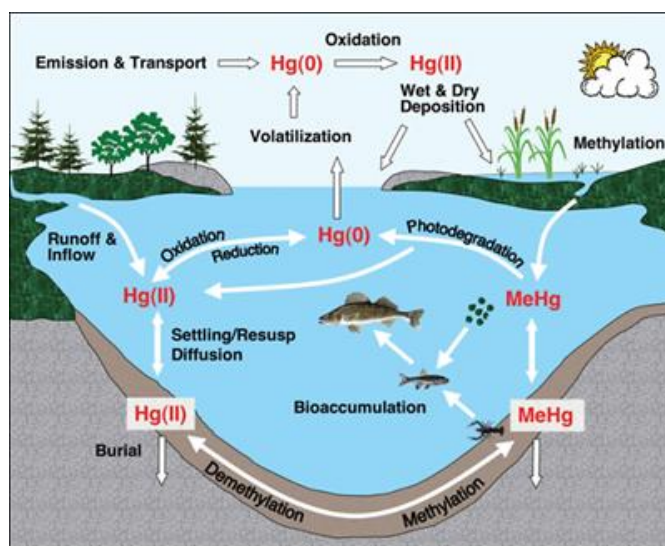
Z důvodu zaznamenaných otrav methylrtutí po pozření rybiho masa se stala tato látka velmi často zkoumanou a diskutovanou, zejména ve sladkovodních ekosystémech. V roce 2006 se v Americe vydalo doporučení 48 z 50 státům, aby místní lidé nekonzumovali rybí maso, kvůli riziku intoxikace methylrtutí (Selin, 2009). Zdroje kontaminace bývají nejčastěji bodové, lokální. Ve vzdálených místech vstupuje atmosferická rtuť do vody přímou depozicí do jezer a rozvádí se povodím. Vstup rtuti do povodí je většinou spolu se srážkami ve formě  $\text{Hg}^{+II}$ , dále se redukuje na  $\text{Hg}^0$  a emituje zpět do atmosféry. Její menší množství se však přeměňuje na methylrtuť, která je pro člověka velmi nebezpečná. Methylace rtuti je biologický proces zajišťovaný specifickými rody sulfátových a železitých bakterií (Gilmour a kol., 1998) a vyskytuje se velmi často v oblastech mokřadů a jezerních sedimentů (Munthe a kol., 2007). Ve vodních sedimentech dochází působením mikroorganismů k přeměně frakcí anorganické rtuti  $\text{Hg}^{II}$  na methylrtuť. Obsah síry, organického uhlíku a struktura a složení sedimentu ovlivňují míru produkce methylrtuti, neboť stimulují aktivitu mikroorganismů a mají vliv na množství přeměněné anorganické rtuti (Selin, 2009). V přímořských sedimentech jsou bakterie redukující sulfáty hlavní příčinou syntézy methylrtuti (Gilmour a kol., 1992). Je známa řada faktorů, které ovlivňují rychlost syntézy methylrtuti. Patří mezi ně dodání biologicky dostupné  $\text{Hg}^{+II}$  a stimulace methylace mikroorganismy (Selin, 2009). Ekosystémy se s těmito změnami v prostředí vyrovnávají různě rychle, zejména v závislosti na typu ekosystému a množství srážek. Bylo experimentálně zjištěno, že pokles koncentrace rtuti v jezerech byl ze začátku v horizontu jednoho roku až třiceti let, záhy následovaly pomalejší reakce, které se odhadovaly až na staletí. Rychlost reakce v ekosystému na přísun rtuti byla nejrychlejší u těch typů, do kterých se rtuť dostala spolu s atmosferickými srážkami, naopak nejpomalejší tam, kde se rtuť dostala spolu s pozemním tokem řek a potoků a podzemních vod (Knights a kol., 2009). Formy rtuti vyskytující se v oceánech jsou  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{+II}$ , methylrtuť, dimethylrtuť a částečně i koloidní rtuť (Mason a Fitzgerald, 1993). Celková koncentrace rtuti se celosvětově liší, nicméně její průměr se odhaduje na  $1,9 \text{ pmol.l}^{-1}$ , nejvyšší množství bylo zjištěno ve Středozezemním moři a to až  $2,5 \text{ pmol.l}^{-1}$  a Atlantském oceánu ( $2,4 \text{ pmol.l}^{-1}$ ), naopak nejnižší koncentrace byly zjištěny

v Tichém oceánu ( $1,2 \text{ pmol.l}^{-1}$ ) (Cossa a kol., 1997). Současné modely ukazují, že koncentrace ve většině oceánů není stálá díky atmosferickým srážkám a že se bude v příštích dekádách s největší pravděpodobností navyšovat (Sunderland a Manson, 2007). Přeměna rtuti na povrchu oceánů je velmi rychlá.  $\text{Hg}^{+II}$  je ukládána na povrchu oceánů mokrou depozicí, dále může být přeměněna na  $\text{Hg}^0$ , adsorbována na částice nebo methylována. Methylace se objevuje nejčastěji v mořských sedimentech, šelfových mořích a ústí řek. Takto vytvořená methylrtuť vstupuje do těl mořských živočichů, zejména ryb v různých časových rozmezích (Selin, 2009). Schematicky tento cyklus znázorňuje obrázek 1.

### 3.2.7. Rtuť v půdě

Nezanedbatelné množství rtuti se do půdy může dostat prostřednictvím hnojiv, vápnění a hnoje, tedy při zemědělských pracích. Je také třeba upozornit na aplikaci čistírenských kalů obsahujících rizikové prvky. Množství kovů přístupných rostlinám z aplikovaných čistírenských kalů závisí na množství různých faktorů, jako je kationtová výměnná kapacita, pH půdy, množství aplikovaného kalu a druhu rostliny, ke které se aplikují (Patra a Sharma, 2000). Dalším významným zdrojem rtuti v půdě jsou fungicidy, které se v historii používaly preventivně na moření osiva některých plodin, nejčastěji šlo o zrno pšenice, ječmene, ovsa, žita, kukuřice, rýže. Organické formy rtuti vyskytující se v mořidlech těchto semen byly velmi účinné, ale ukázalo se, že jsou zdrojem kontaminace půdy, kde se navázaly zejména na organickou humózní složkou. Používání těchto mořidel vedlo až k akumulaci rtuti v ptácích a savcích, kteří tato semena pojídali, proto bylo používání mořidel obsahujících rtuť ve většině vyspělých zemí zakázáno v roce 1960 (Fimreite, 1970). Bylo zjištěno, že množství rtuti se mění s hloubkou odběru vzorku. Půdy s vysokým obsahem organické hmoty obsahují vyšší množství tohoto kovu než čistě minerální půdy (John a kol., 1975).

Obr. 1, Schéma cirkulace rtuti (Selin, 2009).



### 3.3. Škodlivost rtuti pro organismy

#### 3.3.1. Škodlivost rtuti pro rostliny

Díky nízké fyto toxicitě rtuti jsou informace o jejím vstupu a metabolismu v tělech rostlin značně omezené. Absorpce organických i anorganických forem rostlinami z půdy je nízká a spekuluje se, že existuje bariéra, která brání přemístění rtuti od kořenů k vrcholu nadzemní části. Existují však druhy rostlin, například rýže, které tento kov absorbují ve formě residuí fungicidů a následně jej vedou až do nadzemních požitelných částí. Faktory ovlivňující absorpci rtuti rostlinou zahrnují koncentraci kovu v rhizosférní zóně, délku expozice rtuti, obsah organické hmoty v okolní půdě a sedimentech, kationtovou výměnnou kapacitu a redox potenciál (Cho a Park, 1999). Rostliny mohou ale přijímat i atmosferickou rtuť uvolněnou z různých zdrojů znečištění foliárně. Kontaminované listy pak po opadu a rozkladu vytvářejí humusovou složku půdy se zvýšeným obsahem tohoto prvku. Nicméně je jisté, že plynné složky rtuti z atmosféry významně přispívají ke zvýšení obsahu tohoto prvku v plodinách (Mosbaek a kol., 1988). Toto potvrzuje i fakt, že byl zaznamenán vyšší obsah tohoto prvku v plodech rostlin rostoucích v blízkosti industriálních zón (Wojciechowska-Mazurek a kol., 1995). Akumulace, toxicita a distribuce rtuti se rozlišují podle toho, zda byla rostlina vystavena elementární rtuti  $Hg^0$  nadzemní částí, nebo anorganické  $Hg^{2+}$  kořeny. Elementární rtuť absorbovaná nadzemní částí nevykazuje pohyb v rostlině do kořenů, oproti tomu bylo zjištěno, že její anorganická forma  $Hg^{2+}$  vykazuje pohyb do nadzemních částí z kořenů již 10. den po vystavení rostliny do kontaktu s kontaminovanou zemínou. Rostliny vystavené kontaminaci rtutí měly pozastavený růst kořenů i nadzemních částí, zároveň byla



zjištěna deformace pletiv. Mechanismus toxicity souvisí s tím, že kationty rtuti mají vysokou afinitu k –SH skupině a mohou tak částečně narušovat v podstatě jakýkoliv proces v rostlině, kde hrají roli proteiny (Clarkson, 1972). Toxický vliv může být taktéž spojen s nescifickou inhibicí variabilní skupiny vnitrobuněčných enzymů a s několika specifickými dýchacími enzymy obsahujícími thiolovou skupinu –SH (Patra a kol., 2004). Rtuť v rostlinném těle zvýší po krátkodobé expozici hladinu fotosyntetických pigmentů, zejména chlorofylů a karotenoidů, při dlouhodobé expozici se naopak jejich obsah rapidně snižuje, což ovlivňuje světelnou i temnotní fázi fotosyntézy, kdy dochází k inhibici elektronového transportního řetězce v rámci tohoto procesu. Rozsah poškození a mechanismus narušení fotosyntetického aparátu je ovlivněn tím, zda se jedná o podmínky in vitro či in vivo, stejně tak jako na stáří zkoumané rostliny (Shaw a Rout, 1998). Bylo zjištěno, že rtuť narušuje vodní kanálky v membráně buněk vyšších rostlin. Při koncentraci  $>1 \text{ mg.l}^{-1}$  urychluje rtuť peroxidaci lipidů v membráně, tak narušuje její strukturu a zvyšuje její propustnost. Chloridy rtuti snižují hydraulickou vodivost kořenových buněk a mění tak polarizaci jejího membránového potenciálu (Zhang a Tyerman, 1999). Po více než 60 let probíhají experimenty o studiu efektu rtuti na genetiku. Jedním z nejvýznamnějších objevů je její vliv na nastartování c-mitosy, která vyústila až k tvorbě polyploidních, aneuploidních buněk a c-tumorů (Patra a kol., 2004). (Ramel, 1969) popisuje, že organické formy rtuti jsou 200x více schopné spustit c-mitosu než její anorganické formy.

### **3.3.2. Škodlivost rtuti pro živočichy a člověka**

Ionty těžkých kovů přicházejí do organismů zejména dýchacím a trávicím ústrojím a kůží. V těle jsou vstřebávány, pronikají do krve, která je rozvádí dále po těle (Kafka a Punčochářová, 2002). Nebezpečí methylrtuti jako jedu bylo popsáno roku 1956, kvůli masové otravě touto látkou v oblasti Minamata v Japonsku. Tento případ slouží jako modelový příklad důsledku kontaminace životního prostředí člověka tímto prvkem. V dubnu roku 1956 byla do nemocnice v Minamatě transportována dívka, jejíž mozek vykazoval abnormální symptomy, jako je porucha řeči, chůze a stav deliria. Během následujících pěti týdnů se stejné symptomy začaly objevovat u její mladší sestry a nejbližších členů domácnosti (Fusaka a Nomura, 1998). Mnoho lidí začalo být vážně nemocných nebo zemřelo po konzumaci ryb a mušlí. Patologické nálezy v centrálním nervovém systému u zvířat a člověka se projevovaly jako atrofie a absence zánětlivých změn. V roce 1959 se na základě předchozích dokumentů o alkylrtuti dospělo k přesvědčení, že zdrojem otravy je právě tato látka. Zdrojem methylrtuti

byla chemická továrna, která používala právě tuto látku k výrobě plastů (acetaldehydu) a právě odpady z této továrny byly ukládány nedaleko pláže v Minamatě. Methylrtuť se dále kumulovala v tělech ryb a mušlí, což slouží jako hlavní zdroj potravy místních obyvatel. Podobná tragédie se stala v nedalekém městě, v Nigatě. Záhy zemřely stovky lidí včetně dětí a tisícovky vážně onemocněly právě po konzumaci kontaminovaného masa. Oficiální prohlášení Japonských úřadů bylo, že počet lidí postižených rtutí se pohyboval cca kolem 2 265 a zhruba půlka z nich zemřela. Toto číslo je v Japonsku velmi často diskutováno a jeden z nejnovějších výzkumů z Kumamoto University předkládá údaj, že bylo touto látkou postiženo 35 000 lidí. Díky této tragédii se bioakumulace rtuti v prostředí stala velmi diskutovaným a zkoumaným tématem (Korogi a kol. 1998).

Kočky v Minamatě byly jedny z prvních, na kom bylo možné ukázat známky otravy. Místně byla nemoc koček pojmenována jako „nemoc tančících koček“, kvůli svalovému třesu a křečím, které byly vidět pouhým okem. Právě díky kočkám se vědci dopracovali až k závěru, že vysoká hladina rtutí v rybách a mušlích byla hlavním důvodem zvláštní a smrtelné nemoci. Naneštěstí pro lidi z Minamaty čekala místní vláda téměř deset let, než začala s evidencí a lékařskými posudky a tak nechala desítky lidí trpět zcela zbytečně. Byly provedeny patřičné remediační kroky k nápravě území, na velkou část pláže v Minamatě byla navezena nová čistá půda a místní lidé opět dostali povolení konzumovat zdejší ryby (Ontario ministry of the environment, 2003). Další rozsáhlá kontaminace rtutí se udála roku 1971 v Iráku, kdy bylo 6 500 lidí hospitalizováno a více než 400 z nich zemřelo v důsledku požití potravy z obilných zrn, která byla ošetřována fungicidy obsahujícími methylrtuť (Korogi a kol. 1998). V játrech a ledvinách, kde množství rtuti v době smrti bylo stále vyšší než v mozku, byly patologické změny spíše nepatrné a to nejen v lehčích, ale i v závažných případech. V ledvinách byla prokázána vysoká hladina rtuti v epitelálních buňkách stočeného kanálku prvního řádu (proximální tubulus), přestože zde nebyly nápadné patologické změny. V játrech byla rtuť zaznamenána v hepatocytech a také v Kupfferových buňkách, ale poškození tkáně nebylo nijak významné. V ostatních orgánech a tkáních byly změny celkem nepatrné a zahrnovaly zejména erozivní zánět zažívacího traktu (dvanácterníku), hypoplazii kostní dřeně, atrofii lymfatických uzlin, ztučnění jater a ledvin a změny buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. V případě poškození nervového systému bylo nejzávažnější poškození zaznamenáno zpravidla v mozkové kůře a kůře mozečku, kde některé části byly poškozeny více než ostatní. Mozkový kmen nebyl poškozen v takovém rozsahu a mícha byla poškozena nejméně. Periferní nervstvo pak bylo poškozeno zejména po dlouhodobé expozici tomuto prvku (Eto a kol., 2010).

### 3.4. Remediační techniky

V dnešní době si již každý uvědomuje potenciální nebezpečí rtuti na lidské zdraví a životní prostředí. V poslední době se věnovalo mnoho sil na vývoj nejrůznějších remediačních metod, aby se snížilo množství rtuti v půdě. Vývoj remediačních technologií probíhal jak v laboratorních tak v polních podmínkách. Obecně lze říci, že extrakční metody se používají při kontaminaci vyšší než  $260 \text{ mg.kg}^{-1}$  a k stabilizačním postupům se přistupuje v případě, že je koncentrace znečištění pod touto hranicí (Wang a kol., 2012).

#### 3.4.1. Stabilizace/solidifikace

Stabilizace se řadí mezi nedestrukční metody sloužící k imobilizaci rizikových složek prostředí. Solidifikace zahrnuje fyzikální ukotvení a uzavření kontaminantu ve stabilizované vrstvě v půdě. Stabilizace je založena na chemických reakcích mezi stabilizujícím médiem a kontaminantem, což má vést k omezení jeho mobility (Wang a kol., 2012). Zmíněným stabilizačním médiem mohou být cement, sulfátová nebo fosfátová pojiva či residua polyesterů, v případě rtuti se jako nejčastější půdní přídavek používají aktivovaný uhlík (PAC) a zeolit. V obou případech mohou být použity jak in situ, tak ex situ postupy, nicméně in situ je používán častěji, neboť je energeticky a finančně výhodnější (Zhang a Bishop, 2002). Autoři ve své práci popisují pozitivní působení PAC a cementu na stabilizaci a solidifikaci rtuti ve vzorku odpadu. Rtuť byla stabilizována aktivovaným uhlíkem, následně smíchána s cementem. Výsledky ukázaly, že i odpady, které vykazovaly množství rtuti až  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$ , byly takto úspěšně stabilizovány. Fuhrmann a kol. (2002) ve své práci popisují použití SPC (sulfur polymer cement) k stabilizaci rtuti v půdě. Výsledky testů ukázaly, že ve výluhu po tomto procesu byla téměř 94x nižší koncentrace rtuti než ve vzorku analyzovaném před touto úpravou. Pro úspěšné provedení stabilizace se přistoupilo i k použití CBPS, tedy chemicky vázanému fosfátu (Randall a Chattopadhyay, 2010). Použití nejrůznějších přísad půdy k podpoře stabilizace a solidifikace má mnoho pozitiv, zejména jsou finančně nenáročné a snadno dostupné. Jsou to však metody, které samy o sobě kov z prostředí definitivně neodstraní, navýší se množství odpadu, je nutný budoucí monitoring oblasti a v neposlední řadě není dostatečně probádána životnost těchto metod (Dermont a kol., 2008).

