

# **Untersuchungen zur mikrobiellen Methylquecksilberbildung in Termiten und im Faulschlamm**

**Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
"Doktor der Naturwissenschaften"**

**Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Uta Limper  
geb. in Meisenheim**

**Mainz, den 13. Dezember 2006**

**Dekan:**

**1. Berichtstatter:**

**2. Berichtstatter:**

**Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2006**

There are things known and  
there are things unknown;  
in between there are doors.

**William Blake**

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	1
1.1	Quecksilber.....	1
1.1.1	Chemische und physikalische Eigenschaften von Quecksilber.....	2
1.1.2	Toxizität von Quecksilber .....	3
1.1.3	Quecksilber in der Umwelt .....	5
1.1.4	Quecksilberakkumulation in Organismen .....	9
1.1.5	Quecksilbermethylierung.....	11
1.1.6	Methylquecksilberanalysemethoden .....	14
1.1.7	Probenaufbereitung zur Methylquecksilberbestimmung.....	18
1.2	Sulfat-reduzierende Bakterien .....	21
1.3	Faulschlamm aus der Abwasserreinigung .....	22
1.4	Termiten .....	26
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	32
2	Material und Methoden .....	33
2.1	Chemikalienliste .....	33
2.2	Lösungen.....	36
2.2.1	Extraktionslösungen.....	36
2.2.2	Derivatisierungsreagenzien.....	36
2.2.3	Quecksilberstandardlösungen.....	37
2.2.4	Hemmstoffe.....	38
2.2.5	Medien .....	39
2.3	Probenmaterialien .....	41
2.3.1	Standardreferenzmaterial.....	41
2.3.2	Bakterienkulturen .....	41
2.3.3	Termiten.....	41
2.4	Probenherstellung .....	42
2.4.1	Bakterienkulturen .....	42
2.4.2	Quecksilberfütterung der Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	42
2.4.3	Schwefelintermediate im Intestinaltrakt von Termiten.....	44
2.5	Reinigung der Laborgefäße .....	45
2.6	Spurenanalytische Nachweise.....	45
2.6.1	Methylquecksilberbestimmung .....	45
2.6.2	Gesamtquecksilberbestimmung .....	51
2.6.3	Bestimmung der Schwefelintermediate .....	55
2.7	Berechnungen der Gesamt- und Methylquecksilberkonzentrationen .....	57
3	Ergebnisse .....	59
3.1	Methylquecksilberbestimmung .....	59
3.1.1	Weiterentwicklung einer Methode zur Methylquecksilberbestimmung .....	59
3.1.2	Überprüfung der Richtigkeit der Methode .....	64
3.2	Quecksilbermethylierung im Faulschlamm .....	67
3.2.1	Zeitversuch.....	67
3.2.2	Hemmstoffversuche .....	69
3.3	Quecksilberfütterung der Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	70
3.3.1	Auswirkungen der Quecksilberkonzentrationen in der Nahrung .....	70
3.3.1.1	Nahrungsaufnahme der Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	70
3.3.1.2	Sterblichkeit der Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	72

3.3.2	Quecksilber in der Termite .....	73
3.3.2.1	Aufnahme von anorganischem Quecksilber.....	73
3.3.2.2	Gesamtquecksilber im Termitengewebe .....	74
3.3.2.3	Methylquecksilber im Termitengewebe .....	76
3.3.3	Sulfat-reduzierende Bakterien im Intestinaltrakt.....	78
3.3.3.1	Nachweis von Schwefelintermediaten .....	78
3.3.3.2	Quecksilbermethylierung durch eine Reinkultur.....	79
4	Diskussion.....	80
4.1	Methylquecksilberbestimmung .....	80
4.2	Quecksilbermethylierung im Faulschlamm .....	85
4.2.1	Zeitversuch.....	85
4.2.2	Hemmstoffversuche .....	86
4.3	Quecksilberfütterung der Termite <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	88
4.3.1	Auswirkungen der Quecksilberkonzentrationen in der Nahrung .....	88
4.3.1.1	Nahrungsaufnahme der Termite <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	88
4.3.1.2	Sterblichkeit der Termite <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	89
4.3.2	Quecksilber in der Termite .....	90
4.3.2.1	Aufnahme von anorganischem Quecksilber.....	90
4.3.2.2	Gesamtquecksilber im Termiten .....	91
4.3.2.3	Methylquecksilber im Termiten .....	93
4.3.3	Sulfat-reduzierende Bakterien im Intestinaltrakt.....	97
4.3.3.1	Nachweis von Schwefelintermediaten .....	97
4.3.3.2	Quecksilbermethylierung durch eine Reinkultur.....	98
5	Zusammenfassung.....	101
7	Literaturverzeichnis .....	104

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Biogeochemischer Quecksilberkreislauf. ....	8
Abb. 2: Struktur des Methylcobalamins. . ....	12
Abb. 3: Abbau von komplexen organischen Verbindungen. ....	23
Abb. 4: Schematische Darstellung eines Faulturms. ....	25
Abb. 5: Stammbaum der Termiten (MADDISON, 2002). ....	26
Abb. 6: Termitenkönigin ( <i>Macrotermes bellicosus</i> ) mit Arbeitern. ....	27
Abb. 7: Darmtrakt der Termiten <i>Kaloterme flavicollis</i> . ....	28
Abb. 8: Lignocelluloseabbau in der Gärkammer der Termiten. ....	30
Abb. 9: Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> . ....	31
Abb. 10: Purge&Trap Gaschromatograph-Atomfluoreszenzspektrometer. ....	45
Abb. 11: Aufarbeitungsschema zur Gesamtquecksilberbestimmung. ....	53
Abb. 12: Chromatogramm der Quecksilberspezies bei kontinuierlicher Aufheizung der Kapillarsäule. ....	61
Abb. 13: Chromatogramm der Quecksilberspezies bei diskontinuierlicher Aufheizung der Kapillarsäule. ....	62
Abb. 14: Aufarbeitungsschema zur Methylquecksilberbestimmung. ....	63
Abb. 15: Normierte Methylquecksilbersignalintensitäten der Aliquote einer Probe. .	64
Abb. 16: Methylquecksilberbildung im Faulschlamm . ....	67
Abb. 17: Methylquecksilberbildung in Faulschlammkulturen bei spezifischer Hemmung verschiedener Organismengruppen. ....	69
Abb. 18: Quecksilberaufnahme über die Nahrung. ....	73
Abb. 19: Methylquecksilberkonzentration im Termitengewebe. ....	76
Abb. 20: Methylquecksilberakkumulation im Termiten. ....	77