#### 3.4.2. Imobilizace

Jedná se o in situ metodu, která snižuje potenciální toxicitu, mobilitu a rozpustnost rtuti pomocí přidání stabilizačních médií do kontaminované zeminy, popřípadě odpadu. Rtuť

se v odpadech vyskytuje v mnoha variantách a chemických formách, díky čemuž je nutno zvolit vhodný půdní přídatek pro imobilizaci. Stabilizátory se mohou obecně rozdělit do 3 hlavních skupin: ligandy obsahující síru, redukční činidla, adsorpční činidla (Bower a kol., 2008). Přidání redukované síry má za účel vysrážení ve formě HgS, která je v porovnání s jinými formami rtuti poměrně nerozpustná a netěkavá, tedy potenciálně méně škodlivá pro životní prostředí. Přidání tohoto činidla je vhodné pro koncentraci rtuti až 2300 mg.kg<sup>-1</sup>. Výsledky ukázaly snížení množství rtuti ve výluhu z 1900 µg.L<sup>-1</sup> na 35 µg.L<sup>-1</sup> (Piao a Bishop, 2006). Liu a kol., (2008) ve své studii zjistili, že přidáním síry se imobilizovalo 78% vodorozpustné rtuti. Autoři dále uvádějí, že použití FeS imobilizuje rtuť srážením a adsorpcí. Další možností je například přídatek dithiokarbamátu (DTC), který je používán k stabilizaci rtuti ve formách HgS, HgCl<sub>2</sub>, HgO, Hg<sup>0</sup>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>HgCl, nicméně další testovaná činidla jako polysulfid vápenatý nebo tetrahydridoboritan sodný se při stabilizaci těchto forem ukázala jako neefektivní (Conley a kol., 1999). Dalším užívaným materiálem je alkalická struska. Bylo zjištěno, že snižuje koncentraci rtuti v průsakové vodě. Jako adsorpční činidlo byl použit hliník, který pomáhá v tvorbě hydroxidů, které adsorbují volné ionty rtuť (Quian a kol., 2003). Výhody imobilizace jsou, že sanovaná zóna může být okamžitě osázena vegetací a že tyto metody mohou být prakticky použity na velké plochy. Nevýhodou je navýšené množství materiálu a nutnost dlouhodobého zkoumání dané lokality (Zhuang a kol., 2004).

### 3.4.3. Termální desorpce

Jedná se o technologii využívající zahřívání ke zvýšení volatilizace kontaminantů, které jsou tak částečně z půdy odstraněny, nedochází však k spalování materiálu. Anorganická rtuť se v půdě vyskytuje nejčastěji ve své elementární formě (Hg<sup>0</sup>) nebo jako součást sloučenin: HgS, HgO, HgCO<sub>3</sub>. Když okolní teplota vystoupá na 600-800 °C, přemění se tyto sloučeniny na plynné a z půdy samovolně těkají. Byly provedeny experimenty, které ukázaly, že se rtuť mění v plyn již při 127 – 700 °C (Chang a Yen, 2006). Massacci a kol. (2000) uvádějí, že se koncentrace rtuti ve vzorku půdy po působení teploty 700 °C po dobu 4 hodin snížila z 217 mg.kg<sup>-1</sup> na 10 ng.g<sup>-1</sup>. Dále autoři popisují experiment, kdy se 99% z celkového množství rtuti ve vzorku odstranilo po pouhých 20 minutách při teplotě 460 °C. Tepelné zpracování může výrazně změnit půdní vlastnosti, složení znečišťujících složek, zejména rizikových prvků, které může transformovat. Zahřívání půdy na teplotu vyšší než 550 °C snížilo obsah rtuti ve vzorku z 1320 mg.kg<sup>-1</sup> na 6 mg.kg<sup>-1</sup>, nicméně došlo i k přerozdělení kovů v půdě obsažených (Huang a kol., 2011). Autoři zahřívali půdu 2 hodiny při teplotě 270

°C a zjistili, že se v půdě s původní zjištěnou koncentrací rtuti v rozmezí 73-132 mg.kg<sup>-1</sup> snížil její obsah o 50-90% s minimálním dopadem na živiny v půdě obsažené jako jsou dusík, draslík a fosfor. Jako zdroj energie je pak možno s výhodou použít solární energie místo energie z neobnovitelných zdrojů (Navarro a kol., 2009).

#### **3.4.4. Vymývání půdy**

Jedná se o ex situ metodu, kdy dochází k separaci kontaminantů z půdy (zejména kovů a polokovů) díky chemickému vyluhování, fyzikálnímu oddělování jednotlivých částic či fyzikálně-chemickým separacím. Konkrétní metody vymývání jsou závislé na povaze kontaminantu, kdy pro kovy nacházející se v iontové formě se přistupuje k chemické extrakci, oproti tomu kontaminanty vyskytující se ve formě pevných částic je lépe sanovat pomocí fyzikální separace (Dermont a kol., 2008). Sierra a kol. (2010) ve své práci popisují tuto metodu pro čištění půdy kontaminované mechanickou disperzí prachových částic pocházejících z důlní výsypky a obsahujících arsen, olovo, kadmium, nikl, měď a rtuť. Autoři dále popisují, že se metody fyzikální separace dobře osvědčily při čištění průmyslových půd obsahujících rtuť a arsen. Touto metodou lze kovy permanentně z půdy odstranit a proto je jí možno zpět na původní území dodat. Doba trvání remediací je v porovnání s jinými extrakčními metodami poměrně krátká (Dermont a kol., 2008). Z nevýhod lze vyčíst velké množství vody potřebné k vymytí, v použité vodě dochází k tvorbě chelátů s kovy a akumulaci jílových částic a humínových kyselin, které musí být z vody odstraněny před jejím vypuštěním do recipientu (Lestan a kol., 2008).

#### **3.4.5. Fytostabilizace**

Princip fytostabilizace spočívá v použití rostlin, zejména jejich kořenů, k omezení pohybu rizikových prvků vyskytujících se v jejich těsné blízkosti. Rostliny vhodné pro fytostabilizaci by se měly vyznačovat značným růstem kořenů a nadzemní část rostliny by neměla být konzumována zvířaty (Dermont a kol., 2008). V rámci omezení pohybu rtuti se jako nejvhodnější osvědčila vrba košíkářská (*Salix viminalis*), která je schopna ve svém kořenovém systému akumulovat značné množství tohoto kovu a tak redukovat jeho pohyb v půdě (Wang a kol., 2005). Titíž autoři dále uvádějí, že v rámci omezení pohybu rtuti v půdě se zároveň dobře osvědčily druhy kostřava červená (*Festuca rubra*), lipnice luční (*Poa pratensis*), křen selský (*Armoracia lapathifolia*), slunečnice topinambur (*Helianthus tuberosus*), silenka nadmutá (*Silene vulgaris*). Výhodou této metody je její nízká nákladnost,

šetrnost k životnímu prostředí a možnost aplikace této metody jako in situ v místě kontaminace. Nicméně je tato metoda limitována hloubkou růstu kořenů a jejich pohyb je nutno monitorovat a snažit se zachovat růst rostlin (Dermont a kol., 2008).

### 3.4.6. Fytoextrakce

Jedná se o použití rostlin k odstranění kontaminantů z půdy. Ty jsou pomocí kořenů rostlin přesunuty do jejich nadzemních částí. Kontaminanty jsou tímto způsobem odstraněny z prostředí, když se nadzemní části odstraní (Wang a kol., 2012). Žádné rostlinné druhy nebyly konkrétně identifikovány jako hyperakumulátory rtuti, proto je taková fytoextrakce málo účinná. Z rostlin se zvýšenou schopností akumulace rtuti uvádějí Moreno-Jiménez a kol. (2006) šťovík štítnatý (*Rumex scutatus ssp. Induratus*) a jablečník obecný (*Marrubium vulgare*), které byly schopny extrahovat rtuť z půdy v množství 122 a 550 mg kg<sup>-1</sup>. Rovněž v některých zemědělských plodinách byly zaznamenány zvýšené obsahy rtuti, například u ječmene (*Hordeum spp.*), čočky kuchyňské (*Lens culinaris*), cizrny beraní (*Cicer arietinum*), lupiny mnoholisté (*Lupinus polyphyllus*) a a pšenice (*Triticum aestivum*). U těchto druhů byla zjištěna akumulace rtuti 18,03 – 32,4 mg.kg<sup>-1</sup>. Autoři však dále uvádějí, že fytoextrakce za použití těchto druhů je neefektivní, protože vyžaduje dlouhé časové období.

### 3.4.7. Fytovolatilizace

Tato metoda zahrnuje remediaci skupiny kovů, mezi něž patří i rtuť, které lehce těkají nebo tvoří těkavé sloučeniny. Kontaminanty jsou vedeny transpiračním proudem xylemem rostlin a v poslední fázi uvolněny buňkami do ovzduší (Leonard a kol., 1998). Tito autoři studovali pohyb rtuti mezi buňkou v listu rostliny a okolním vzduchem a identifikovali pět rostlinných druhů, které spolehlivě rostly v prostředí, kde se kontaminace tohoto kovu pohybovala v rozmezí 450 – 1605 mg.kg<sup>-1</sup>. Jsou to řeřicha širolistá (*Lepidium latifolium*), Pelyněk Douglasův (*Artemisia douglasiana*), *Caulanthus sp.*, jahodník obecný (*Fragaria vesca*), blahovičnick kulatoplodý (*Eucalyptus globulus*). Fytovolatilizaci spolehlivě asistují mikroorganismy, které pomáhají redukovat ionty Hg<sup>2+</sup> na méně toxickou a více těkavou formu Hg<sup>0</sup>. Tímto však vzniká sekundární znečištění prostředí elementární rtutí, což je hlavní nevýhoda této metody (Fox a kol., 1982).

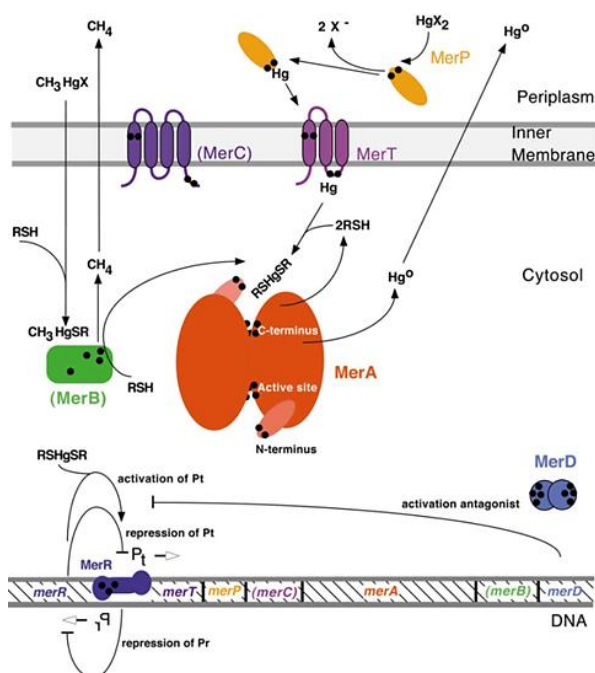
### 3.5. Bioremediace pomocí mikroorganismů

Mikroorganismy si vyvinuly obranné mechanismy, které se v případě rtuti nazývají *mer* operony. Tyto struktury jim umožňují přežít v přítomnosti iontů a organických sloučenin rtuti (Rasmussen a kol., 2008). Vyskytují se jak u gram pozitivních tak i u gram negativních bakterií a jsou umístěny na plasmidech, chromosomech, transpozonech a integronech (Summers a Silver, 1978).

#### 3.5.1. Systém *mer* operonů v buňce mikroorganismu

V případě rtuti, stejně jako u dalších rizikových prvků, je základem bioremediačních opatření přeměna tohoto prvku na méně toxické sloučeniny či vazby (Walsh a kol., 1987). Remediaci rtuti v prostředí pomocí mikroorganismů je namířena na přeměnu jejích iontových forem na méně toxické za současného působení *mer* operonů. *Mer* operony se obvykle skládají ze strukturálních genů zakódovaných ve funkčních proteinech, které mají v organismu různé funkce, například transport (*mer T* a *mer P*), regulaci (*mer R* a *mer D*) a redukci (*mer A* a *mer B*). Mezi další pomocné operony řadíme též *mer C* a *mer F*, které jsou zakotveny v membránových bílkovinách a pomáhají při transportu, *mer G*, který zajišťuje odolnost buňky proti fenylrtuti a *mer E* a *mer H*, které jako další membránové specifické proteiny pomáhají v transportu rtuti v buňce bakterie (Sasaki a kol., 2005). Transkripce operonů je vyvolána přítomností rtuti v buňce (Misra, 1992).

Obr. 2. Model rozmístění *mer* operonů v buňce gram negativní bakterie (Barkay a kol., 2003).



### 3.5.2. Detoxikace pomocí mer operonů

Bakterie se obvykle vyznačují velkou diverzitou ve struktuře mer operonů, obecně však existují základní modely rozmístění operonů v jejich buňce (obrázek 2), tzv. úzké spektrum, které se vyznačuje resistencí proti anorganickým formám rtuti a široké spektrum odolávající jak anorganickým tak organickým formám tohoto kovu (Barkay a kol., 2003). Počáteční výzkum remediace rtuti pomocí mikroorganismů byl zaměřen na redukci anorganické  $\text{Hg}^{2+}$  na méně toxickou, inertní a těkavou formu  $\text{Hg}^0$  pomocí systému úzkého spektra uvnitř bakteriální buňky. Operony v systému širokého spektra se sestávají z genů vykazujících dvě hlavní funkce, transport  $\text{Hg}^{2+}$  do buňky za účasti proteinů ve kterých se vyskytují mer operony P a T a enzymatickou přeměnu  $\text{Hg}^{2+}$ , závislou na NADPH, na elementární formu  $\text{Hg}^0$  (Silver a Phung, 1996). Studie ukázaly, že je mer P dohromady s mer T více efektivní v zachycení a následné volatilizaci iontové  $\text{Hg}^{2+}$  než gen mer T samotný. Transport začíná, když se  $\text{Hg}^{2+}$  zachytne na residuích cysteinu v bílkovině kódované mer P genem v periplasmu. Z residuí cysteinu mer P bílkoviny je iontová forma rtuti převedena do residuí cysteinu zabudovaných v membráně, které jsou uloženy v mer T genu. Odtud je přímo převedena na thiolové skupiny zakódované v mer A genu, zde dojde k redukci  $\text{Hg}^{2+}$  (Benison a kol., 2004). Přenos  $\text{Hg}^{2+}$  z thiolové skupiny na cystein probíhá pomocí redoxního výměnného mechanismu. V konečné fázi je redukce katalyzována pomocí FAD (flavin adenin dinukleotidu) za současného uvolnění NADPH (Hajela a kol., 2002). Detoxifikace organické rtuti vyžaduje jeden krok navíc a to odštěpení rtuti od zbytku uhlíkatého řetězce pomocí enzymu kódovaným mer B genem, tzv. lyázou organické rtuti. Tento resistenční systém spadá do tzv. širokého spektra a je schopno transformovat jak organickou tak i anorganickou rtuť. Bakterie si vyvinuly dvouenzymatickou detoxifikační strategii pro přeměnu organické rtuti na méně toxické formy a následně až na těkavou formu  $\text{Hg}^0$ . V rámci tohoto postupu je prvním krokem protolytické štěpení, které je katalyzované lyasou, ze kterého vznikne iontová rtuť a alkylový zbytek za současného působení cysteinových residuí (Pitts a Summers, 2002). Lyasa je podporována funkcí thiolů, glutathionu a cysteinu a zároveň je striktně inhibována dithiolem. V druhém kroku dochází k redukci anorganické  $\text{Hg}^{2+}$  na  $\text{Hg}^0$  za současné oxidace koenzymu NADPH (Murtaza a kol., 2002).

### 3.5.3. Bakterie použité při remediaci

Odstranění rtuti z kontaminovaných míst je velká výzva pro nakládání s životním prostředím. Pro remediaci prostředí byly užity různé metody, nejčastěji biosorbenty, které



jsou však velice citlivé na podmínky životního prostředí (Wang a Chen, 2009). Jako nejvhodnější konvenční metody se jeví chemické srážení, koagulace, adsorpce na aktivované uhlí, adsorpce na přírodní materiály, výměna iontů a reversní osmóza. Bioremediační techniky zahrnující použití mikroorganismů k odstranění kontaminantů z prostředí byly v poslední době intenzivně zkoumány. Mikroorganismy se staly vedle klasických konvenčních metod další variantou k omezení toxicity rtuti z prostředí. Pro posílení jejich účinku byly navrženy různé genetické modifikace, jako například zvýšení počtu transformovaných bílkovin mer operony (Palmer, 2001). Použití bakterií pro čištění životního prostředí se jeví jako velmi výhodná metoda, nicméně problém je, že vzniká velké množství odpadní biomasy obsahující odstraněný kontaminant, jejíž skladování je značně problematické. Mikroorganismy, které se užívají při bioremediaci by měly mít značně vyvinutý mechanismus zabraňující poškození buňky (Cursino a kol., 2000). Bakterie by zároveň měly být schopné kov zpracovávat, což znamená jeho bioabsorpci, vnitrobuněčnou asimilaci, imobilizaci, tvorbu komplexů, srážení a nakonec jeho opětovné vypuštění do prostředí. V případě rtuti pak dochází k tomu, že je  $Hg^{2+}$  redukován na  $Hg^0$  (jak bylo výše popsáno), která pak pasivně vytěká pryč z buňky bez jakékoliv energetické ztráty (Dash a Das, 2012). Mikrobiální biomasa tedy funguje jako katalyzátor bez akumulace většího množství kontaminované biomasy. Tato bioremediační metoda se jeví jako slibná, ale byla zatím testována jen v laboratorních podmínkách. Jako vhodné organismy byly popsány například *Deinococcus geothermalis*, *Cupriavidus metallidurans*, *Enterobacter cloacae*, *Alkaligenes faecalis*, a *Pseudomonas putina*, který je schopný volatilizovat až 89% rtuti z okolního prostředí (Zhang a kol., 2012; Glick, 2003).

## 4. Metodika

### 4.1. Půdní vzorky a popis lokality

Zemina byla odebrána v blízkosti bývalého mlýna v obci Trhové Dušníky na Příbramsku ve dvou fázích, místa odběru znázorňuje obrázek 3. Poprvé na jaře roku 2013, podruhé v létě téhož roku. V tomto mlýně se mimo jiné provádělo i moření osiva pomocí chloridu fenylrtuťnatého. Moření bylo zakázáno v 80. letech, ale kontaminace zde stále přetrvává. Půdy v okolí Příbrami jsou silně kontaminované rizikovými prvky z různých zdrojů, například hutnictví, důlní činností atp. Důlní a hutní činnosti v této oblasti mají současně vliv na zastoupení dalších prvků v půdě, především As, Cd a Zn. Vysoký obsah rizikových prvků v půdě je umocněn i jejich zvýšeným obsahem v geologickém podloží. Kromě bezprostředního okolí zdroje znečištění (Kovohutě Příbram, a. s.) se vyskytuje vyšší koncentrace některých nežádoucích prvků i v naplaveninách v povodí Litavky, kde byly v dřívějších dobách soustředěny proplachovny rud (Šichorová a kol., 2004; Borůvka a kol., 1996; Rieuwerts a Farago, 1996). Zvýšené obsahy rtuti v půdách v důsledku hutní činnosti byly v této oblasti také zaznamenány, ale tato problematika je zde prozkoumána mnohem méně intenzivně ve srovnání s ostatními uvedenými prvky (Ettler a kol., 2007). Na území Příbramska se nacházejí zejména hlinité až písčité kambizemě, v okolí Litavky potom fluvizemě. Vzorky byly odebrány v různých místech dané lokality v množství cca 20 kg. Odebraná zemina byla v laboratorních podmínkách přesáta přes síto o velikosti ok 2 mm a navlhčena na 60% maximální vodní kapacity. Takto upravenou zeminou se plnily rhizoboxy.

Obr. 3, Mapa s místy odběru.

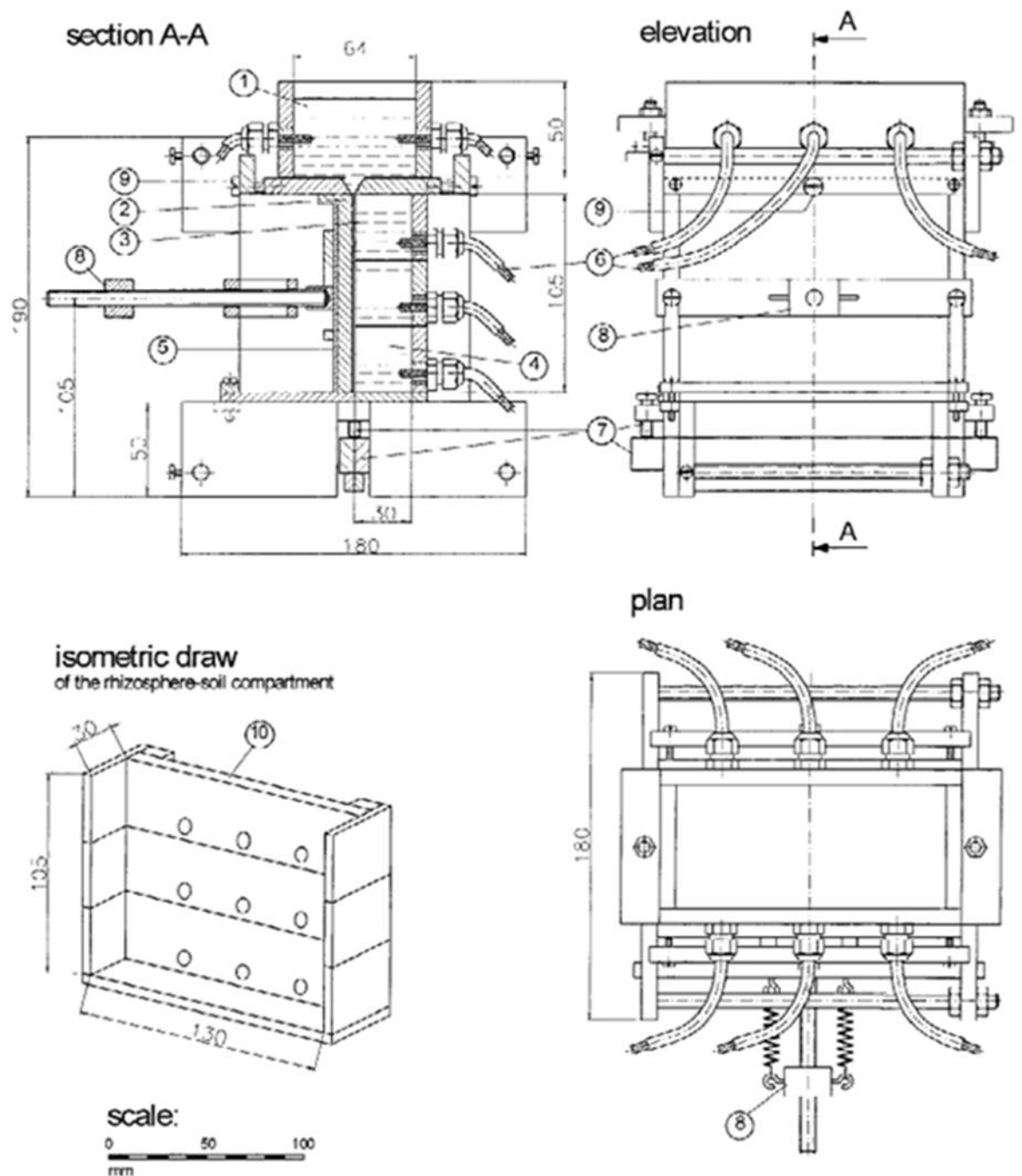


## 4.2. Založení pokusů

V obou případech bylo sestaveno 6 rhizoboxů, které byly po dobu tří týdnů obaleny hliníkovou fólií a uchovávány při konstantní teplotě cca 21°C. Konstrukce rhizoboxu byla převzata od (Wenzel a kol., 2001, obrázek 4). Systém se skládá ze svrchní půdní části pro růst rostlin, která má na svém dně podélnou mezeru, kterou mohou vertikálně prorůst kořeny rostlin do průhledné akrylové půdní části, ke které je z druhé strany připojena membrána zabraňující dalšímu růstu kořenů. Tato membrána má za úkol separovat kořeny a od rhizosféry. Jakmile je rhizosferní část s membránou fixována, je akrylová kořenová část schopna se horizontálně posunout v závislosti tlaku způsobeným růstem kořenů. Takto vytvořený tlak mezi akrylovým oknem a membránou je možné korigovat posuvným šroubem, který zároveň poskytuje mechanický odpor shodný s přírodními podmínkami. Tento design umožňuje oddělení kořenů samotných a půdní rhizosferní části. Zároveň je možné monitorovat fotografováním růst kořenů, jejich distribuci a morfologii. Po ukončení experimentů, nejčastěji po průrostu kořenů šterbinou z vrchní kořenové části, je možné zeminu rozdělit na vrstvy o velikosti <math><0,5-1\text{mm}</math>. Alternativně může být půdní část vyplněna mikroelektrodami měřícími pH a redox potenciál v různých vzdálenostech od kořenů rostlin. Půdní část je napojena na zavlažování pomocí knotů, které jsou na jedné straně připevněny do rhizoboxů a druhá je uložena ve sklenici s vodou. Všechny součásti rhizoboxu jsou vyrobeny tak, aby minimalizovaly reakci s kovy a organickými materiály.

V rámci našeho pokusu jsme pro monitoring použili stejný design rhizoboxů, avšak jsme nepoužívali pro monitoring rostliny. Na akrylovou destičku, která přiléhá k membráně, byla aplikována tenká vrstva agaru, která byla naočkována organismy *Paenibacillus alginolyticus*, *Burkholderia glathei*, *Burkholderia sp.* a *Pseudomonas sp.* na odborném pracovišti ekologie na Mikrobiologickém ústavu AV ČR. Zvolené organismy byly získány z kontaminované půdy z oblasti Příbramska a ve srovnání s jinými vykazovaly nejvyšší toleranci ke zvýšeným obsahům Hg v půdě. Pokus probíhal po dobu 3 měsíců při teplotě 20°C, přičemž dolní část rhizoboxu včetně agarové vrstvy byla zakryta hliníkovou fólií. Po skončení pokusu byla agarová vrstva odebrána a lyofilizována, půda přiléhající k membráně byla rozřezána na 6 segmentů o tloušťce 1 mm pomocí zařízení, které zkonstruovali Fitz a kol., (2003). Dále byl odebrán reprezentativní vzorek okolní půdy ze svrchní i spodní části rhizoboxu. Před analýzami byla půda mletím a důkladným promícháním homogenizována a lyofilizována.

Obr. 4, Schéma a rozměry rhizoboxu dle Wenzel a kol. (2001); 1) horní díl pro růst rostlin; 2) průhledné akrylové okno; 3) nylonová membrána; 4) rhizosférní půdní díl; 5) odjímatelný neprůhledný kryt transparentního akrylového okna; 6) zavlažovací knoty (průměr 4 mm); 7) membránová svorka; 8) svorka na průhledné akrylové okno; 9) nastavitelný šroub k regulaci šíře mezery pro růst kořenů mezi akrylovým oknem a membránou; 10) zadní část spodního rhizosférního komponentu



### **4.3. Metody jednoduché a postupné extrakce**

#### **4.3.1. Extrakce kyselinou octovou**

Potenciální biologická dostupnost rtuti z půdy může být stanovena různými extrakčními metodami, které se liší podle užitého extrakčního činidla, jeho koncentrace, množství a času po kterou samotná extrakce probíhá, v našem případě byla užitá 0,11 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Pomocí této metody je možno určit množství jednotlivých prvků v půdě, jejich biologickou dostupnost a míru toxicity (Rodrigues a kol., 2010). Použití zředěné  $\text{CH}_3\text{COOH}$  jako extrakčního činidla patří mezi metody popisující přibližné složení půdního roztoku (Novozamsky a kol., 1993). Bylo naváženo 0,5 g půdního vzorku, které bylo přidáno k 10 ml 0,11 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , celý vzorek byl takto přes noc protřepáván. V dalším kroku byly vzorky po 10 minut centrifugovány na rychlosti 3000 otáček za minutu a uchovány při 4°C až do doby měření.

#### **4.3.2. Postupná extrakce**

Metody postupné extrakce napomáhají k odhadu zastoupení prvků v jednotlivých složkách půdy a tím i k přibližnému odhadu jejich potenciální uvolnitelnosti do dalších složek životního prostředí (Bacon a Davison, 2008). Tento postup byl proveden ve spolupráci s Ústavem chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Z každého vzorku bylo naváženo 0,1 g a bylo vyluhováno v chloroformu, 3 hodiny třepáno a nakonec centrifugováno. Tento krok byl označen jako nultý, v supernatantu byl stanoven obsah Hg a pevný zbytek byl užit pro všechny následující extrakce. Poměr navážka/objem byl stejný pro všechny varianty. Následoval krok č. 1, s redestilovanou vodou, takto se prokazovala rtuť uvolnitelná vodou, krok č. 2 byl proveden s 0,5 M HCl, forma rtuti uvolnitelná v kyselém prostředí. Dalším reaktantem byl 0,2 M KOH, který extrahoval rtuť vázanou na humínové látky. 4. reaktantem byla 50%  $\text{HNO}_3$  prokazující elementární rtuť a amalgámy, a krok č. 5 residuální rtuť (Bloom a kol., 2003; Boszke a kol., 2008; Coufalík a kol., 2012). Celkový čas procesu extrakce byl 18 hodin.

#### **4.3.3. Stanovení obsahu rtuti v pevných vzorcích a extraktech**

Stanovení celkového obsahu rtuti ve vzorku se v laboratorních podmínkách měří na atomovém absorpčním spektrometru AMA 254 (Advanced Mercury Analyser, LECO model,

Altec, ČR). Vlastní stanovení probíhá následovně: Vzorek o známé navážce (podle povahy analyzovaného vzorku 50 – 300 mg) či objemu (do 500  $\mu$ l) se vloží do spalovací lodičky a je zaveden do spalovací trubice, kde je vysušen a spálen v proudu kyslíku. Rozkladné produkty pak postupují přes katalyzátor, kde se dokončí oxidace a zachytí se některé produkty spalování, a dále přes amalgamátor, kde se selektivně zachytí rtuť. Rtuť z amalgamátoru je uvolněna krátkodobým ohřevem a je nosným plynem vedena nejprve do delší měřicí kyvety a poté přes zpoždovací nádobku do kratší měřicí kyvety. Stejně množství rtuti se tedy měří dvakrát s odlišnou citlivostí (celkový dynamický rozsah se udává v rozmezí 0,05 – 600 ng Hg) (Synek a kol., 2000). V našem případě jsme navažovali v každém opakování 5 mg vzorku, neboť jsme očekávali extrémně vysoké množství rtuti. Počet opakování měření každého vzorku byl 2, pokud byly výsledky výrazně odlišné, provádělo se 3. kontrolní měření. Tento postup byl aplikován i pro stanovení obsahu Hg v extraktech získaných metodou postupné extrakce. V případě agaru s nakultivovanými mikroorganismy bylo postupováno následovně: Veškerý agar byl rozpuštěn v 6 M HCl (třepačka 250 RPM, 18 hodin) a obsah rtuti měřen v roztoku na AMA-254,  $n = 3$ . Před měřením byly roztoky ředěny vodou 2:1. Obsah rtuti v extraktech s použitím 0,11 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  byl měřen metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS, Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA). Pro vyhodnocení signálu byl využit izotop Hg(202) a jako interní standard byl použit izotop Pt(195) o koncentraci 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Šípková a kol., 2014).

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. Celkové obsahy Hg a pH půdy ve sledované lokalitě

Tab. 1, naměřené pH půdy při odběru a celkové obsahy Hg (mg/kg).

vzorek	pH	Hg
1	5,38±0,01	2,11±0,033
2	3,88±0,00	0,849±0,002
3	7,46±0,01	1,93±0,014
4	6,00±0,04	1,34±0,061
5	6,95±0,02	1,33±0,046
6	7,33±0,02	1,08±0,063
7	6,64±0,01	1,43±0,038
8	6,65±0,00	1,14±0,023
9	6,63±0,01	1,04±0,022
10	6,67±0,00	1,56±0,027
11	7,15±0,02	0,887±0,045
12	7,09±0,00	3,86±0,135
13	6,15±0,02	0,974±0,012
14	5,79±0,00	2,50±0,057
15	6,34±0,00	9,76±0,003
16	7,02±0,02	1,10±0,020

Dle vyhlášky Ministerstva životního prostředí č. 13/1994 jsou limitní obsahy rtuti v půdách 0,8 mg/kg. Je tedy zřejmé, že v našem případě došlo k překročení tohoto limitu ve všech sledovaných odběrových místech. V každém z míst odběru bylo změřeno pH, výsledky jsou zaznamenány v tabulce 1. To dosahovalo nejnižších hodnot v druhém vzorku a to 3,88. Jeho nejvyšší hodnota byla změřena 7,46 ve 3. místě odběru. Průměrně se jeho hodnota pohybovala kolem 6,46. Ettler a kol., (2007) popisují, že úměrně se snižujícím se pH roste mobilita rizikových prvků včetně rtuti.

## 5.2.Ostatní prvky

Tab. 2, Pseudocelkové obsahy dalších rizikových prvků na dané lokalitě (mg/kg)

	As	Co	Cd	Cr	Cu	Mo	Ni	Pb	V	Zn
minimum	32,0	7,27	3,64	19,7	24,5	0,73	10,5	387	36,9	224
maximum	864	30,6	55,7	81,8	229	9,54	62,7	8045	193	5165
průměr	219	18,0	20,6	43,8	75,9	3,07	28,2	1947	83,8	1862
špičatost	2,6	-0,10	1,05	0,23	3,77	2,00	1,59	3,33	2,77	1,02
šikmost	1,9	0,32	1,30	0,66	1,59	1,54	1,14	1,99	1,56	1,21
směr od, odchylka	246	5,61	14,53	14,9	42,9	2,22	11,7	1986	35,8	1339
median	137	17,1	17,4	39,9	67,6	2,81	25,4	1309	76,7	1750
MAD*	59,7	4,01	6,52	9,76	22,4	1,00	7,01	592	19,1	698

\*median absolutních odchylek

Tabulka 2 shrnující pseudocelkové obsahy rizikových prvků dokumentuje, že daná lokalita je významně kontaminována i dalšími rizikovými prvky. Dle vyhlášky Ministerstva životního prostředí č. 13/1994 jsou limitní obsahy prvků v půdách následující: arsen 30,0 mg/kg, kadmium 1,0 mg/kg, kobalt 50 mg/kg, chrom 100 mg/kg, měď 100 mg/kg, molybden 5,0 mg/kg, nikl 80 mg/kg, olovo 140 mg/kg, vanad 220 mg/kg, zinek 200 mg/kg. Je tedy zřejmé, že pouze v případě Co, Cr, Ni a V nedošlo k překročení těchto limitů. Extrémně vysoké hodnoty byly nalezeny zejména v případě Cd, Pb a Zn. Výsledky také i v tomto případě ukazují značnou variabilitu obsahů jednotlivých prvků na dané lokalitě.