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Akute toxische Dosis ausgewählter Quecksilberverbindungen. ....	4
Tab. 2:	Gesamt- und Methylquecksilberkonzentrationen in verschiedenen Umweltkompartimenten.....	6
Tab. 3:	Quecksilber in der Nahrungskette. ....	10
Tab. 4:	Gase.....	33
Tab. 5:	Flüssigkeiten .....	33
Tab. 6:	Feststoffe.....	34
Tab. 7:	Kupfersulfatlösung.....	36
Tab. 8:	Schwefelsaure Kaliumbromidlösung.....	36
Tab. 9:	Natriumacetatpuffer .....	36
Tab. 10:	Natriumtetrapropylborat.....	37
Tab. 11:	HEPES Puffer.....	37
Tab. 12:	Monobrombimanlösung .....	37
Tab. 13:	Methansulfonsäurelösung .....	37
Tab. 14:	Methylquecksilberchloridlösung.....	37
Tab. 15:	Ethylquecksilberchloridlösung .....	38
Tab. 16:	Quecksilberchloridlösung .....	38
Tab. 17:	Natriummolybdatlösung.....	38
Tab. 18:	Bromethansulfonsäurelösung.....	38
Tab. 19:	Cycloheximidlösung.....	38
Tab. 20:	DSMZ -Medium 63 (modifiziert).....	39
Tab. 21:	Postgate Medium D (modifiziert) .....	39
Tab. 22:	Vitaminlösung 141 .....	40
Tab. 23:	Spurenelementlösung SL-10 .....	40
Tab. 24:	Pipetierschema zur Herstellung von quecksilberhaltigem Sägemehl .....	43
Tab. 25:	Bezeichnung des Gerätetyps .....	47
Tab. 26:	Betriebsparameter des ICP-MS.....	52
Tab. 27:	Methylquecksilbersignalintensitäten in Aliquoten. ....	60
Tab. 28:	Ermittelte Methylquecksilberkonzentration im CRM 463. ....	65
Tab. 29:	Wiederfindungsrate von Methylquecksilber in Bakterienkulturen .....	66
Tab. 30:	Mittlere Sägemehlaufnahme der Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	71
Tab. 31:	Relative Sterblichkeit der Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> .....	72
Tab. 32:	Gesamtquecksilberkonzentration und Akkumulation in der Termiten <i>Mastotermes darwiniensis</i> . ....	74
Tab. 33:	Schwefelintermediate im Intestinaltrakt von <i>Mastotermes darwiniensis</i> . ...	78
Tab. 34:	Gesamtquecksilberkonzentration in Invertebraten.....	92
Tab. 35:	Methylquecksilberkonzentration und Methylquecksilberanteil in terrestrischen Invertebraten und aquatischen Insekten.....	94
Tab. 36:	Methylquecksilberbildende Mikroorganismen aus dem menschlichen Intestinaltrakt .....	100

# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mikrobielle Speziesumwandlung von anorganischem Quecksilber zu Methylquecksilber untersucht. Dies ist von besonderem Interesse, da durch die Aufnahme des sehr toxischen Methylquecksilbers bei Menschen und Tieren folgenschwere Vergiftungen hervorgerufen werden, die bis zum Tode führen können (MASON UND BENOIT, 2003). Die Bildung des Methylquecksilbers kann sowohl auf biotischem als auch auf abiotischem Weg erfolgen, wobei die Quecksilbermethylierung überwiegend durch Mikroorganismen katalysiert wird (BERMANN UND BARTHA, 1986). Als hauptverantwortliche Bakteriengruppe für die Quecksilbermethylierung wurden insbesondere in Sedimenten Sulfat-reduzierende Bakterien identifiziert (COMPEAU UND BARTHA, 1985; PAK UND BARTHA, 1998). Aus diesem Grund könnte es von Bedeutung sein, die Methylquecksilberbildung in weiteren Lebensräumen von Sulfat-reduzierenden Bakterien zu untersuchen. Hierbei stellt das Intestinalsystem der Termiten aufgrund der hohen Individuenzahl von weltweit ca.  $2,4 \times 10^{17}$  Tieren (ZIMMERMANN ET AL., 1982) ein bedeutendes Untersuchungsfeld dar. Ein weiterer Lebensraum für Sulfat-reduzierende Bakterien sind Faulschlämme, die bei der Faulung von Klärschlämmen in erheblichen Mengen anfallen. Insgesamt werden in Deutschland ca. 75 % der über eine Million Mg Klärschlamm (Trockengewicht) dem Faulprozess unterzogen (DURTH ET AL., 2005). Zur Untersuchung der Methylquecksilberbildung wurde exemplarisch die australische Termitenart *Mastotermes darwiniensis* sowie der Faulschlamm des Klärwerks Mainz-Mombach als Probenmaterialien verwandt.