Massas a kol., (2013) zkoumali množství vybraných rizikových prvků v aluviálních půdách v Řecku. Místa odběru vzorků byla vybrána tak, aby byla různě vzdálená od možných bodů kontaminace. Zároveň se vzorky odebíraly z půd s různou možností využití, tedy ze zemědělských stanovišť a zároveň z půd s jiným než zemědělským určením. Množství zinku se pohybovalo v rozmezí 76,5 – 690,8 mg/kg, průměrné množství olova autoři zjistili jako 129,1 mg/kg, manganu 339,8 mg/kg a železo se pohybovalo v rozmezí 7 – 24,5 mg/kg. Autoři výsledné hodnoty okomentovali jako průměrné. Burt a kol. (2014) zkoumali změnu množství rizikových prvků ve vybraných částech New Yorku v čase. V Roce 1999 bylo na území Pelhalm Bay a Van Cortland naměřeno množství kadmia v rozmezí 0,3 – 0,5 mg/kg, olova 131 – 233 mg/kg a zinku 66 – 101 mg/kg. Ve stejných lokalitách probíhalo měření v roce 2013. Kadmium bylo změřeno v množství 0,3 – 1 mg/kg, olovo vzrostlo až k horní hranici 483 mg/kg. Množství zinku se téměř v čase nezměnilo, pohybovalo se v rozmezí 80 – 104 mg/kg. Nárůst množství olova autoři připisují rozšíření průmyslu v místech měření. Lokalita



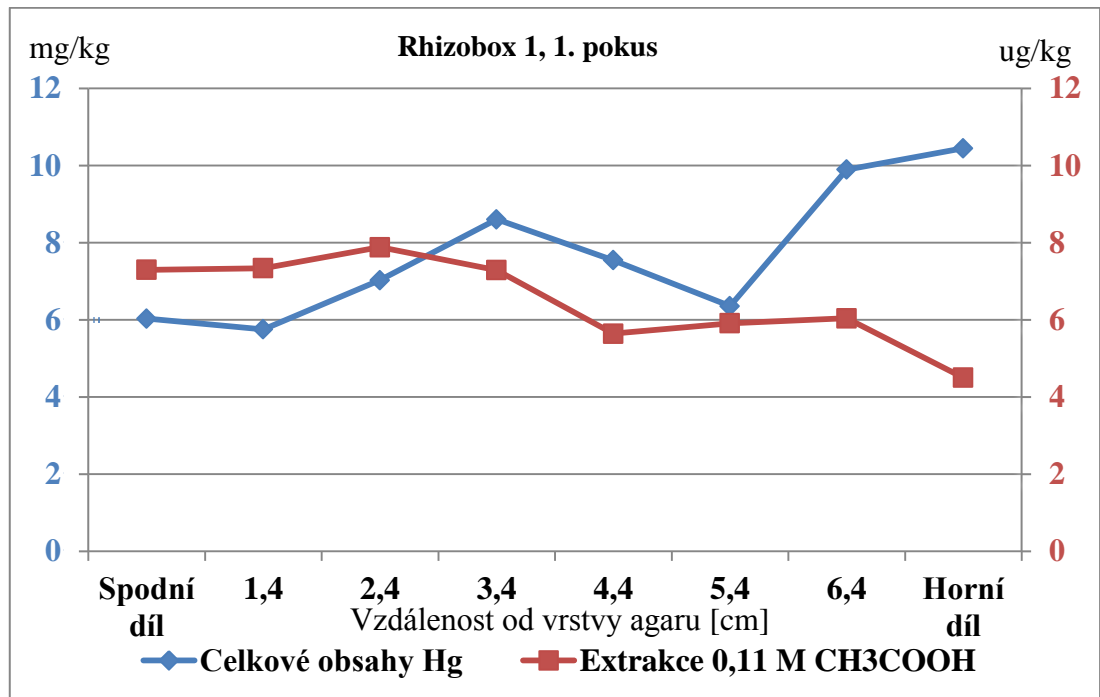
Mission – Progresso v Texasu byla zkoumána autory Hanna a Tanguma (2012). Množství změřeného zinku v dané lokalitě se napříč čtyřmi půdními vzorky pohybovalo v rozmezí 59,2-111,2 mg/kg, manganu 257 – 397 mg/kg. Yaylali-Abanuz. (2011) měřili množství rizikových prvků v průmyslových lokalitách v Turecku. Autoři naměřili maximální množství kadmia až 176 mg/kg, olova 8469mg/kg a zinku 10 000 mg/kg. Tyto hodnoty se svou velikostí nejvíce blíží námi změřeným hodnotám. Li a kol. (2013) zkoumali půdu na území se silným industriálním vlivem na různých územích v severní Číně. Autoři naměřili množství olova v rozmezí 1,90 – 940 mg/kg, zinku 25 – 1140 mg/kg a kadmia 0,01 – 9,64 mg/kg. Sun a kol. (2010) měřili množství rtuti na území města Shenyang. Hodnoty olova a zinku se nacházely pod limitní hranicí stanovenou Ministerstvem životního prostředí č. 13/1994. Oproti těmto poznatkům bylo autory naměřeno kadmium až ve výši 266 mg/kg a to v industriální oblasti.

### **5.3.Celkové a mobilní obsahy rtuti v půdě závislé na vzdálenosti od agarové vrstvy**

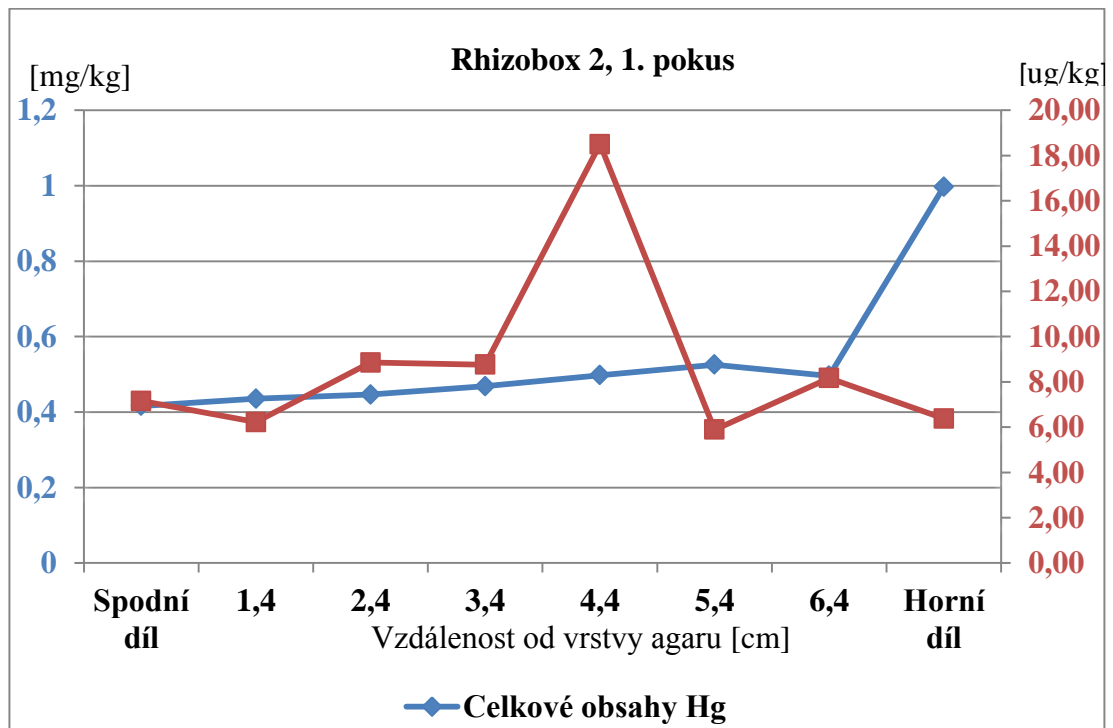
Celkové obsahy rtuti v půdním vzorku byly v rámci 1. pokusu v mnohem nižší než v pokusu 2. S výjimkou 1. rhizoboxu, který se hodnotově absolutně vymykal, byly hodnoty změřeny v rozmezí 0,38 – 3,95 mg/kg. Celkový obsah rtuti v 2. pokusu byl koncentračně vyrovnaný, obecně se změřila vyšší koncentrace celkové rtuti ve vzorku. Ta se pohybovala v rozmezí 2,5 – 8,74 mg/kg. Rtuť extrahovaná 0,11 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  v prvním pokusu vykazovala velmi vyrovnané koncentrace ve všech měřeních. Obecně se její koncentrace pohybovala v rozmezí hodnot 5,58 – 33,7 ug/kg, průměr všech naměřených hodnot je 13,7 ug/kg. Ve druhém opakování naopak hodnoty vykazovaly vysokou míru variability. V rámci jednotlivých vrstev se lišili až ve stovkách ug/kg. Škála hodnot zde byla velmi široká, pohybovala se v rozmezí od hodnot pod mezí detekce až do 298 ug/kg. Výsledky dokumentují mimořádně velkou variabilitu celkových i mobilních obsahů rtuti v půdách ze sledované lokality. Vzájemné porovnání výsledků a jejich jednoznačná interpretace jsou tedy velmi obtížné.

### 5.3.1. Výsledky 1. pokusu

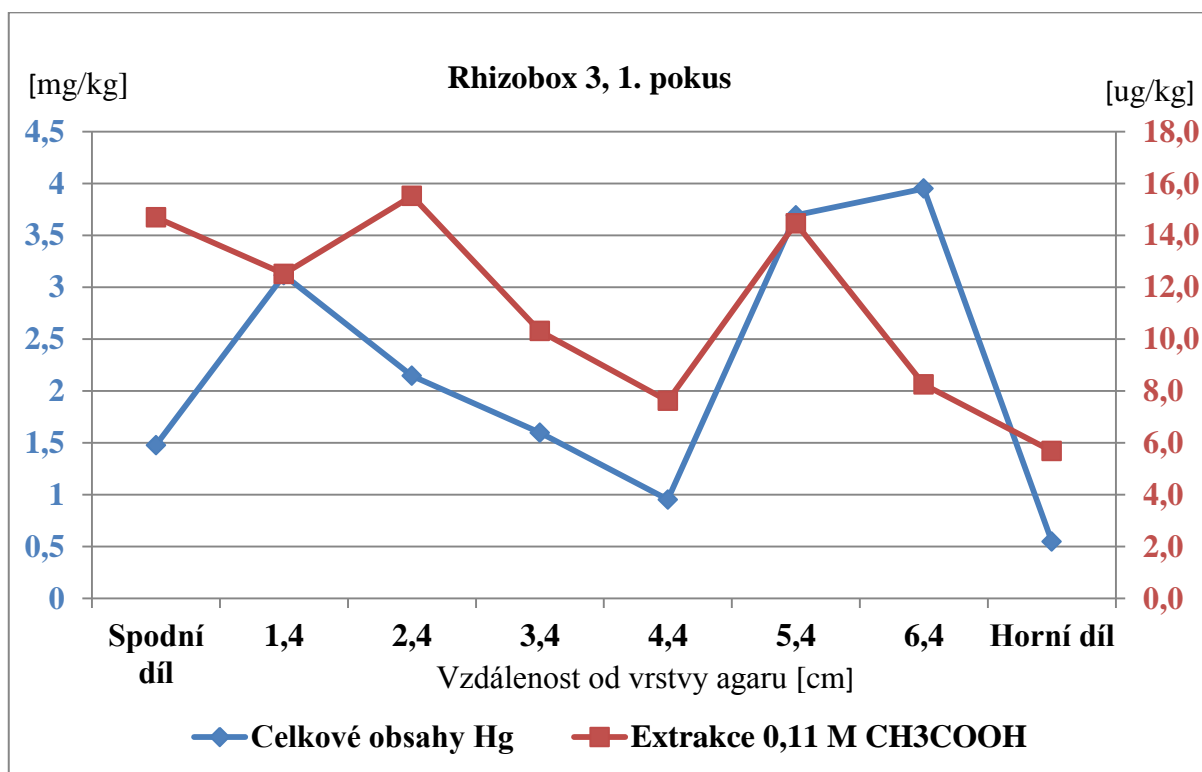
Graf 1, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 1



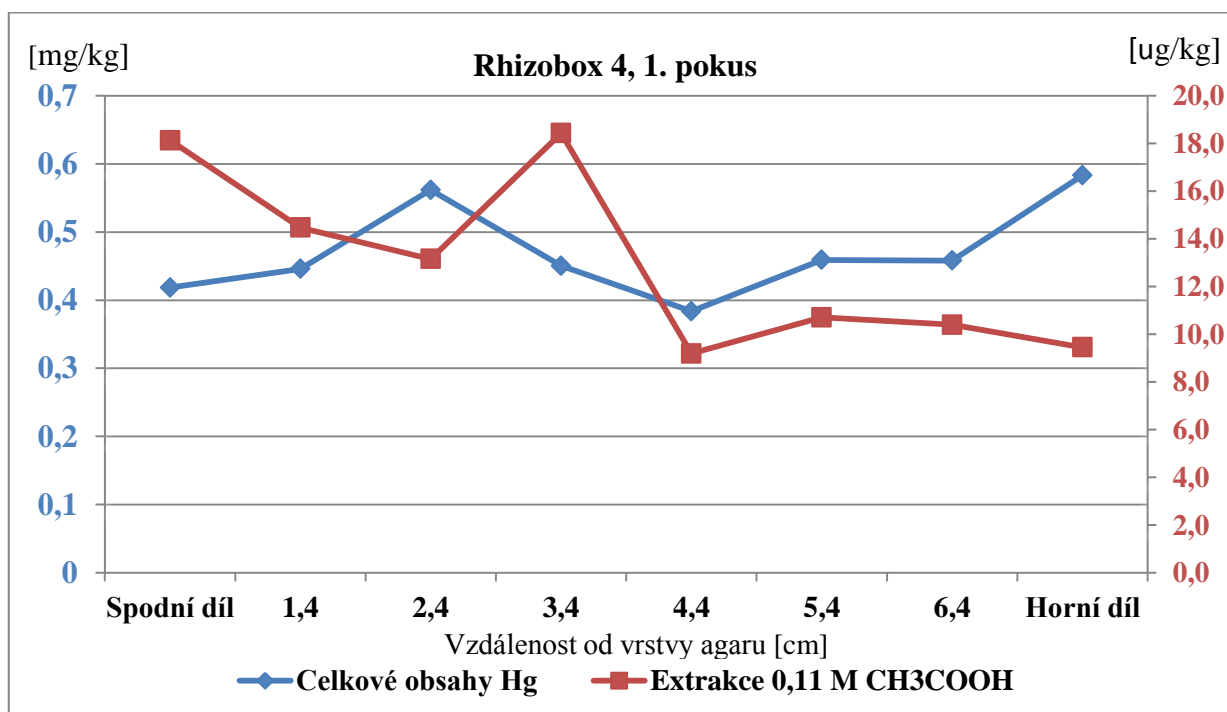
Graf 2, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 2.



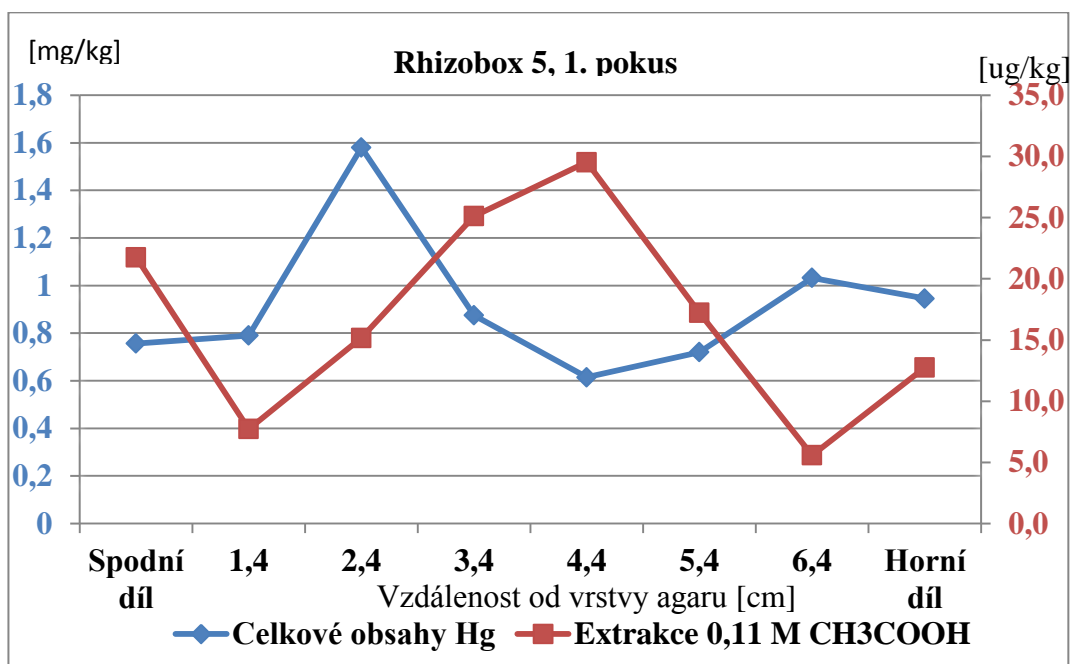
Graf 3, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 3.



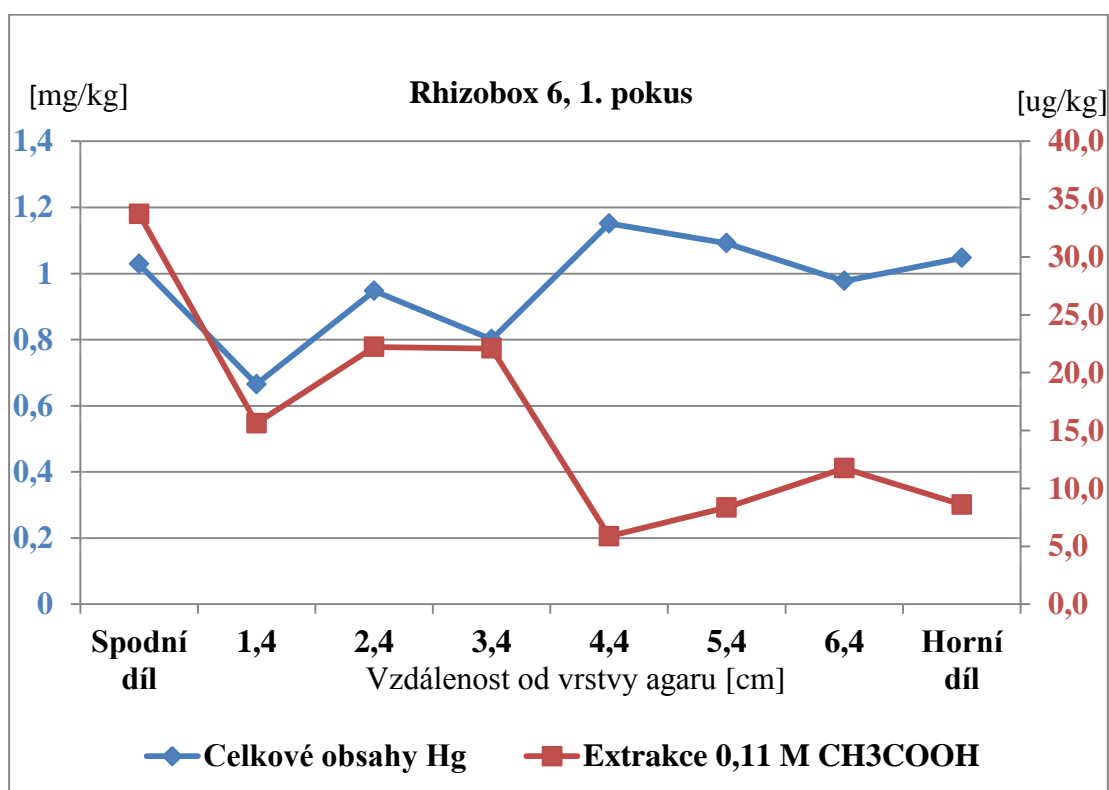
Graf 4, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 4.



Graf 5, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 5.



Graf 6, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 6.



Hodnoty celkové rtuti v 1. rhizoboxu byly změřeny v úzkém rozpětí hodnot, 4,51-10,4 mg/kg. Lze zde sledovat tendenci příbytku koncentrace rtuti směrem do hloubky zeminy a poté v horním dílu. Půda, která byla po dobu pokusu v těsném kontaktu s mikroorganismy, dosahuje nejnižší hodnoty. Naopak nejvyšší hodnota byla změřena v horním díle. Jelikož je to jediné místo kontaktu zeminy a okolního vzduchu, je možné, že se zde koncentrovala rtuť přecházející z půdy do prostředí. Hodnoty vymykající se lineárnímu růstu křivky se nachází v hloubce 4,4 a 5,4 cm od agarové vrstvy, kdy koncentrace klesla téměř na nejnižší hodnotu, odtud však opět strmě přibývá. Opačný vývojový trend od křivky celkových hodnot rtuti lze vyzorovat u rtuti extrahovatelné 0,11 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Její nejvyšší hodnoty se nacházejí v přímém kontaktu s agarovou vrstvou, směrem do hloubky od zóny kontaktu její koncentrace klesá.