## 1.1 Quecksilber

Quecksilber gehört neben Gold, Silber, Kupfer, Zinn, Blei und Eisen zu den sieben bereits im Altertum bekannten Metallen. Die erste schriftliche Erwähnung stammt von Theophrast (372 v. Chr. – 287 v. Chr.). Er beschreibt die Quecksilbergewinnung aus Zinnober (HgS) durch Verreiben mit Essig in einem Bronzemörser. Weiterhin findet man Berichte von Dioskurides (1. Jh. n. Chr.) und Plinius (23 n. Chr. – 79 n. Chr.) über die Quecksilbergewinnung aus Zinnober durch thermische Zersetzung. Der Zinnober wurde bereits im römischen Reich, im alten Peru und in China als Schminke und als Malerfarbe verwandt. Im Mittelalter wurde Quecksilber zur Edelmetallgewinnung nach dem Amalgamverfahren benutzt und von Alchemisten für ihre Versuche

zur Goldherstellung eingesetzt. Auch für medizinische Zwecke wurde Quecksilber eingesetzt. Bereits 1527 beschreibt Paracelsus den Einsatz von quecksilberhaltigen Salben zur Behandlung von Syphilis (OF CREMONA UND STEELE 1929; ADAM ET AL., 1980; RÖMPP, 1995).

Aufgrund seiner besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften bestanden über die Natur des Quecksilbers recht unterschiedliche Vorstellungen. Erst als 1759 der Schmelzpunkt des Quecksilbers entdeckt wurde, konnte es eindeutig als Metall identifiziert werden (ADAM ET AL., 1980).

### 1.1.1 Chemische und physikalische Eigenschaften von Quecksilber

Quecksilber ist ein metallisches Element aus der II. Nebengruppe des Periodensystems der Elemente mit dem Symbol Hg und der Ordnungszahl 80. Das silbrig-glänzende Schwermetall besitzt eine Dichte von  $13,6 \text{ g/cm}^3$ . Mit einem Schmelzpunkt von  $-38,89 \text{ °C}$  ist Quecksilber das einzige bei Raumtemperatur flüssige Metall. Bei einer Temperatur von  $357,3 \text{ °C}$  fängt Quecksilber an zu sieden. Aufgrund des hohen Dampfdrucks von  $13,6 \text{ mg/m}^3$  bei  $20 \text{ °C}$  verdampfen bei Raumtemperatur bereits größere Mengen Quecksilber als atomares  $\text{Hg}^0$ . Insgesamt treten sieben stabile Quecksilberisotope auf. Dies sind  $^{196}\text{Hg}$  (0,14 %),  $^{198}\text{Hg}$  (10,02 %),  $^{199}\text{Hg}$  (16,84 %),  $^{200}\text{Hg}$  (23,13 %),  $^{201}\text{Hg}$  (13,22 %),  $^{202}\text{Hg}$  (29,80 %) und  $^{204}\text{Hg}$  (6,85 %). Das daraus resultierende mittlere Atomgewicht beträgt  $200,59 \text{ g/mol}$  (RÖMPP, 1995).

In anorganischen Verbindungen liegt Quecksilber in der Oxidationsstufe +I oder +II vor. Dabei tritt Quecksilber(I) nur bimolekular in Hg-Hg-Bindungen auf. Neben den anorganischen Quecksilberspezies existieren auch organische Quecksilberverbindungen. Diese liegen fast ausnahmslos in der Oxidationsstufe +II vor. Die organometallischen Quecksilberverbindungen können als Monoorganyl ( $\text{RHgX}$ ) oder Diorganyl ( $\text{R}_2\text{Hg}$ ) vorkommen. So kann man in der Natur beispielsweise Mono- und Dimethylquecksilber nachweisen. Hierbei besitzen die Quecksilber-Kohlenstoffverbindungen aufgrund der ähnlichen Elektronegativität von Quecksilber und Kohlenstoff einen kovalenten Charakter (ADAM ET AL., 1980; RÖMPP, 1995).

Eine besondere Eigenschaft von anorganischen und organischen Quecksilberverbindungen ist ihre ausgesprochene Thiophilie. So zählt zum Beispiel das Quecksil-

ber(II)sulfid mit einem Löslichkeitsprodukt von  $4 \times 10^{-53}$  mol/L bei 20 °C zu einer der schwerlöslichsten Verbindungen (KÜSTER UND THIEL, 1985).

### 1.1.2 Toxizität von Quecksilber

Quecksilber ist ein sehr toxisches Element. Allerdings unterscheidet sich seine toxische Wirkung in Abhängigkeit von der vorliegenden Spezies, dem Aufnahmeweg, der Konzentration sowie der Expositionsdauer (ADAM ET AL., 1980).

Beim Einatmen wird elementares Quecksilber zu 80 % über die Lunge in den Körper aufgenommen. Dabei treten akute Vergiftungen schon bei einer Konzentration von 1,2 mg Hg/m<sup>3</sup> Luft auf. Auch die Inhalation von quecksilberionenhaltigem Staub führte beispielsweise bei Hutmachern zu chronischen Quecksilbervergiftungen. Diese zeigten sich durch Muskelzittern und psychische Störungen. Zum Schutz von Beschäftigten ist daher seit 1979 die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) auf 0,1 mg Quecksilber pro m<sup>3</sup> Raumluft festgesetzt (ADAM ET AL., 1980; GREENWOOD UND VON BURG, 1984).

Im Gegensatz zum elementaren Quecksilber gelangt der überwiegende Teil der anorganischen und organischen Quecksilberverbindungen über den oralen Aufnahmeweg in den Körper (GREENWOOD UND VON BURG, 1984). Hierbei hängt die Toxizität der einzelnen Quecksilberspezies von der Resorptionsrate ab. Gelöstes anorganisches Quecksilber wird zu ca. 7 % über die Darmwand resorbiert (STREIT, 1991). Folglich nimmt die Toxizität für anorganische Quecksilbersalze mit zunehmender Löslichkeit der Salze zu (RÖMPP, 1995). Die organischen Quecksilberverbindungen werden im Magen zum Teil zu anorganischem Quecksilber zersetzt. Dies erfolgt bei größeren organischen Resten leichter als bei kurzkettigen. So wird Methylquecksilber im Magen nicht zersetzt und kann zu ca. 95 % über die Darmwand resorbiert werden (ADAM ET AL., 1980). Aufgrund dieser Eigenschaft ist die Toxizität von Methylquecksilber deutlich höher als die von anderen Quecksilberverbindungen.

Die Unterschiede in der akuten toxischen Wirkung einiger Quecksilberverbindungen sind in Tab. 1 als Letaldosis (LD) in Form von LD<sub>50</sub> und LD<sub>low</sub>-Werten dargestellt. Hierbei versteht man unter dem LD<sub>50</sub>-Wert die Quecksilberdosis, bei der die Hälfte

aller Versuchstiere stirbt. Der  $LD_{low}$ -Wert gibt die Quecksilbermenge an, bei der die ersten Todesfälle auftreten (GELDMACHER-VON MALLINCKRODT, 1984).

**Tab. 1: Akute toxische Dosis ausgewählter Quecksilberverbindungen.**

Verbindung	Ratte $LD_{50}$ <sup>*)</sup> [mg/kg]	Mensch $LD_{low}$ <sup>*)</sup> [mg/kg]
Quecksilber(I)chlorid	210	5
Quecksilber(II)chlorid	37	29
Methylquecksilberchlorid	10	5
Ethylquecksilberchlorid	40	5
Phenylquecksilberchlorid	60	5

<sup>\*)</sup> Letaldosis bei oraler Aufnahme; (GREENWOOD UND VON BURG, 1984)

Im letzten Jahrhundert kam es durch die Aufnahme von organischen Quecksilberverbindungen zu mehreren Massenvergiftungen. So führte beispielsweise das Einleiten von quecksilberhaltigen Abwässern aus der Acetaldehydherstellung in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts zu einer Vergiftung der Bevölkerung an der Minamatabucht in Japan. Durch den Verzehr von Fischen, die durch die Akkumulation von Organoquecksilberverbindungen aus den Abwässern einen hohen Quecksilbergehalt besaßen, kam es bis heute offiziell zu mehr als 2.200 Erkrankungen und 900 Todesfällen. Die Anzahl der tatsächlichen Opfer dürfte allerdings weitaus höher sein (McCURRY, 2006). Im Irak führte der Verzehr von Brot, welches aus Ethylquecksilber-*p*-toluensulfonanilid gebeiztem Saatgut hergestellt wurde, bei mehr als 6.000 Menschen zu einer Quecksilbervergiftung. Die Anzahl der Todesopfer wird mit 459 angegeben (AL-TIKRITI UND AL-MUFTI, 1976).

Aufgrund des hohen Gefährdungspotenzials durch Quecksilber wurde ein gesetzlicher Grenzwert für die Quecksilberaufnahme festgesetzt. Nach den Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sollten pro Woche nicht mehr als 0,3 mg Quecksilber aufgenommen werden, wobei hiervon maximal 0,2 mg methylierte Quecksilberverbindungen sein dürfen (ADAM ET AL., 1980). Eine höhere Aufnahme führt unter anderem zu einer Schädigung des zentralen und peripheren Nervensystems. Die Folgen einer Vergiftung zeigen sich beispielsweise in Koordinationsstörungen der Muskelbewegungen (Ataxie), Einschlafen von Gliedern (Parästhesie), Ge-

sichtsfeldeinengungen, Hörverlusten und Sprachstörungen, wie Stammeln und Stottern (GREENWOOD UND VON BURG, 1984; CLARKSON ET AL., 2003).

Die toxische Wirkung von Quecksilber wird unter anderem durch die Thiophilie des Metalls hervorgerufen. Durch die Bindung an Thio- und Disulfidgruppen von Proteinen werden die Strukturen der Proteine verändert und die aktiven Zentren blockiert (GREENWOOD UND VON BURG, 1984). Die nervenschädigende Wirkung beruht auf einer Störung des Leitungsmechanismus an den Synapsen der Nervenzellen (ADAM ET AL., 1980).

Die im Vergleich zu anderen Quecksilberspezies höhere Toxizität von Methylquecksilber resultiert neben der höheren Resorptionsrate aus seiner Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke sowie die Plazenta-Schranke zu überwinden. Hierdurch kommt es zur Akkumulation von Quecksilber im Gehirn und im Fötus. Dabei hat das Quecksilber im Gehirn eine längere Verweildauer, während es im Körper eine biologische Halbwertszeit von ca. 70 Tagen besitzt, liegt diese im Gehirn bei ca. einem Jahr (STREIT, 1991).

### **1.1.3 Quecksilber in der Umwelt**

Quecksilber ist ein seltenes Element, dessen Anteil am Aufbau der Erdkruste nur ca.  $4 \times 10^{-5}$  Gewichtsprozent ausmacht (ADAM ET AL., 1980). Trotzdem gelangen jedes Jahr größere Mengen an Quecksilber sowohl durch natürliche als auch durch anthropogene Prozesse in die Umwelt. In der Literatur unterscheiden sich die Angaben über die jährlich in die Umwelt freigesetzten Quecksilbermengen. Sie liegen in einem Bereich von 44.000 t bis 218.000 t (ADAM ET AL., 1980; STREIT, 1991; RÖMPP, 1995). Der anthropogene Anteil des in die Umwelt eingetragenen Quecksilbers wird von verschiedenen Autoren ebenfalls unterschiedlich beurteilt. Die Angaben liegen in einer Bandbreite von 12 % bis 75 % (STREIT, 1991; FITZGERALD, 1995).