V druhém rhizoboxu lze sledovat podobnou liniovou tendenci jako v případě prvního rhizoboxu. Celková koncentrace se směrem od inokulovaných mikroorganismů v agarové vrstvě zvyšovala lineárně, její koncentrace byla výrazně vyšší v případě půdy horního dílu. Celkově však byly naměřené hodnoty rtuti výrazně nižší než v případě prvního rhizoboxu, pohybovaly se v rozmezí 0,4 – 1 mg/kg, což je až desetkrát méně. Hodnota extrahovatelné rtuti kyselinou octovou se pohybovala v rozmezí 5,89 ug/kg (vrstva 5,4) až 18,50 ug/kg (vrstva 4,4). Zle říci, že tato forma stanovení rtuti se vyznačuje vysokou nejednoznačností a extrémností hodnot.

Celkové hodnoty rtuti se v 3. rhizoboxu pohybovaly v rozmezí 0,55 – 3,95 mg/kg. Nejnižší hodnota byla naměřena v horním dílu, nejvyšší ve vrstvě 6,4 cm od agarové vrstvy obsahující mikroorganismy. Její koncentrace se snižovala od vrstvy 1,4 cm až po 4,4 cm, odkud opět stoupala. Hodnota extrahovatelné rtuti kyselinou octovou až do vrstvy 4,4 cm od agarové vrstvy klesala, nejnižší koncentrace byla změřena v horním dílu, 5,7 ug/kg.

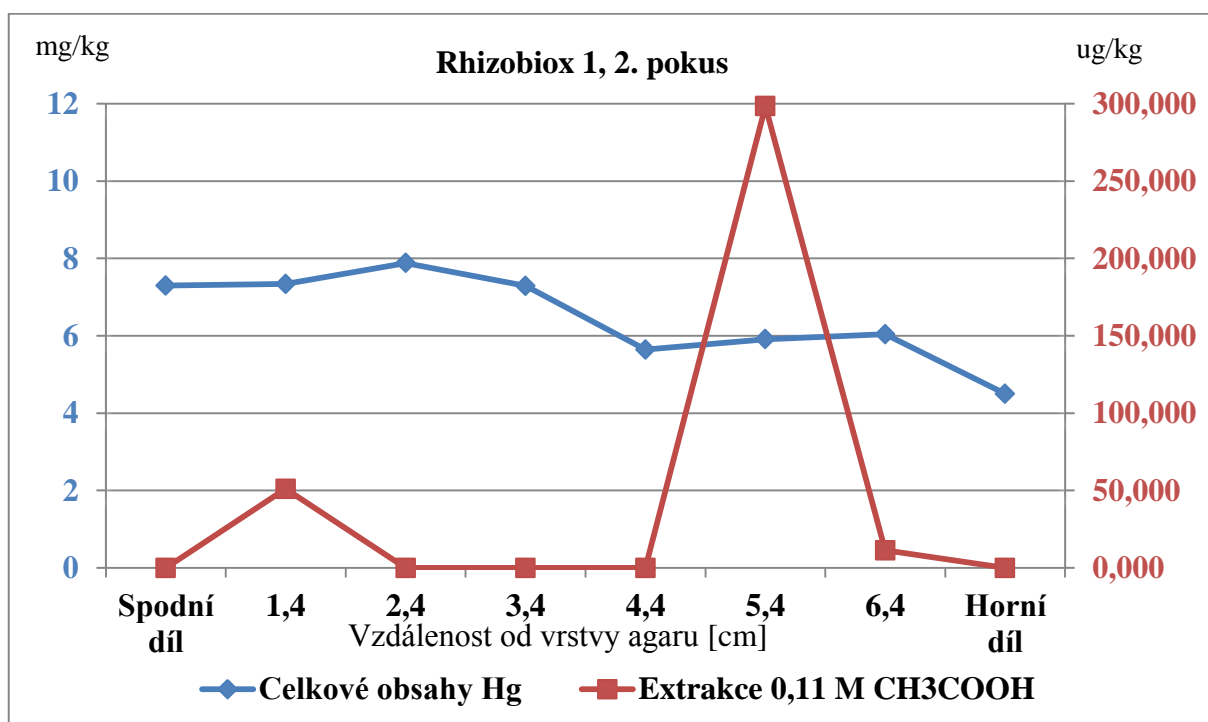
Křivka celkových obsahů rtuti ve 4. rhizoboxu vykazovala vzestupnou tendenci od spodního dílu k hornímu, ne však rovnoměrně. Zároveň dosahovala velmi nízkých hodnot oproti předchozím měřením. Její nejvyšší koncentrace byla změřena v hloubce 4,4 cm od agarové vrstvy a to 0,38 mg/kg, nejvyšší pak v horním díle a to 0,58 mg/kg. Křivka rtuti extrahovatelné kyselinou octovou měla opačnou tendenci. I zde bylo její koncentrace oproti předchozím měřením poměrně nízká. Z dosavadních výsledků lze usoudit, že pokud se v zemině vyskytuje nízká koncentrace celkové rtuti, je i její extrahovatelná koncentrace kyselinou octovou nízká a naopak. Nejvyšší koncentrace změřené rtuti se vyskytovala v hloubce 3,4 cm a to 18,4 ug/kg, odsud klesla až na nejnižší hodnotu 9,2 ug/kg ve vzdálenosti 4,4 cm, horní díl obsahoval 9,2 ug/kg.

V 5. rhizoboxu byla v porovnání s ostatními zjištěna poměrně nízká koncentrace z obou měření. Celková rtuť měřená na přístroji AMA 254 dosáhla hodnot 0,61 mg/kg ve vrstvě 4,4 cm od agarové vrstvy až 1,58 mg/kg ve vrstvě 2,4 cm. Hodnota rtuti je ve spodním dílu však celkově nižší než v horním. Rtuť extrahovatelná 0,11 M kyselinou octovou se pohybuje v rozmezí hodnot 5,6 ug/kg ve vrstvě 6,4 cm až po 29,5 ug/kg ve vrstvě 4,4 cm. Celkové koncentrace rtuti ve vzorku odebraném ze spodního dílu je vyšší než v dílu horním. Křivka tedy vykazuje opačnou tendenci než linie celkové rtuti v rámci tohoto rhizoboxu.

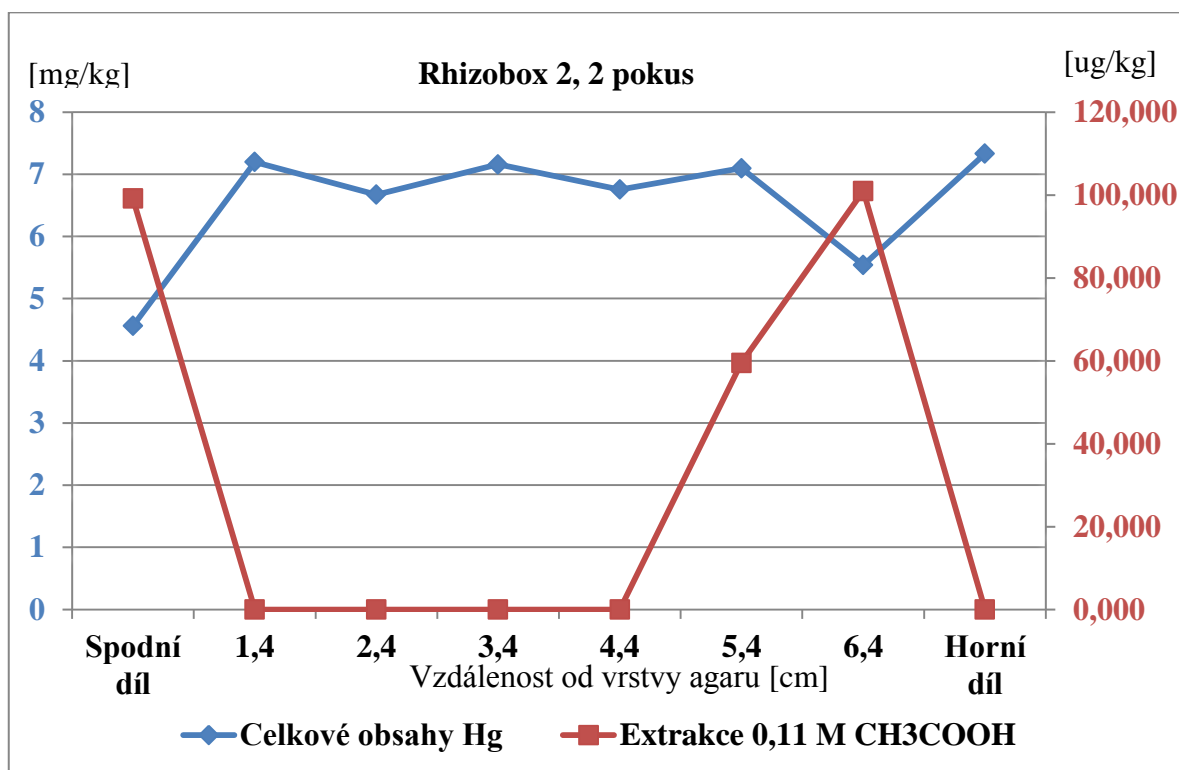
V 6. rhizoboxu byly zjištěny zajímavé výsledky, neboť je z grafu patrné, že celková koncentrace změřené rtuti se ve spodním a horním dílu liší pouze v rozmezí setin miligramu. Její nejnižší koncentrace byla změřena ve vrstvě 1,4 cm a to 0,67 mg/kg, nejvyšší ve vrstvě 4,4 cm a to 1,15 mg/kg. Koncentrace rtuti extrahovatelné kyselinou octovou se směrem od spodního dílu k hornímu rapidně snižuje. Ve spodním dílu byla její koncentrace 33,7 ug/kg, nejnižší 5,9 ug/kg ve vrstvě 4,4, v horním dílu 8,6 ug/kg. Při tomto vývoji lze spekulovat, zda koncentrace uvolněné rtuti byla mikroorganismy volatilizována.

### 5.3.2. Výsledky 2. pokusu

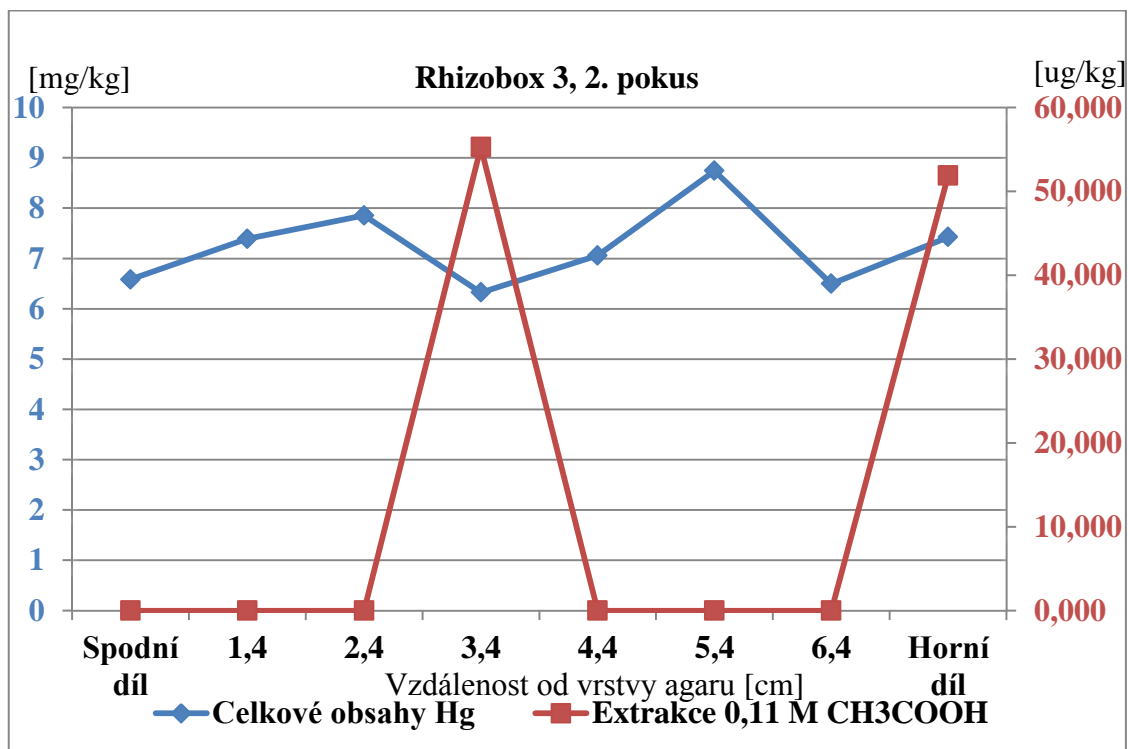
Graf 7, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 1.



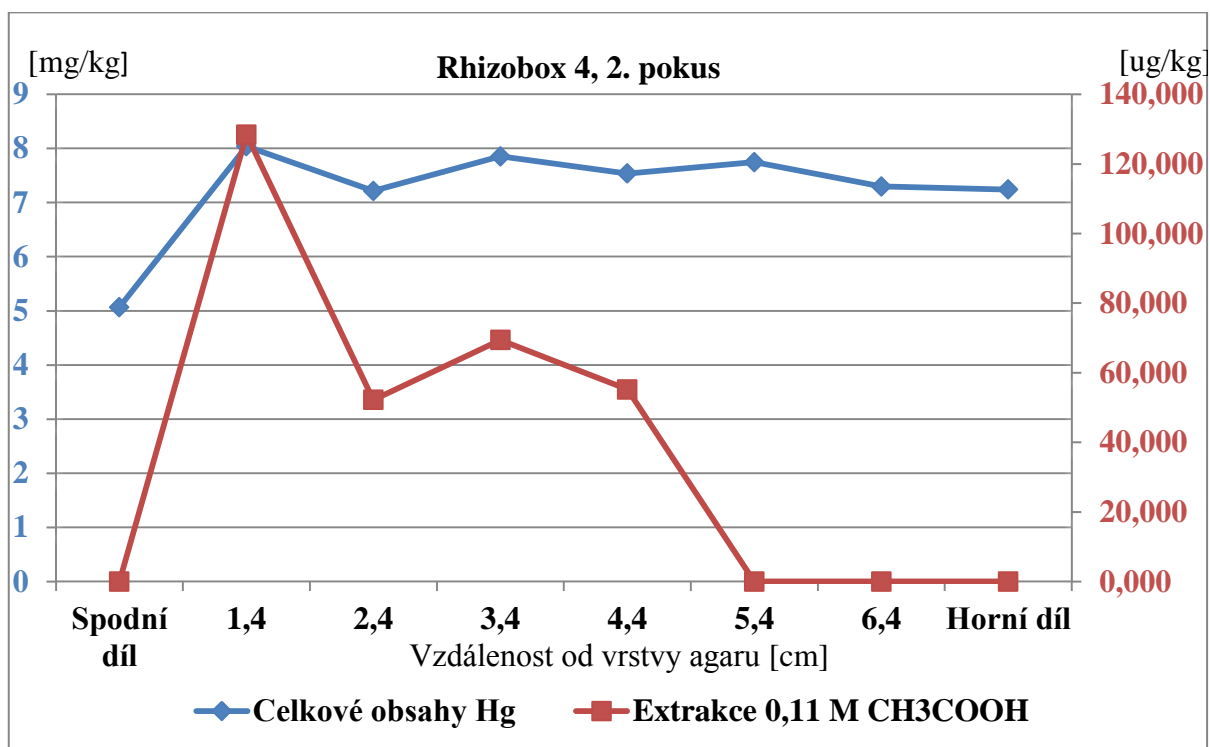
Graf 8, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 2.



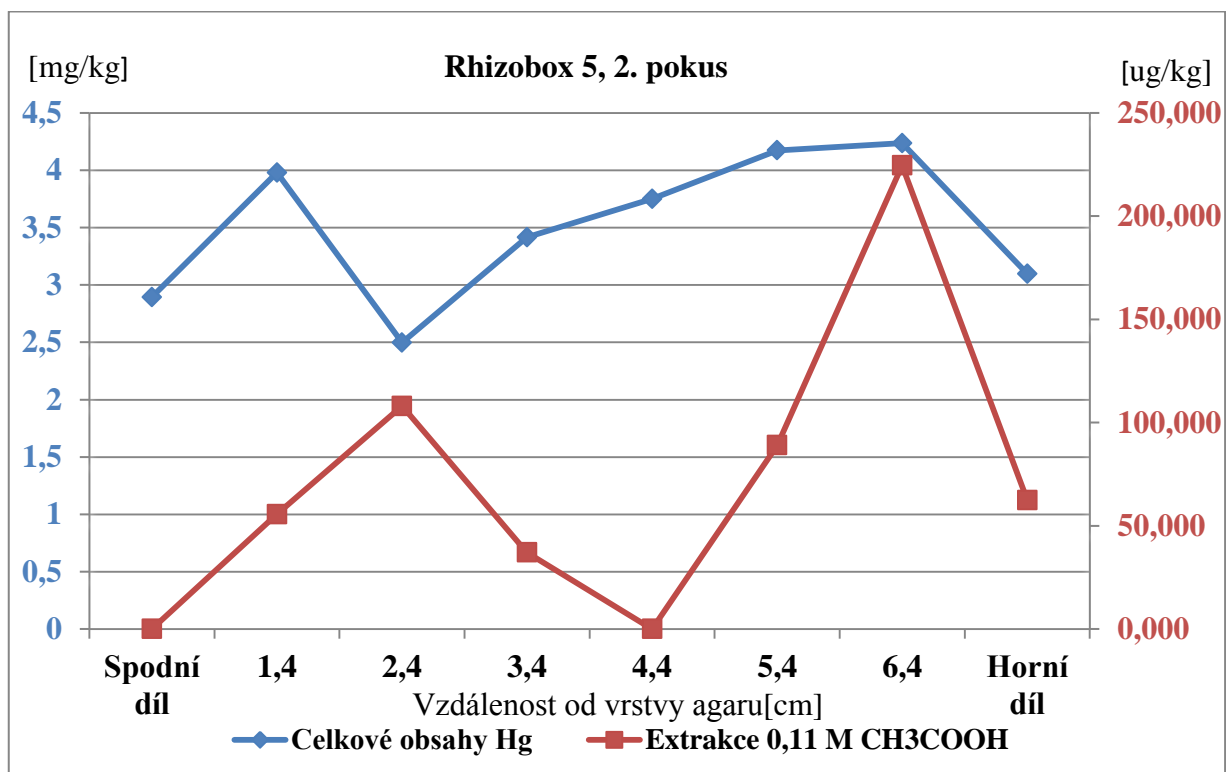
Graf 9, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 3.