Der überwiegende Teil des natürlichen Quecksilbereintrags stammt aus Vulkanausbrüchen und dem Ausdampfen aus der Erdkruste. Die anthropogenen Quecksilbermengen resultieren aus der Verarbeitung von quecksilberhaltigen Erzen und dem Verbrennen fossiler Brennstoffe. Auch durch die industrielle Verwendung von Quecksilber, zum Beispiel als Kathodenmaterial in der Chlor-Alkali-Elektrolyse oder in Form von Farben, Fungiziden, Batterien und Amalgam, gelangt es in die Umwelt

(ADAM ET AL., 1980; BARKAY ET AL. 2003). Insgesamt führte das über die Zeit aus anthropogenen Quellen freigesetzte Quecksilber zu einer Erhöhung der Gesamtquecksilberkonzentration in verschiedenen Umweltkompartimenten. Dies konnte durch vergleichende Bestimmungen der Quecksilberkonzentrationen in der Atmosphäre (SLEMR UND LANGER, 1992), in Sedimenten (LOREY UND DRISCOLL, 1999; FITZGERALD ET AL., 2005) und in Eiskernen (SCHUSTER ET AL., 2002) nachgewiesen werden. Aufgrund des verminderten Einsatzes von Quecksilber in der Industrie geht der anthropogene Quecksilbereintrag seit 1989 geringfügig zurück (PIERRONE ET AL., 1996; SCHUSTER ET AL., 2002).

Das in die Umwelt freigesetzte Quecksilber tritt in allen Umweltkompartimenten (Atmosphäre, Wasser, Boden (Sedimente)) auf. Allerdings unterscheiden sich die Gesamtquecksilberkonzentrationen sowie die Spezieszusammensetzungen in den verschiedenen Kompartimenten zum Teil erheblich voneinander. Eine Übersicht über die Gesamtquecksilber- sowie Methylquecksilberkonzentrationen in verschiedenen Lebensräumen ist in Tab. 2 dargestellt.

**Tab. 2: Gesamt- und Methylquecksilberkonzentrationen in verschiedenen Umweltkompartimenten.**

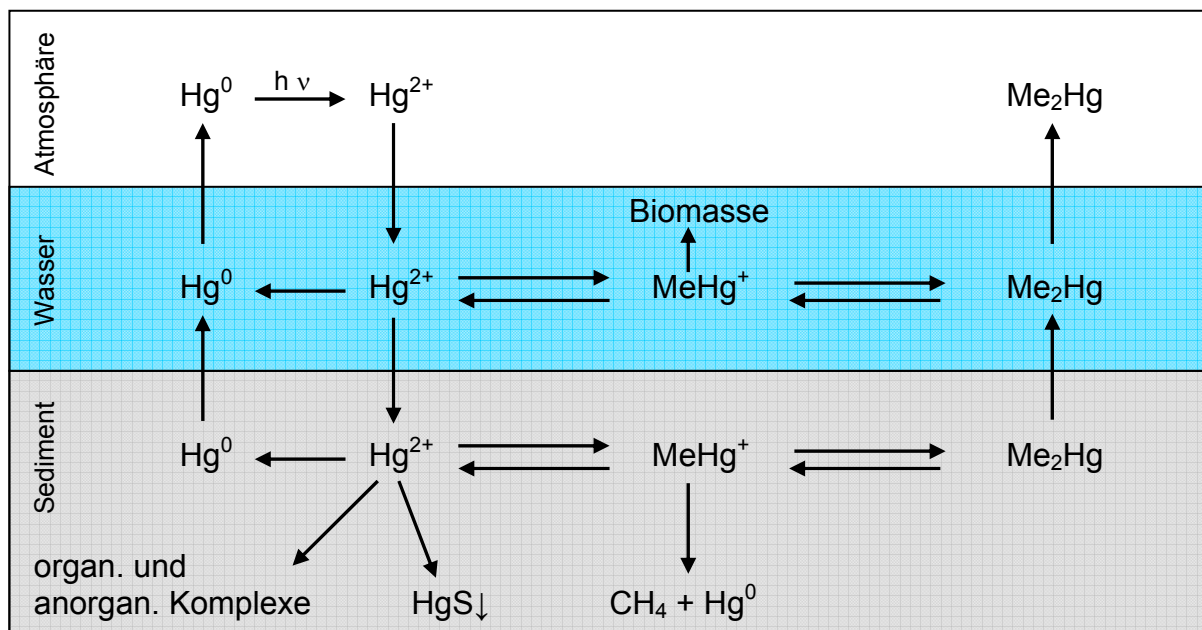
Umweltkompartiment	Gesamtquecksilber	Methylquecksilber	Referenz
<b>Atmosphäre</b>			
	[ng/m <sup>3</sup> ]	[pg/m <sup>3</sup> ]	
<b>Skandinavien</b>			
Mittelwert	2 - 4		PETERSON ET AL. (1995)
Maximum	10		
<b>Ozeanen</b>			
Nördliche Hemisphäre	1,96		SLEMR UND LANGER (1992)
Südliche Hemisphäre	1,33		
Atlantik (50°N-26°S)		3 - 508	SCHEDLBAUER (1998)
<b>Wasser</b>			
	[ng/L]		
<b>Meerwasser</b>			
	< 4		FITZGERALD UND CLARKSON (1991)
	0,1 - 1,0		HARMS UND BUNKE (2002)
Nord-Atlantik	1,55 - 4,25		MASON ET AL. (1995a)

## Fortsetzung Tab. 2

Umwelt-kompartiment	Gesamt-quecksilber	Methyl-quecksilber	Referenz
<b>Wasser</b>			
	[ng/L]		
Flusswasser	1 - 5		RÖMPP (1995)
Nebenflüsse des Carson			
Unbelastete Bereiche	3,8		FISCHER UND GUSTIN (2002)
Belastete Bereiche	max. 13,4		
See			
Michigansee	0,32	5 - 10	MASON UND SULLIVAN (1997)
kleine mesotrophe Seen in Vilas County	0,5 - 4,4	0,04 - 0,8	WATRAS ET AL. (1998)
Niederschläge	1 - 100		LINDQVIST ET AL. (1991), SCHEDLBAUER (1998)
Skandinavien			
Mittelwert	20 - 40		FITZGERALD UND CLAKSON (1991)
Maximum	100		
Regen		59 - 224	PETERSON ET AL. (1995)
Schnee		< 5 - 80	
Grundwasser	0,5 - 15		LINDQVIST ET AL. (1991)
<b>Böden und Sedimente</b>			
	[mg/kg]	[%]*)	
Boden	0,04 - 15,0		ADAM ET AL. (1980)
Unbelasteter Boden	0,02 - 0,55		
Sedimente			
See (Adirondack Lakes)			
Untere Sedimentschicht	0,08 - 0,20		LOREY UND DRISCOLL (1999)
Obere Sedimentschicht	0,18 - 0,50		
Nord-Alaska (Toolik LTER)	0,032 - 0,186		FITZGERALD ET AL. (2005)
Sedimentschicht der Nebenflüsse des Carson			
Unbelastet	0,04 - 0,07	0,06 - 13	FISCHER UND GUSTIN (2002)
Belastet	0,1 - 0,4		

\*) Anteil Methylquecksilber an Gesamtquecksilber

Zwischen den einzelnen Umweltkompartimenten findet ein ständiger Austausch von verschiedenen Quecksilberspezies statt. Außerdem werden die Quecksilberspezies innerhalb der einzelnen Kompartimente ineinander umgewandelt. Diese Austausch- und Umwandlungsprozesse sind schematisch im biogeochemischen Quecksilberkreislauf dargestellt (Abb.1).



**Abb. 1: Biogeochemischer Quecksilberkreislauf** (MADIGAN ET AL., 2003).

In der Atmosphäre liegt Quecksilber zu 90 % bis 95 % als elementares Quecksilber vor. Daneben treten beispielsweise noch anorganisches Quecksilber und Dimethylquecksilber auf (PETERSEN ET AL., 1995). Durch trockene oder nasse Deposition werden insbesondere die löslichen Quecksilberspezies aus der Atmosphäre in den Wasserkörper oder in den Boden transportiert. Durch Ausgasung aus dem Boden und dem Wasser gelangt das Metall überwiegend als elementares Quecksilber in die Atmosphäre (BARKAY ET AL., 2003). Hier wird es erneut zu Quecksilber(II) oxidiert (PETERSEN ET AL., 1995).

Im Wasser tritt Quecksilber am häufigsten als anorganisches Quecksilber auf, welches entweder gelöst oder an Partikel gebunden vorliegt (LOGAR ET AL., 2002). In deutlich geringeren Mengen lassen sich Methylquecksilber und elementares Quecksilber nachweisen. Auch in Böden und Sedimenten liegt das Quecksilber überwiegend in anorganischer Form vor. Hiervon ist ein großer Teil, z.B. in Form des schwerlöslichen Quecksilbersulfids oder an organische Strukturen, gebunden. Dies führt zu

einer Fixierung des Quecksilbers in Böden und Sedimenten (EBINGHAUS ET AL., 1994). Sowohl im Wasserkörper als auch im Boden (Sediment) unterliegen die verschiedenen Quecksilberspezies biotischen und abiotischen Umwandlungsprozessen. Hierbei wird anorganisches Quecksilber entweder zu Mono- oder Dimethylquecksilber methyliert oder zu elementarem Quecksilber reduziert. Die Methylierung von anorganischem Quecksilber erfolgt zu über 90 % über biotische Prozesse (BERMANN UND BARTHA, 1986). Diese wurden erstmals durch JENSEN UND JERELÖV (1969) im Sediment beschrieben. Inzwischen wurden verschiedene Bakterien, Pilze und Algen als Methylquecksilberproduzenten identifiziert (ROBINSON UND TUOVINEN, 1984; PONGRATZ UND HEUMANN, 1998). Eine Demethylierung von Organoquecksilberverbindungen findet ebenfalls durch biotische und abiotische Prozesse statt. Dabei kann die biotische Demethylierung sowohl durch einen reduktiven als auch oxidativen Prozess erfolgen. Während durch die oxidative Demethylierung hauptsächlich Kohlendioxid sowie geringe Mengen Methan entstehen, sind die Endprodukte der reduktiven Demethylierung Methan und elementares Quecksilber (BARKEY ET AL., 2003). Auch die Reduktion von anorganischem Quecksilber(II) zu elementarem Quecksilber wird hauptsächlich von Bakterien und Algen katalysiert (MASON ET AL., 1995b).

#### **1.1.4 Quecksilberakkumulation in Organismen**

Quecksilber wird in Organismen akkumuliert. Hierbei nimmt die Quecksilberkonzentration in den Organismen mit zunehmender Trophieebene zu (Tab. 3). So steigt beispielsweise die Quecksilberkonzentration in Raubfischen im Vergleich zum umgebenden Wasser um das Millionenfache an (WATRAS UND BLOOM, 1992).