Graf 10, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 4.

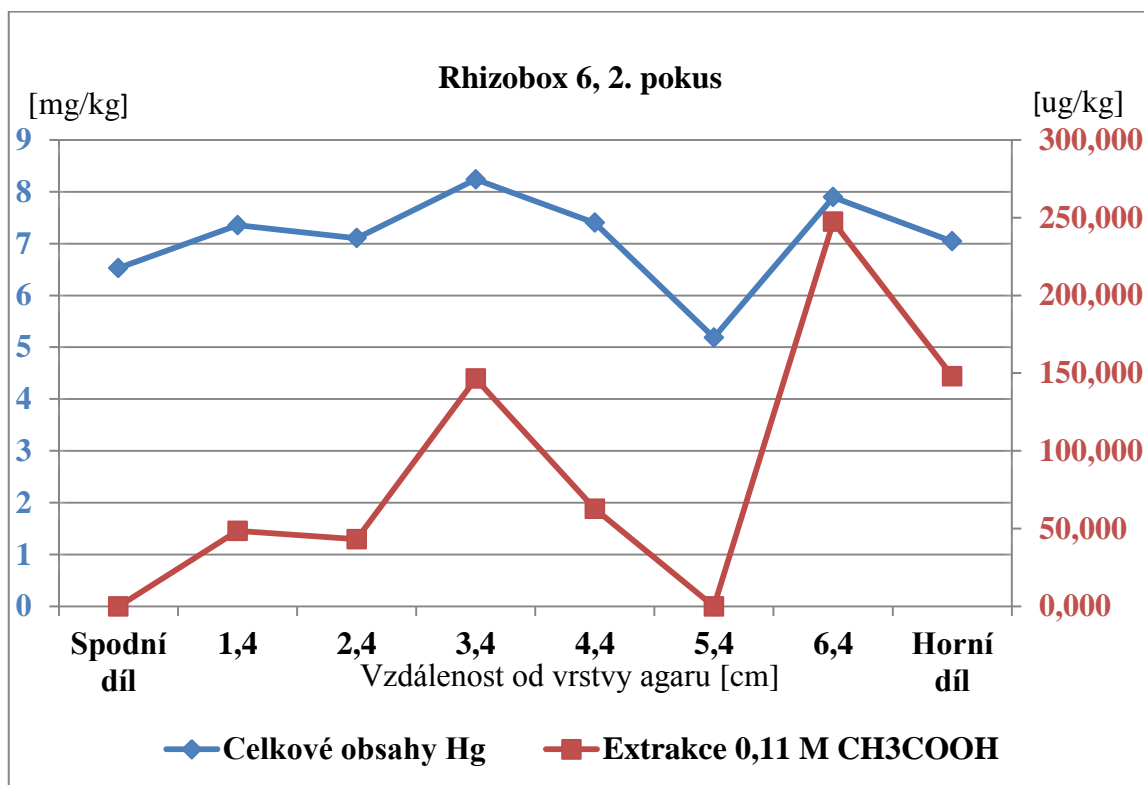


Graf 11, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 5.





Graf 12, Celkové obsahy rtuti a množství rtuti extrahované CH<sub>3</sub>COOH, rhizobox 6.



V 1. rhizoboxu byla nejvyšší koncentrace rtuti naměřena v místě kontaktu s agarovou vrstvou, směrem od ní se snižuje, nejnižší se nachází v horním dílu rhizoboxu. Celková koncentrace rtuti dosahuje podobných hodnot jako koncentrace rtuti v 1. pokusu. Výsledky byly zjištěny u extrakce rtuti kyselinou octovou. Ty se ve čtyřech případech z osmi nacházely pod hranicí detekce. V kontrastu s tím byla ve vzdálenosti 5,4 cm od agarové vrstvy naměřena její extrémní koncentrace, nejvyšší ze všech naměřených hodnot v rámci této extrakce. Hodnoty celkové rtuti v 2. rhizoboxu se pohybují v rozmezí 4,56 – 7,33 mg/kg. Mezi vrstvami 1,4 – 5,4 cm se její hodnota pohybuje kolem hranice 7 mg/kg. Jak je patrné z linie grafu, celkové koncentrace rtuti vzrůstají směrem od agarové vrstvy do hloubky. Výsledky extrakce rtuti kyselinou octovou vykazují značně extrémní hodnoty. Hodnoty pěti z osmi měření byly tak nízké, že se nacházely pod hranicí detekce. Zbylé tři naopak vykazovaly velmi extrémní hodnoty. Spodní díl a vrstva v hloubce 6,4 cm dosáhly podobných hodnot necelých 100 ug/kg. Hodnoty celkové rtuti se ve 3. rhizoboxu pohybovaly v rozmezí 6,33 - 8,74 mg/kg. Nejvyšší hodnota byla změřena ve vrstvě 5,4 cm, nejnižší ve vrstvě 3,4 cm. Linie grafu však nevykazuje výrazně rostoucí či snižující tendenci. Extrémních hodnot dosahuje rtuť extrahovatelná kyselinou octovou. Šest z osmi hodnot bylo příliš nízkých, aby byly

zaznamenány, naopak extrémních hodnot dosahují vrstvy 3,4 a horní díl, ty dosáhly hodnot až 55 ug/kg. Celkový obsah rtuti se ve 4. rhizoboxu pohyboval v rozmezí 5,07 mg/kg ve spodním dílu až 8 mg/kg ve vrstvě 1,4 cm. Odsud až po horní díl její koncentrace kolísá jen nepatrně. Značně nejednotný vývoj měla oproti celkovému množství rtuti její koncentrace extrahovaná 0,11 M kyselinou octovou. Od spodního dílu, kde se její koncentrace pohybovala pod hranicí detekce, vystoupala na nejvyšší úroveň, až na hodnotu 128 ug/kg ve vrstvě 1,4 cm, odkud opět klesla a ve vrstvách 5,4 cm, 6,4 cm a v horním dílu její koncentrace opět byla tak nízká, že nebylo možno ji změřit. Celková koncentrace rtuti se v 5. rhizoboxu se pohybovala v rozmezí hodnot 2,5 mg/kg – 4,24 mg/kg. Lze tvrdit, že se koncentrace rtuti změřená v dolním a horním dílu liší jen v rozmezí desetin miligramů. Značně variabilní se jeví koncentrace rtuti extrahovatelná kyselinou octovou. Ta se pohybuje pod mezí hranice detekce až po 225 ug/kg. Nejvyšší koncentrace byla zaznamenána ve vzdálenosti 6,4 cm od agarové vrstvy, hodnota pod hranicí detekce se nacházela ve spodním díle a ve vrstvě 4,4 cm.

Křivka celkové koncentrace rtuti v 6. rhizoboxu vykazuje vzestupnou tendenci směrem od spodního dílu k hornímu, vzestup je však pozvolný, nenalézají se zde žádné extrémní hodnotové výkyvy. Naměřené koncentrace se pohybují v rozmezí hodnot 5,19 – 8,24 mg/kg. Nejnižší koncentrace byla změřena ve vrstvě 5,4 cm od agarové vrstvy obsahující mikroorganismy, nejvyšší ve vrstvě 3,4 cm od této zóny. Koncentrace rtuti extrahovatelná kyselinou octovou vykazuje taktéž vzestupnou tendenci, její hodnoty jsou však značně variabilní. Její změřená koncentrace se pohybuje od hodnot pod hranicí detekce (spodní díl a vrstva 5,4 cm) až po horní hranici ve vzdálenosti 6,4 cm 247 ug/kg. Koncentrace rtuti v horním dílu je 148 ug/kg, tedy téměř 150x vyšší než ve spodním dílu.

Bloom a kol. (2003) měřili koncentrace rtuti v silně kontaminovaných půdách industriálních lokalit. Nejvyšší naměřená koncentrace dosahovala hodnot 73,3 mg/kg, nejnižší 37,2 ug/kg. Sysalová a kol. (2013) měřili celkové koncentrace rtuti pomocí přístroje AMA 254 v antropogenně kontaminovaných půdách. Její nejvyšší hodnoty autoři zjistili v Hradci Králové na místě bývalé spalovny nebezpečného odpadu a to 24,5 mg/kg, nejnižší koncentrace byla změřena v okolí Příbrami, 2,11 mg/kg. Fernandez – Martinez a kol. (2006) měřili koncentrace celkové rtuti na území Mieres ve Španělsku. Nejvyšší hodnota v rámci této lokality se vyšplhala až na 29 mg/kg. Yuan a kol. (2010) zkoumali koncentrace rtuti v půdě nedaleko elektrárny spalující uhlí. Celkové koncentrace rtuti změřené v této lokalitě je v porovnání s výsledky dalších autorů překvapivě nízké, pohybuje se v rozmezí 0,90 – 2,4 ug/kg. Cattani a kol. (2008) uvádějí, že za neznečištěnou zeminu lze označit takovou, která obsahuje maximálně 0,2 mg/kg. Autoři ale našli lokalitu, kde bylo naměřeno až 132 mg/kg

celkové rtuti. Terzano a kol. (2010) zjišťovali koncentrace rtuti v půdě v alkalickém prostředí, kdy se pH pohybovalo kolem hodnot 8 – 8,5. Jimi změřené hodnoty dosahovaly hodnot 240 mg/kg. Tato hodnota se však v rámci ostatního měření ukázala jako značně extrémní, neboť se zbylé hodnoty pohybovaly v rozmezí 7,3 – 50 mg/kg. Autoři dále zdůraznili, že se koncentrace rtuti snižuje spolu s rostoucí hloubkou odběru. Vedrina – Dragojevič a kol. (1997) měřili koncentrace celkové rtuti ve vybraných sedimentech a půdních vzorcích. Z 12 zkoumaných vzorků dosahoval nejvyšší koncentrace vzorek s nejnižším procentuálním obsahem vody a to 0,2 mg/kg. Tato hodnota je však z výčtu zbytku ojedinělá, ostatní hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,029 – 0,134 mg/kg. Millán a kol. (2005) zkoumali silně kontaminovanou půdu v okolí Amaldénu ve Španělsku. Oproti výsledkům, které publikovali Vedrina – Dragojevič a kol. (1997) zde bylo naměřeno významně vyšší koncentrace rtuti. To se pohybovalo v rozmezí 5 – 1710 mg/kg. Autoři dále uvádějí, že 50% zkoumaných vzorků překonalo hranici rtuti 100 mg/kg. Jako původ takto masivní kontaminace bylo uvedeno, že vzorky byly odebrány z těžební lokality cinabaritu. Celkové koncentrace rtuti měřili ve vzorcích půdy z bývalé spalovny nebezpečného odpadu Šípková a kol. (2014). Zkoumali 10 vzorků, jejichž koncentrace se pohybovalo v rozmezí hodnot 0,236 – 28,0 mg/kg. Z naměřených výsledků je patrné, že spolu s nejvyšším obsahem celkové rtuti se v půdě vyskytují nejvyšší hodnoty rtuti extrahovatelné 0,11 M CH<sub>3</sub>COOH. Po této extrakci jí bylo změřeno v půdě od 0,34 – 11,3 ug/kg. Koncentrace takto extrahované rtuti bylo změřeno Yuan a kol. (2010) v rozmezí 0,011 – 0,038 ug/kg. Frohne a Rinklebe (2013) zkoumali zeminu obsahující nadlimitní koncentrace rtuti, kde se ale obsahy tohoto prvku pohybovaly v rozmezí hodnot pod mezí detekce přístroje AMA 254 až po hodnoty 47,8 mg/kg. Tyto výsledky potvrzují, že antropogenní kontaminace půdy je velmi heterogenní a i na malém území se pohybuje ve velmi širokém rozmezí. Dále je zřejmé, že mobilní podíly rtuti i v takto kontaminovaných půdách jsou velmi nízké.

## 5.4.Frakcionace

Souhrnné výsledky stanovení jednotlivých forem rtuti v rhizosferní půdě jsou uvedeny v následujících tabulkách 3 a 4. Analýza byla provedena vzhledem k časové a materiální náročnosti extrakcí jen u 2 z celkových 6 rhizoboxů v rámci 2 po sobě následujících pokusů.

Tab. 3, Výsledky frakcionace – experiment 1, F1: rtuť uvolnitelná vodou byla ve všech případech pod mezí detekce stanovení, F2: rtuť uvolnitelná v kyselém prostředí, F3: rtuť vázaná na huminové látky, F4: elementární rtuť a amalgámy, F5: sulfid rtuťnatý, F6: reziduální rtuť, T<sub>Hg</sub>: celkové množství rtuti v půdě

Rhizo 2	F2	F3	F4	F5	F6	výtěžek	T <sub>Hg</sub>
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)		(mg/kg)
R2 horní	0,03	0,25	0,08	0,08	0,01	101%	0,44
R2 1,4 (mm)	0,04	0,28	0,09	0,1	0,02	98%	0,53
R2 2,4 (mm)	0,03	0,28	0,11	0,08	0,02	98%	0,53
R2 3,4 (mm)	0,03	0,26	0,07	0,1	0,02	90%	0,53
R2 4,4 (mm)	0,03	0,26	0,08	0,08	0,01	94%	0,5
R2 5,4 (mm)	0,04	0,24	0,1	0,04	0,01	87%	0,48
R2 6,4 (mm)	0,04	0,25	0,17	0,18	0,01	91%	0,73
R2 dolní	0,05	0,24	0,08	0,1	0,02	87%	0,57
Rhizo 4	F2	F3	F4	F5	F6	výtěžek	T <sub>Hg</sub>
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)		(mg/kg)
R4 horní	0,04	0,33	0,1	0,05	0,01	98%	0,55
R4 1,4 (mm)	0,03	0,31	0,12	0,04	0,01	93%	0,56
R4 2,4 (mm)	0,05	0,32	0,09	0,05	0,01	95%	0,56
R4 3,4 (mm)	0,05	0,35	0,1	0,06	0,01	93%	0,6
R4 4,4 (mm)	0,05	0,34	0,1	0,04	0,02	99%	0,56
R4 5,4 (mm)	0,05	0,33	0,11	0,06	0,01	97%	0,58
R4 6,4 (mm)	0,06	0,3	0,1	0,06	0,01	93%	0,57
R4 dolní	0,05	0,34	0,09	0,05	0,02	98%	0,56

RSD (relativní směrodatná odchylka) byla ve všech případech nižší než 10%.

Tab. 4, Výsledky frakcionace – experiment 2, F1: rtuť uvolnitelná vodou byla ve všech případech pod mezí detekce stanovení, F2: rtuť uvolnitelná v kyselém prostředí, F3: rtuť vázaná na huminové látky, F4: elementární rtuť a amalgámy, F5: sulfid rtuťnatý, F6: reziduální rtuť, T<sub>Hg</sub>: celkové množství rtuti v půdě

Rhizo 3	F2	F3	F4	F5	F6	výtěžek	T <sub>Hg</sub>
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)		(mg/kg)
R3 horní	0,175	2,9	2,6	1,47	0,024	101%	7,1
R3 1,4 (mm)	0,097	3,6	1,93	1,61	0,033	89%	8,2
R3 2,4 (mm)	–	2,6	2,2	1,97	0,039	91,30%	7,5
R3 3,4 (mm)	–	2,7	2,1	1,94	0,05	87,60%	7,8
R3 4,4 (mm)	0,078	2,4	1,96	1,87	0,063	89,10%	7,2
R3 5,4 (mm)	0,055	2,5	2,2	2,1	0,081	89,60%	7,8
R3 6,4 (mm)	–	2,3	2,2	1,94	0,062	93,60%	7
R3 dolní	0,039	2,3	2,5	1,54	0,107	92,20%	7,1
Rhizo 5	F2	F3	F4	F5	F6	výtěžek	T <sub>Hg</sub>
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)		(mg/kg)
R5 horní	0,103	2,6	2,9	0,97	0,024	90,40%	7,3
R5 1,4 (mm)	–	3,1	3,2	1,26	0,034	94,30%	8,1
R5 2,4 (mm)	0,086	2,8	3	1,45	0,04	91,6	8,1
R5 3,4 (mm)	0,037	2,7	3,6	1,33	0,044	100,70%	7,7
R5 4,4 (mm)	–	2,6	3,3	1,51	0,048	100,20%	7,5
R5 5,4 (mm)	–	2,4	3,7	1,08	0,052	92,10%	7,9
R5 6,4 (mm)	0,062	2,8	3,8	1,07	0,058	110,30%	7,1
R5 dolní	0,047	2,4	3,6	1,24	0,098	98,40%	7,6

– pod limitem stanovitelnosti (0,0025 mg/kg)

RSD (relativní směrodatná odchylka) byla ve všech případech nižší než 10%.