Die größte Biokonzentration des Quecksilbers findet auf der Stufe des Phytoplanktons statt. Dabei werden das Methylquecksilber und das anorganische Quecksilber(II) gleichermaßen als ungeladene, lipophile Chlorid-Komplexe durch das Phytoplankton aufgenommen (WATRAS UND BLOOM, 1992; MASON ET AL., 1995c, 1996). Durch die passive Quecksilberaufnahme wird das Quecksilber um den Faktor  $10^5 - 10^6$  im Phytoplankton angereichert (MASON ET AL., 1995c; HARMS UND BUNKE, 2002).

Durch einen effektiveren Transfer von Methylquecksilber über die Nahrungskette steigt mit zunehmender Trophieebene neben der Gesamtquecksilberkonzentration auch das Methyl- zum Gesamtquecksilber-Verhältnis an (SPRY UND WIENER, 1991; WATRAS UND BLOOM, 1992; MASON UND SULLIVAN, 1997; WATRAS ET AL., 1998). Dies gilt sowohl für Vertebraten als auch für Invertebraten (RIISGÅRD UND FAMME, 1986). In Tab. 3 sind die Gesamtquecksilberkonzentrationen sowie der Anteil an Methylquecksilber für verschiedene Organismengruppen dargestellt.

**Tab. 3: Quecksilber in der Nahrungskette (HARMS UND BUNKE, 2002).**

Organismus	Gesamtquecksilber- konzentration [ng/g]	Anteil MeHg <sup>+</sup> am Gesamtquecksilber [%]
Phytoplankton	10 - 100	10
Makrophyten	20 - 120	15
Mollusca (Weichtiere)	20 - 2.600	30
Crustacea	60 - 1.700	40
Annelida	10 - 400	40
Fische (Hering, Kabeljau, Schellfisch, Scholle)	30 - 4.300	95
Thunfisch	150 - 7.500	98
Meeressäuger		
Muskelgewebe	30 - 6.100	98
Leber	500 > 10.000	98 < 10 <sup>*)</sup>

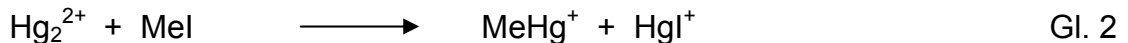
<sup>\*)</sup> Bei alten Tieren erfolgt ein Abbau des Methylquecksilbers zu anorganischem Quecksilber über eine Demethylierung in der Leber.

Zwischen den einzelnen Trophieebenen liegt der typische Faktor für die Biomagnifikation von Methylquecksilber in einem Bereich von 3 bis 4 (LINDQVIST ET AL., 1991; WATRAS UND BLOOM, 1992; MASON ET AL., 1995c; MASON UND SULLIVAN, 1997). Dadurch liegt bei Raubfischen, die am Ende der Nahrungskette stehen, der überwiegende Teil des Quecksilbers als Methylquecksilber vor (WATRAS UND BLOOM, 1992).

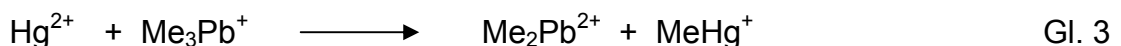
### 1.1.5 Quecksilbermethylierung

Methylierte Quecksilberverbindungen können sowohl durch biotische als auch abiotische Reaktionen entstehen. Von einer biotischen Quecksilbermethylierung spricht man, wenn die Übertragung der Methylgruppe innerhalb einer Zelle stattfindet. Im Gegensatz dazu wird die Methylgruppe bei einer abiotischen Methylierung außerhalb von Zellen übertragen (BENTLEY UND CHASTEEN, 2002).

Die abiotische Quecksilbermethylierung kann über verschiedene Reaktionstypen, wie beispielsweise Transalkylierungsreaktionen, erfolgen. Hierbei wird die Methylgruppe einer meist biogen produzierten Substanz auf Quecksilber übertragen. Als geeignete Methylendonatoren stehen beispielsweise Methyljodid (MeI) und Dimethylsulfat (DMS) zur Verfügung. Diese Substanzen übertragen ihre Methylgruppe über einen oxidativen Mechanismus auf elementares Quecksilber oder dimeres Quecksilber(I) (WEBER, 1993). Die Reaktionen sind in den Gleichungen 1 und 2 wiedergegeben.



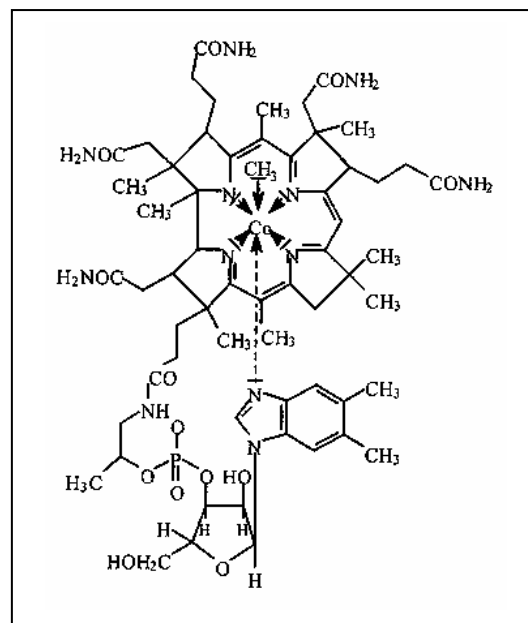
Eine weitere Transalkylierungsreaktion findet bei der Übertragung einer Methylgruppe durch andere Methylschwermetallverbindungen, wie beispielsweise Trimethylblei ( $\text{Me}_3\text{Pb}^+$ ), statt. Bei dieser Reaktion ändert sich die Oxidationsstufe des Quecksilbers nicht (Gleichung 3) (WEBER, 1993).