V rámci 1. pokusu byly změřeny nižší hodnoty rtuti než v 2. opakování, nicméně zastoupení jednotlivých frakcí vykazuje v obou měřeních podobné výsledky. Množství rtuti rozpustné ve vodě se pohybuje pod hranicí detekce 0,002 mg/kg. Cattani a kol. (2008) oproti našim výsledkům naměřili množství rozpustné rtuti v rozmezí 0,15 – 0,30 mg/kg, což tvořilo podíl 0,1% z celkového obsahu rtuti ze vzorku. Velmi podobné výsledky zjistili i Reis a kol. (2010), kdy se tato frakce pohybovala v rozmezí hodnot 0,13 – 0,45 mg/kg (5% z celkového

obsahu rtuti). Rtuť uvolnitelná v acidickém prostředí se nachází v rozmezí 0,03 – 0,06 mg/kg, přičemž nejvyšší hodnota byla naměřena v hloubce 6,4 mm od povrchu a zaujímá cca 10% z celku. Oproti našim nízkým výsledkům naměřili Šípková a kol. (2014) v rámci této frakce hodnoty až 2,3 mg/kg, tato frakce však dosahovala pouze 8% z celkového obsahu rtuti. V rámci našich výsledků dosáhlo absolutně nejvyšší hodnoty z veškerých frakcí množství rtuti vázané na humínové kyseliny ve 4. rhizoboxu, kde se pohybovalo v rozmezí 0,3 – 0,35 mg/kg. V 2. rhizoboxu bylo toto naměřené množství celkově nižší a to od 0,24 – 0,28 mg/kg, lze tvrdit, že se jednotlivé výsledky lišily jen v řádu desetin. Tyto hodnoty činily 68% z celkového obsahu rtuti ve vzorku. V rámci této frakce máme výsledky značně vyrovnané a nevykazují vzestupný či sestupný lineární vývoj. Celkově lze však toto množství považovat za velmi vysoké. Oproti našim výsledkům naměřili Coufalík a kol. (2013) množství rtuti vázané na humínové kyseliny výrazně nižší, 0,042 – 0,28, s klesající hloubkou od povrchu klesalo i množství této frakce v půdě, její nejvyšší množství bylo zaznamenáno do hloubky 12 cm, od této hranice níže se jen snižovalo. Tato částečně mobilní frakce rtuti ve studii Šípkové a kol. (2014) tvořila cca 18- 30% z celkového množství rtuti. Autoři dále uvádějí, že rtuť zabudovaná do organických struktur v půdě tvoří silné komplexy, v důsledku čehož je omezeně mobilní. Množství naměřené elementární rtuti je poměrně nízké a pohybuje se v rozmezí 0,07 – 0,17 mg/kg, toto množství činí až 23% ze součtu ostatních frakcí. Původ  $Hg^0$  lze najít nejčastěji v oblastech silně antropogenních, zejména industriální činností (Covelli a kol. 2009). Obsah elementární rtuti ve vzorcích byl zjišťován rozdílem celkového množství rtuti před a po termální desorpci při 105°C po dobu 48 hodin. Postup je v případě této frakce vhodný díky nízké termální stabilitě elementární rtuti (Coufalík a kol., 2013). Residuální rtuť se v půdě vyskytuje jen ve velmi malém množství, 0,01 – 0,02 mg/kg. Šípková a kol. (2014) uvádějí, že množství této frakce v jimi zkoumaných vzorcích bylo do 12%. Autoři dále uvádějí, že značné množství rtuti je zakotveno v sulfidech. Liu a kol. (2009) ve své práci popisují, že množství sulfidu rtuťnatého v jejich vzorcích je do 10%. Sulfid rtuťnatý byl zjištěn ve vyšším množství ve 2. rhizoboxu, 0,04 – 0,18 mg/kg, ve 4. rhizoboxu jsou výsledky velmi vyrovnané, pohybují se v řádu setin, procentuálně tato frakce zaujímá 25 %. U žádné z frakcí ale nebyly pozorovány změny obsahů Hg v závislosti na vzdálenosti od agarové vrstvy. Součet jednotlivých frakcí rtuti, tedy jejich celkové množství se pohybovalo od 0,44 – 0,73 mg/kg, jedná se tedy o hodnoty nižší, než bylo popsáno v jiných lokalitách kontaminovaných antropogenními zdroji. Značné množství celkové rtuti naměřili Coufalík a kol. (2013) ve vrstvě rašeliny v hloubce 12 cm, a to 1,55 mg/kg. V silně kontaminované těžební lokalitě naměřili Covelli a kol. (2009) 101 mg/kg ve vzorcích půdy. Ve španělském

Amaldénu byla naměřena hodnota rtuti 2700 mg/kg a ve slovinské Idriji 420 mg/kg. Autoři dále uvádějí, že po zveřejnění těchto kritických výsledků byly zahájeny remediační a sanační postupy ke snížení této vysoké koncentrace.

### 5.5. Agary

Tab. 5, Obsahy rtuti v tělech mikroorganismů nakultivovaných v agarové vrstvě.

Vzorek	Hg	RSD
#	[mg/kg]	[%]
1	0,22	0,5
2	0,18	2,9
3	0,36	1,1
4	0,22	8,4
5	0,11	3,1
6	0,11	2,7
agar*	0,0034	2,1

Obsah rtuti v samotném agaru je v našem pokusu téměř zanedbatelný, 0,0034 mg/kg, viz. tab 5. Naměřené hodnoty v jednotlivých vzorcích tedy odpovídají celkovému množství rtuti v tělech mikroorganismů nakultivovaných na agarovou vrstvu. Výsledky se pohybují v rozmezí hodnot 0,11 – 0,36 mg/kg. Nejnižších hodnoty byly změřeny v 5. a 6. rhizoboxu, pouze 0,11 mg/kg, naopak nejvyšší výsledek byl oproti těmto 3x vyšší, byl změřen až na 0,36 mg/kg. Karunasagar a kol. (2003) zkoumali biosorpci  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  pomocí *Aspergillus niger*. Výsledky ukázaly, že k nejrychlejší akumulaci obou forem rtuti došlo v prvních 5 minutách při pH 7. Celkové množství akumulované rtuti v rámci tohoto pokusu bylo změřeno v rozmezí hodnot 3,2 – 2,2 mg/g. Autoři dále uvádějí, že druh *Aspergillus niger* je schopen kumulovat obě formy rtuti bez jakýchkoli projevů toxicity a zdá se tedy být vhodný pro dekontaminaci materiálů obsahujících rtuť. Raetegui a kol. (2010) zkoumali schopnost druhů *Lessonia nigrescens* a *Lessonia trabeculata* odstraňovat rtuť z prostředí. Zjistili, že mikroorganismy jsou schopny sorbovat až 0,335 mg/kg při neutrálním pH. Čím více se pH snižovalo, tím se snižovalo i množství naměřené rtuti v tělech mikroorganismů. Ve vodních ekosystémech Zeroual a kol. (2006) zkoumali sorpci rtuti pomocí mikroorganismů žijících u

kořenů řasy porostu locikového (*Ulva lactuca*). Jimi změřené množství absorbované rtuti se pohybovalo v rozmezí hodnot 0,027 – 0,149 mg/kg v rozmezí hodnot pH 2,5 – 7. *Penicillium chrysosporum* bylo schopno absorbovat až 0,172 mg/kg rtuti, *Chlamydomonas reinhardtii* 0,11 mg/kg při pH 6 (Kacar a kol., 2010). Tyto hodnoty jsou srovnatelné s našimi výsledky. Grassi a Netti (2000) zkoumali výskyt mikroorganismů resistantních vůči rtuti v silně kontaminované lokalitě Orbetello Lagoon v Itálii. Z místa byly extrahovány rody *Pseudomonas* a *Bacillus*, které byly schopny extrahovat až 75% z celkového množství rtuti v půdě. Takovou účinnost mikroorganismy v našem pokusu nedosahovaly. Cabral a kol. (2013) studovali schopnost *Pseudomonas putina* odstraňovat rtuť z životního prostředí. Autoři zjistili, že tato bakterie je schopna odstranit průměrně 90% methylrtuti. Zároveň bylo zjištěno, že tato bakterie je schopna rtuť odstraňovat v širokém rozpětí pH, od 4 – 8 a teploty 10 – 35 °C. Je tedy zřejmé, že *Pseudomonas putina* má značný potenciál při remediaci prostředí. Schopnost odstraňovat rtuť této bakterie zkoumali i Zang a kol. (2012). Pokus byl proveden v laboratorních podmínkách a zkoumal se vliv pH na množství odstraněné rtuti. Až 99%  $Hg^{2+}$  bylo ze substrátu volatilizováno při pH 8, spolu se snižujícími se hodnotami pH se zároveň snižovalo i množství odstraněné rtuti. Nejnižší množství bylo odstraněno při pH 5 a to 80%. Celkově však lze množství odstraněné rtuti považovat za vysoké, podle autorů je tedy vhodné tuto bakterii v rámci remediačních strategií zapojit. Takeuchi a kol. (2001) ve své práci popisují, že rod *Acidithiobacillus ferrooxidans* je schopný volatilizovat až 54% z celkového množství 7,5  $\mu\text{mol/kg}$ . Současně s volatilizací se oxidovalo  $Fe^{2+}$ . V tomto případě se ukázalo, že ideální pH pro volatilizaci bylo 2,5, což je v porovnání s jinými studii velmi nízké. Autoři jako důvod uvádějí, že oxidační systém *Acidithiobacillus ferrooxidans* nepracoval při pH 9 a že  $Fe^{2+}$ , které je nezbytné jako donor elektronů pro redukci  $Hg^{2+}$  bylo při tomto pH rychle oxidováno. Gupta a kol. (2012) studovali schopnost *Lysinibacillus fusiformis* transformovat a volatilizovat rtuť v laboratorních podmínkách. Ta se v roztoku vyskytovala v množství 25 mg/L ve formě chloridu rtuťnatého, přičemž více než 97% bylo v průběhu 96 hodin volatilizováno nebo transformováno, z čehož 35% bylo odstraněno během prvních 24 hodin. V časovém rozmezí 48 až 96 hodin docházelo ke zvýšené fixaci rtuti do těl mikroorganismů ve formě elementární rtuti, která byla pevně vázána v buněčné membráně. Nicméně 63% z celkového množství bylo rychle vytěkáno do prostředí. Deng a Wang (2012) ve své studii zkoumali tři druhy bakterií odolných rtuti. Nejvíce resistantní z nich se ukázalo *Pseudomonas sp.* To vykazovalo nejvyšší toleranci a zároveň bioakumulaci  $Hg^{2+}$  v širokém spektru pH. Organismy tohoto rodu prokázaly dobrou schopnost rezistence i v našem případě. Autoři uvedli, že rtuť se v buňkách ukládá v její membráně. Francois a kol. (2011) popisují,



že součástí resistantního mechanismu mikroorganismů proti rtuti je jeho schopnost rtuti tékat do prostředí. Singh a kol. (2008) závěrem své studie zhodnotili, že bakterie odolné rtuti jsou vhodným nástrojem v bioremediaci díky své jednoduchosti, nízkému množství sekundární kontaminace a v porovnání s jinými remediačními technologiemi se jedná o poměrně nenákladnou technologii.

## 6. Závěr

- Současná situace kontaminace prostředí rtutí ovlivňuje okolní životní prostředí a mnohdy vyžaduje akutní řešení. Klasické sanační technologie zaujímají nezastupitelné místo při remediaci rtuti, nicméně se současným trendem společnosti chovat se co možná nejvíce ekologicky k okolí, se stále častěji přistupuje k přírodě neinvazivním metodám.
- V modelovém pokusu s využitím rhizoboxů byl sledován příjem rtuti druhy *Paenibacillus alginolyticus*, *Burkholderia glathei*, a zástupci rodů *Burkholderia sp.* a *Pseudomonas sp.*, které byly izolovány z půdy extrémně kontaminované rtutí.
- Jako výhodné se diskutovalo použít mikroorganismy přirozeně se vyskytující v půdě kontaminované rtutí jako její akumulátory. Určení množství biologicky dostupné rtuti pro rostliny extrakcí 0,11 M CH<sub>3</sub>COOH vykazuje napříč rhizoboxy nejednoznačné výsledky. Podíly Hg extrahovatelné tímto činidlem se pohybovaly v rozmezí od hodnot pod mezí detekce stanovení použité metody po 5% celkového obsahu. Tyto výsledky naznačují potenciální riziko vstupu rtuti do potravních řetězců.
- Zastoupení rtuti v jednotlivých složkách půdy bylo stanoveno pomocí metody postupné extrakce. Nejvyšší výsledky v rámci frakcionizace byly zjištěny u rtuti vázané na humínové kyseliny. Ty jsou obsaženy v organické hmotě, která má v půdě významnou konzervační funkci, je schopna asistovat při imobilizaci rizikových prvků včetně rtuti, čímž je vysvětlen nejvyšší podíl této frakce v našem vzorku.
- Dosavadní výsledky nám podávali informace o množství a složení rtuti v námi zkoumané půdě. Pro náš pokus je však zásadní informace o množství rtuti v tělech organismů naočkovaných v agarové vrstvě. Toto změřené množství rtuti bylo zjištěno ve významně nižším množství, než se vyskytovalo v zemině. Tento fakt vede k domněnce, že mikroorganismy většinu rtuti do svých těl neabsorbovaly, nýbrž mohly náležet k těm mikroorganismům, které napomáhají k volatilizaci tohoto prvku v kontaminované půdě.

## 7. Seznam literatury

- Bacon, J.R., Davison, C.M., 2008. Is there a future for sequential chemical extraction? *Analyst* 133, 25-46.
- Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O., 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *Microb Rev* 27, 355-384.
- Barkay, T., Wagner-Dobler, I., 2005. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. *Adv. Appl. Microbiol.* 57, 1-54.
- Benison, G.C., Lello, P.D., Shokes, J.E., Cosper, N.J., Scott, R.A., Legault, P., Omichinski, J.G., 2004. A stable mercury containing complex of the organomercurial lyase Mer B: catalysis, product release and direct transfer to Mer A. *Biochemistry* 43, 8333–8345.
- Bloom, N.S., Preus, E., Katon, J., Hiltner, M., 2003. Selective extractions to assess the biogeochemically relevant fraction of inorganic mercury in sediments and soils. *Anal Chim Acta* 479, 233-248.
- Borůvka, L., Huan-Wei, Ch., Kozák, J., Křišťůvková, S. 1996. Heavy contamination of soils with cadmium, lead, and zinc in alluvium of Litavka river. *Rostl Výr* 42, 543-550.
- Boszke, L., Kowalski, A., Astel, A., Barański, A., Gworek, B., Siepak, J., 2008. Mercury mobility and bioavailability in soil from contaminated area. *Environ Geol* 55, 1075-1087.
- Bower, J., Savage, K.S., Weinman, B., Barnett, M.O., Hamilton, W.P., Harper, W.F., 2008. Immobilization of mercury by pyrite (FeS<sub>2</sub>). *Environ Pollut* 156, 504-514.
- Brooks, G., Gu, B.H., Liang, L.Y., Miller, C.L., Southworth, G., 2009. Kinetic controls on the complexation between mercury and dissolved organic matter in a contaminated environment. *Environ Sci Technol* 43, 8548 - 8553.
- Burt, R., Hernandez, L., Shaw, R., Tunstead, R., Ferguson, R., Peaslee, S., 2014. Trace element concentration and speciation in selected urban soils in New York City. *Environ Monit Assess* 186, 195 - 215.
- Cabral, L., Giovanello, P., Gianello, C., Bento menezes, F., Andrezza, R., Camargo, F.A.O., 2013. Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putina* V1 strain. *Biodegradation* 24, 319 - 331.

- Cattani, I., Spalla, S., Beone, G.M., Del Rea, A.A.M., Boccelli, R., Trevisan, M., 2008. Characterization of mercury species in soils by HPLC–ICP-MS and measurement of fraction removed by diffusive gradient in thin films. *Talanta* 74, 1520-1526.
- Clarkson, T.W., 1972. The pharmacology of mercury compounds. *Annu Rev Pharmacol* 12, 375-406.
- Conley, T., Hulet, G., Morris, M., Osborne-Lee, I., 1999. Demonstration Results on the Effects of Mercury Speciation on the Stabilization of Wastes. *J Hazard Mater* 92, 199-212.
- Cossa, D., Martin, J.M., Takayanagi, K., Sanjuan, J., 1997. The distribution and cycling of mercury species in the western Mediterranean. *Deep Sea Res* 44, 721-740.
- Coufalík, P., Krásenský, P., Dosbaba, M., Komárek, J., 2012. Sequential extraction and thermal desorption of mercury from contaminated soil and tailings from Mongolia. *Cent Eur J Chem* 10, 1565-1573.
- Coufalík, P., Zvěřina, O., Komárek, J., 2013. Atmospheric mercury deposited in a peat bog, the Jeseníky Mountains, Czech Republic. *J Geochem Explor* 132, 120-124.
- Covelli, S., Acquavita, A., Piani, R., Predonzani, S., De Vittor, C., 2009. Recent contamination of mercury in an estuarine environment (Marano lagoon, Northern Adriatic, Italy). *Estuar Coast Shelf Sci* 82, 273-284.
- Cursino, L., Mattos, S.V.M., Azevedo, V., Galarza, F., Bucker, D.H., Chartone-Souza, E., Nascimento, A.M.A., 2000. Capacity of mercury volatilization by mer (from *Escherichia coli*) and glutathione S-transferase (from *Schistosoma mansoni*) genes cloned in *Escherichia coli*. *Sci Total Environ* 261, 109-113.
- Dash, H.R., Das, S., 2012. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *Int Biodeter Biodegr* 75, 207-213.
- Deng, X., Wang, P.T., 2012. Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. *Bioresour Technol* 121, 342 - 347.
- Dermont, G., Bergeron, M., Mercier, G., Richer-Lafleche, M., 2008. Metal-contaminated soils: remediation practices and treatment technologies. *Pract Period Hazard Tox Radioact Waste Manage* 12, 188-210.
- Edmonds, J., Morita, M., Yoshinaga, J., 1998. The determination of mercury species in environmental and biological samples. *Pure and Appl. Chem.* 70, 1585 - 1615.
- Eto, K., Marumoto, M., Takeya, M., 2010. The pathology of methylmercury poisoning (Mimamtha disease). *Neuropathology* 30, 471-479.
- Ettler, V., Rohovec, J., Navrátil, T., Mihaljevič, M., 2007. Mercury distribution in soil profiles polluted by lead smelting. *Bull Environ Contam Toxicol* 78, 13-17.

- Fernandez - Martinez, R., Loredó, J., Ordóñez, A., Rucandio, M. I., 2006. Physicochemical characterization and mercury speciation of particle-size soil fractions from an abandoned mining area in Mieres, Asturias (Spain). *Environ Pollut* 142, 217 - 226.
- Ferner, R., Langford, N., 1999. Toxicity of mercury. *J Hum Hypertens* 13, 651 - 656.
- Fimreite, N., 1970. Mercury uses in Canada and their possible hazards as sources of mercury contamination. *Environ Pollut* 1, 119-131.
- Fitz, W.J., Wenzel, W.W., Wieshammer, G., Istenič, B., 2003. Microtome sectioning causes artifacts in rhizobox experiments. *Plant Soil* 256, 455-462.
- Fox, B., Walsh, C.T., 1982. Mercuric reductase. Purification and characterization of a transport-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide. *J Biol Chem* 257, 2498-2503.
- Francois, F., Lombard, C., Guigner, J.M., Soreau, P., Brian-Jaisson, F., Martino, G., Vandervennet, M., Garcia, D., Pignol, D., Peduzzi, J., Zirah, S., Rebuffat, S., 2011. Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Appl and Environ Microbiol* 93, 1097 - 1106.
- Frohne, T., Rinklebe, J., 2013. Biogeochemical Fractions of Mercury in Soil Profiles of Two Different Floodplain Ecosystems in Germany. *Water Air Soil Pollut* 224, 1-17.
- Fuhrmann, M., Melamed, D., Kalb, P.D., Adams, J.W., Milian, L.W., 2002). Sulfur polymer solidification/stabilization of elemental mercury waste. *Waste Manage* 22, 327-333.
- Fusaka, M., Nomura, S., 1998. Mimanata disease from the viewpoint of occupational health. *J Occup Health* 40, 1-8.
- Gabriel, M.C., Williamson, D.G., 2004. Principal biogeochemical factors affecting the speciation and transport of mercury through the terrestrial environment. *Environ Geochem Health* 26, 421 - 434.
- Gilmour, C.C., Henry, E.A., Mitchell, R., 1992. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environ Sci Technol* 26, 2281-2287.
- Gilmour, C.C., Riedel, G.S., Ederington, M.C., Bell, J.T., Benoit, J.M., 1998. Methylmercury concentrations and production rates across a tropic gradient in northern everglades. *Biogeochemistry-US* 40, 327-345.
- Glick, B.R., 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv* 174, 383-393.
- Grassi, S., Netti, R., 2000. Sea water intrusion and mercury pollution of some coastal aquifers in the province of Grosseto (Southern Tuscany-Italy). *J Hydrol* 238, 198 - 211.

- Gupta, S., Goyal, R., Nirwan, J., Cameotra, S.S., Tejoprakash, N., 2012. Biosequestration, Transformation, and Volatilization of Mercury by *Lysinibacillus fusiformis* Isolated from Industrial Effluent. *J Microbiol Biotechnol* 22, 684 - 689.
- Gustin, M.S., Lindberg, S.E., Weisberg, P.J., 2008. An update on the natural sources and sinks of atmospheric mercury. *Appl Geochem* 23, 482 - 493.
- Gustin, M.S., Stamenkovic, J., 2005. Effect of watering and soil moisture on mercury emissions from soils. *Biogeochemistry-US* 76, 215-232.
- Hajela, N., Murtaza, I., Qamri, Z., Ali, A., 2002. Molecular intervention in the abatement of mercury pollution. *Anmol Publication* 16, 122–144.
- Han, F., Monts, D., Plodinec, J., Su, Y., Waggoner, C., 2006. Binding, distribution and plant uptake of mercury in soil from Oak Ridge. *Sci Total Environ* 368, 753 - 768.
- Hannan, A.M., Tanguma, J., 2012. Concentrations of trace and major elements in Mission - Progresso (Texas) soils. *J Radionucl Chem* 291, 745 - 751.
- Haq, S., K., Khan, R., H., Rizwi, S., J., Zahir, F. (2005). Low dose mercury toxicity and human health. *Environ Toxicol Phar* 20, 351 - 360.
- Hintelmann, H., Harris, R., Heyes, A., Hurley, J.P., Kelly, C.A., 2002. Reactivity and mobility of new and old mercury deposition in boreal forest ecosystem during the first year of the METAALICUS study. *Environ Sci Technol* 36, 5034 - 5040.
- Hojdová, M., Navrátil, T., Rohovec, J., 2008. Distribution and speciation of mercury in mine waste dumps. *Bull Environ Contam Toxicol* 80, 237-241.
- Hojdová, M., Navrátil, T., Rohovec, J., Žák, K., Vaněk, A., Chrástný, V., Bače, R., Svoboda, M., 2011. Changes in mercury deposition in a mining and smelting region as recorded in tree rings. *Water Air Soil Pollut* 216, 73-82.
- Hoserová, P., Janák, K., Kubáň, P., Kubáň, V., Pavlíčková, J., 2006. Chemické formy rtuti ve vodních ekosystémech - vlastnosti, úrovně, koloběh a stanovení. *Chem. Listy* 100, 862 - 876.
- Huang, Y.T., Hseu, Z.Y., Hsi, H.C., 2011. Influences of thermal decontamination on mercury removal, soil properties and repartitioning of coexisting heavy metals. *Chemosphere* 84, 1244-1249.
- Chang, T., Yen, J., 2006. On-site mercury-contaminated soils remediation by using thermal desorption technology. *J Hazard Mater* 128, 208-217.
- Cho, U.H., Park, J.O., 1999. Changes in hydrogen peroxide content and activities of antioxidant enzymes in tomato seedlings exposed to mercury. *J Plant Biol* 42, 41-48.

- John, M.K., van Laerhoven, C.J., Cross, C.H., 1975. Cadmium, lead and zinc accumulation in soils near smelter complex. *Environ Lett* 10, 25-35.
- Kacar, A., Gungor, F., 2010. Comparison of fecal coliform bacteria before and after wastewater treatment plant in the Izmir Bay (Eastern Aegean Sea). *Environ Model Asses* 162, 355-363.
- Kafka, Z., Punčochářová, J., 2002. Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. *Chemické listy* 96, 611 - 617.
- Karunasagar, D., Arunachalam, J., Rashmi, K., Naveena Lavanya Latha, J. Maruthi Mohan, P., 2003. Biosorption of inorganic and methyl mercury by a biosorbent from *Aspergillus niger*. *J Microbiol Biotechnol* 19, 291-295.
- Knightes, C.D., Sunderland, E.M., Marber, M.C., Johnston, J.M., Ambrose, R.B., 2009. Application of ecosystem scale fate and bioaccumulation models to predict fish mercury response times to changes in atmospheric deposition. *Environ Toxicol Chem* 28, 881-893.
- Korogi, Y., Takahashi, M., Okajima, T., Eto, K., 1998. Findings of mimantha disease - organic mercury poisoning. *JMRI* 8, 308-316.
- Leonard, T.L., Taylor, G.E., Gustin, M.S., Fernandez, G.C.J., 1998. Mercury and plants in contaminated soils: 1. uptake, partitioning and emissions to the atmosphere. *Environ Toxicol Chem* 17, 2063-2071.
- Lestan, D., Luo, C., Li, X., 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: a review. *Environ Pollut* 153, 3-13.
- Lester, P.B., Liang, L., Lowe, K.A., Miller, C.L., Pierce, E.M., Watson, D.B., 2008. Characterization of soils from an industrial complex contaminated with elemental mercury. *Environ Sci Div* 125, 20 - 29.
- Li, X., Liu, L., Wang, Y., Luo, G., Chen, X., Yang, X., Hall, M.H.P., Guo, R., Wang, H., Cui, J., He, X., 2013. Heavy metal contamination of urban soil in an old industrial city (Shenyang) in Northeast China. *Geoderma* 192, 50 - 58.
- Lin, C.J., Pehkonen, S.O., 1999. The chemistry of atmospheric mercury: a review. *Atmos Environ* 33, 2067-2079.
- Lindberg, E.E., Hanson, P.J., Meyers, T.P., Kim, K.H., 1998. Air/surface exchange of mercury vapor over forests-the need for reassessment of continental biogenic emissions. *Atmos Environ* 32, 895 - 908.

- Liu, G.L., Cai, Y., Mao, Y.X., Scheidt, D., Kalla, P., Richards, J., Scinto, L., Tachiev, G., Roelant, D., Appleby, C., 2009. Spatial variability in mercury cycling and relevant biogeochemical controls in the Florida everglades. *Environ Sci Technol* 43, 4361-4366.
- Liu, J., Valsaraj, K.T., Devai, I., DeLaune, R., 2008. Immobilization of aqueous Hg(II) by mackinawite (FeS). *J Hazard Mater* 157, 432-440.
- Mason, R.P., Fitzgerald, W.F., 1993. The distribution and biogeochemical cycling of mercury in the equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Res Part I* 40, 1897-1924.
- Massacci, P., Piga, L., Perrini, M., 2000. Applications of physical and thermal treatment for the removal of mercury from contaminated materials. *Miner Eng* 13, 963-967.
- Massas, I., Kalivas, D., Ehaliotis, C., Gasparatos, D., 2013. Total and available heavy metal concentrations in soils of the Thriassio plain (Greece) and assessment of soil pollution indexes. *Environ Monit Assess* 185, 6751 - 6766.
- Millán, R., Sanchez, D.M., Quejido, A.J., Fernandez, M., 2005. Mercury and trace element fractionation in Almaden soils by application of different sequential extraction procedures. *Anal Bioanal Chem* 381, 1507 -1513.
- Misra, T.K., 1992. Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* 25, 4-16.
- Moreno-Jiménez, E., Gamarra, R., Carpena-Ruiz, R.O., Millán, R., Pealosa, J.M., Esteban, E., 2006. Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almadén area. *Chemosphere* 63, 1969-1973.
- Mosbaek, H., Tjell, J.C., Sevel, T., 1988. Plant uptake of airborne mercury in background areas. *Chemosphere* 17, 1227-1236.
- Munthe, J. a Schroeder, W., H., 1998. Atmospheric mercury - an overview. *Atmos Environ* 32, 809 - 822.
- Munthe, J., Bodaly, R.A., Branfireun, B.A., Driscoll, C.T., Gilmour, C.C., 2007. Recovery of mercury-contaminated fisheries. *J Hum Environ* 36, 33-44.
- Murtaza, I., Dutt, A., Ali, A., 2002. Relationship between the persistence of mer operon sequences in *Escherichia coli* and their resistance to mercury. *Curr Microbiol* 44, 178-183.
- Navarro, A., Caadas, I., Martinez, D., Rodrigez, J., Mendoza, J., 2009. Application of solar thermal desorption of remediation of mercury-contaminated soils. *Sol Energy* 83, 1405-1414.



- Novozamsky, J., Lexmond, T.M., Houba, V.J.G., 1993. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals in plants. *Int J Environ Anal Chem* 51, 47-58.
- Obrist, D., 2007. Atmospheric mercury pollution due to losses of terrestrial carbon pools? *Biogeochemistry* 85, 119-123.
- Ontario ministry of the environment, Environment Canada - Ontario region, Noranda inc., Ontario power generation inc., 2003. Mercury in the environment: A primer. *Pollut Probe*, 1-84.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Steenhuisen, F., Wilson, S., 2006. Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. *Atmos Environ* 40, 4048 - 4063.
- Palmer, M., 2001. Cloning and characterization of a mer operon from natural aquatic bacteria. *J Undergrad Res* 19, 3-198.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A., 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic. *Environ Exp Bot* 52, 199-223.
- Patra, M., Sharma, A., 2000. Mercury toxicity in plants. *Bot Rev* 3, 1-44.
- Piao, H., Bishop, P.L., 2006. Stabilization of mercury-containing wastes using sulfide. *Environ Pollut* 139, 498-506.
- Pitts, K.E., Summers, A.O., 2002. Role of thiols in the bacterial organomercurial lyase. *Biochemistry* 43, 10287–10296.
- Quian, G., Sun, D.D., Tay, J.H., 2003. Immobilization of mercury and zinc in an alkali-activated slag matrix. *J Hazard Mater* 101, 65-77.
- Ramel, C., 1969. Genetic effects of organomercurian compounds. I. Cytological investigation on *Allium* roots. *Hereditas* 61, 208-230.
- Randall, P.M, Chattopadhyay, S., 2010. Bench-scale evaluation of chemically bonded phosphate ceramic technology to stabilize mercury waste mixtures. *J Environ Eng* 136, 265-273.
- Rasmussen, L.D.,Zawadsky, C., Binnerup, S.J., Oregaard, G., Sorensen, S.J., Kroer, N., 2008. Cultivation of hard to culture subsurface mercury resistant bacteria and discovery of new merA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 74, 3795-3803.
- Reategui, M., Maldonado, H., Ly, M., Guibal, E., 2010. Mercury (II) biosorption using *Lessonia* sp. Kelp. *Appl Biochem Biotechnol* 162, 805 - 822.
- Reis, A. T., Rodrigues, S. M., Davidson, C. M., Pereira, E.,Duarte, A. C., 2010. Extractability and mobility of mercury from agricultural soils surrounding industrial and mining contaminated areas. *Chemosphere* 81, 1369–1377.

- Rieuwerts, J., Farago, M., 1996. Heavy metal pollution in the vicinity of a secondary lead smelter in the Czech republic. *Appl Geochem* 11, 17-23.
- Rodrigues, S.M., Henriques, B., Coimbra, J., Ferreira da Silva, E., Pereira, M.E., Duarte, A.C., 2010. Water-soluble fraction of mercury, arsenic and other potentially toxic elements in highly contaminated sediments and soils. *Chemosphere* 78, 1301-1312.
- Sasaki, Y., Minakawa, T., Miyazaki, A., Silver, S., Kusano, T., 2005. Functional dissection of a mercuric ion transporter Mer C from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 1394-1402.
- Selin, N.E., 2009. Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A review. *Annu Rev Environ Resour* 34, 43 - 63.
- Shaw, B.P., Rout, N.P., 1998. Age-dependent response of *Phaseolus aureus* Roxb. to inorganic salts of mercury and cadmium. *Acta Physiol Plant* 20, 85-90.
- Sierra, C., Gallego, J., Afif, E., Menéndez-Aguado, J., González-Coto, F., 2010. Analysis of soil washing effectiveness to remediate a brownfield polluted with pyrite ashes. *J Hazard Mater* 180, 602-608.
- Sigh, J., Prokohova, T., Morsczech, C., Pfeiffer, M., 2008. *Streptococcus pneumoniae*: proteomics of surface proteins for vaccine development. *Clin Microbiol Infec* 14, 78-81.
- Silver, S., Phung, L.T., 1996. Bacterial heavy metal resistance-new surprises. *Annu Rev Microbiol* 50, 753-789.
- Streets, D.G., Zhang, Q., Wu, Y., 2009. Projections of global mercury emissions in 2050. *Environ Sci Technol* 43, 2983 - 2988.
- Strode, S., Selin, N.E., Jaeglé, L., 2009. Impact of mercury emissions from historical gold and silver mining: global modeling. *Atmos Environ* 43, 2012 - 2017.
- Summers, A.O., Silver, S., 1978. Microbial transformations of metals. *Annu Rev Microbiol* 32, 367-672.
- Sun, Y., Zhou, Q., Xie, X., Liu, R., 2010. Spatial, sources and risk assessment of heavy metal contamination of urban soils in typical regions of Shenyang, China. *J Hazard Mater* 174, 455 - 462.
- Sunderland, E.M., Manson, R.P., 2007. Human impact on open mercury concentrations. *Glob Biogeochem Cydes* 21, 824-841.
- Synek, V., Subrt, P., Marecek, J., 2000. Uncertainties of mercury determinations in biological materials using an atomic absorption spectrometer - AMA 254. *Chem Anal* 5, 58-66.

- Sysalová, J., Kučera, J., Firkle, M., 2013. Determination of the total mercury in contaminated soils by direct solid sampling atomic absorption spectrometry using an AMA-254 device and radiochemical neutron activation analysis. *Microchem. J.* 110, 691 - 694.
- Šichorová, K., Tlustoš, P., Száková, J., Kořínek, K., Balík, J., 2004. Horizontal and vertical variability of heavy metals in soil at polluted area. *Plant Soil Environ* 50, 525-534.
- Šípková, A., Száková, J., Coufalík, P., Zvěřina, O., Kacálková, L., Tlustoš, P., 2014. Mercury distribution and mobility in contaminated soils from vicinity of waste incineration plant. *Plant Soil Environ* 60, 87-92.
- Takeuchi, F., Iwahori, K., Kamimura, K., Hegishi, A., Maeda, T., Sugio, T., 2001. Volatilization of mercury under acidic conditions from mercury - polluted soil by a mercury resistant *Acithiobacillus ferrooxidans* SUG 2-2. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 1981-1986.
- Terzano, R., Santoro, A., Spagnulo, M., Vekemans, B., Medici, L., Janssens, K., Gottlicher, J., Denecke, M.A., Mangold, S., Ruggiero, P., 2010. Solving mercury (Hg) speciation in soil samples by synchrotron X-ray microspectroscopic techniques. *Environ Pollut* 158, 2702 - 2709.
- Varekamp, J.C., Buseck, P.R., 1989. Global mercury flux from volcanic and geothermal sources. *Appl Geochem* 1, 65 - 73.
- Vedrına-Dragojević, I., Dragojević, D., Cadez, S., 1997. Spectrofluorimetric method for the determination of the total mercury content in sediment and soil. *Anal Chim Acta* 335, 151 - 156.
- Velebil, D., 2009. Dolování cinabaritu v Horních Lubech u Chebu, Česká republika. *Bull Mineral Petrolog Odd Nár Muz (Praha)* 17, 39-61.
- Walsh, C.T., Begley, T.P., Walts, A.E., 1987. Bacterial organomercury lyase: a protonolytic detoxification catalyst. *Pure Appl Chem* 59, 295-298.
- Wang, J., Feng, X., Anderson, Ch.W.N., Xing, Y., Shang, L., 2012. Remediation of mercury contaminated sites – A review. *J Hazard Mat* 222, 1-18.
- Wang, J., Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol Adv* 27, 195-226.
- Wang, Y., Stauffer, C., Keller, C., 2005. Changes in Hg fractionation in soil induced by willow. *Plant Soil* 275, 67-75.
- Wenzel, W.W., Wieshammer, G., Fitz, W.J., Puschenreiter, M., 2001. Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. *Plant Soil* 237, 37-45.

- Wojciechowska-Mazurek, M., Zawadzka, T., Karlowski, K., 1995. Content of lead, cadmium, mercury, zinc and copper in fruit from various regions of Poland. *Rocznik Państw Zakł Hig* 46, 223-238.
- Yaylali - Abanuz, G., 2011. Heavy metal contamination of surface soil around Gebze industrial area, Turkey. *Microchem J* 99, 82 - 92.
- Yuan, CH. G., Wang, T.F., Song, Y.F., Chang, A.L., 2010. Total mercury and sequentially extracted mercury fractions in soil near a coal fired power plant. *Fresen Environ Bull* 19 (2010): 2857 - 2863.
- Zeroual, Y., Kim, B.S., Kim, C.S., Blaghen, M., Lee, K.M., 2006. Biosorption of bromophenol blue from aqueous solutions by *Rhizopus stolonifer* biomass. *Water Air Soil Pollut* 177, 135 - 146.
- Zhang, J., Bishop, P.L., 2002. Stabilization/solidification (S/S) of mercury-contaminating wastes using reactivated carbon and Portugal cement. *J Hazard Mater* 92, 199-212.
- Zhang, W., Chen, L., Liu, D., 2012. Characterization of a marine - isolated mercury - resistant *Pseudomonas putina* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. *Appl Microbiol and Biotechnol* 93, 1305 - 1314.
- Zhang, W.H., Tyerman, S.D., 1999. Inhibition of water channels by HgCl<sub>2</sub> in intact wheat root cells. *Plant Physiol* 120, 849-858.
- Zhuang, J.M., Lo, T., Walsh, T., Lam, T., 2004. Stabilization of high mercury contaminated brine purification sludge. *J Hazard Mater* 113, 157-164.