Bei der photochemischen Methylierung werden die Methylgruppen der Methylendonatoren unter Lichteinwirkung übertragen. Als geeignete Methylendonatoren stehen verschiedene Substanzen, wie Carbonsäuren, Alkohole, Ketone, Aminosäuren, Klärschlämme, Urin, Faeces und Industrieabwässer, zur Verfügung. Des Weiteren kann eine abiotische Methylierung unter Lichtausschluss durch Huminstoffe hervorgerufen werden (HAMASAKI ET AL., 1995).

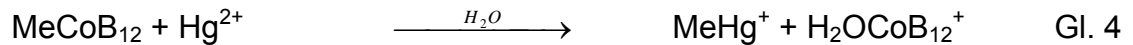
Auch für die Stoffwechselfvorgänge innerhalb von Zellen stehen verschiedene Substanzen für die Übertragung von Methylgruppen zur Verfügung. Die drei wichtigsten Überträger von Methylgruppen sind die Co-Enzyme N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat (CH<sub>3</sub>-THF), S-Adenosylmethionin (SAM) und Methylcobalamin (MeCoB<sub>12</sub>). Von diesen Co-Enzymen ist allerdings nur Methylcobalamin in der Lage, Quecksilber spontan zu methylieren (WOOD, 1984).

Methylcobalamin wird ausschließlich von Mikroorganismen synthetisiert. Es besitzt ein Corrin-Ringsystem mit vier reduzierten und voll substituierten Pyrrolringen, die um ein zentrales Kobaltion angeordnet sind. Dieses ist koordinativ an die Stickstoffatome der Pyrrolringe gebunden. Das Corrin-Ringsystem ist über Aminopropanol und Phosphat mit 5,6-Dimethylbenzimidazolribosid verknüpft. Über diese Seitenkette wird eine Brücke zum Kobaltion hergestellt (HARPER ET AL., 1975). Die Struktur des Vitamin B<sub>12</sub>-Derivats ist in Abb. 2 dargestellt.

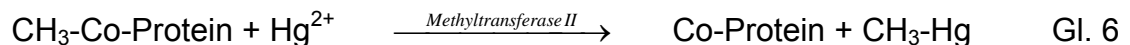
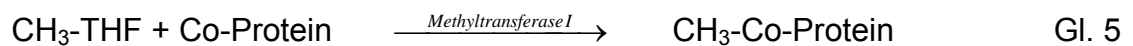


**Abb. 2: Struktur des Methylcobalamins** (HARPER ET AL., 1975).

Im Fall des Methylcobalamins (MeCoB<sub>12</sub>) ist das Kobaltion mit einer Methylgruppe substituiert. Diese Methylgruppe kann als Carbanion (CH<sub>3</sub><sup>-</sup>) durch einen elektrophilen Angriff auf Quecksilber(II) übertragen werden (DESIMONE ET AL., 1973). Beim Übergang der Methylgruppe wird die Oxidationsstufe des Quecksilbers nicht verändert. Der optimale pH-Wert dieser Reaktion liegt bei 4,5 (CHOI ET AL., 1994).



Aufgrund der Fähigkeit von Methylcobalamin, Methylgruppen spontan auf anorganisches Quecksilber zu übertragen, wurde zunächst ein Methylcorrinoidderivat als intrazelluläres Methylierungsreagenz postuliert (WOOD UND WANG, 1983). Allerdings zeigten die Untersuchungen von CHOI ET AL. (1994) an Zellextrakten von *Desulfovibrio desulfuricans* LS, dass die Quecksilbermethylierung in einem zweistufigen enzymatischen Prozess abläuft. Danach wird eine Methylgruppe zunächst von Methyltetrahydrofolat (CH<sub>3</sub>-THF) durch das Enzym Methyltransferase I auf ein Cobalaminprotein (Co-Protein) übertragen (Gleichung 5).



Dieses Protein besitzt, wie Methylcobalamin, ein Corrin-Ringsystem. Anschließend wird die Methylgruppe durch Methyltransferase II auf ein zweiwertiges Quecksilberion übertragen (Gleichung 6), wobei das Methylcobalaminprotein (CH<sub>3</sub>-Co-Protein) möglicherweise selbst als Methyltransferase II fungiert (CHOI ET AL., 1994).

### 1.1.6 Methylquecksilberanalysemethoden

Zum Nachweis von Methylquecksilber stehen verschiedene Analysemethoden zur Verfügung. Diese beruhen in der Regel auf einer Trennung der aus der Probenmatrix freigesetzten Quecksilberspezies durch Gas- oder Flüssigchromatographie (GC oder LC) und anschließender Detektion der Quecksilberspezies mit einem nachweisstarken und elementspezifischen Detektor. Hierzu werden häufig induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometer (ICP-MS), Atomemissionsdetektoren (AED) oder Atomabsorptionsdetektoren (AAD) verwendet (HINTELMANN, 1999).

Außerdem kann der Methylquecksilbernachweis mit einem Purge&Trap-Gaschromatograph-Atomfluoreszenzspektrometer durchgeführt werden. Bei dieser online gekoppelten Analysetechnik stellte die Kaltdampf-Atomfluoreszenz-Spektroskopie (Cold Vapour-Atomfluorescence-Spectroscopy, CV-AFS) eine nachweisstarke Methode zur Detektion von Quecksilber im Ultraspurenbereich dar. Durch die Koppelung des Atomfluoreszenzdetektors (AFD) mit einem Kapillargaschromatograph (Capillary Gaschromatograph, CGC) wird ein speziesspezifischer Nachweis von Quecksilberverbindungen erreicht. Die Probenaufgabe erfolgt über eine Purge&Trap-Einheit, bei der die flüchtigen oder derivatisierten Quecksilberverbindungen angereichert werden (BLOOM, 1989; ALLI ET AL., 1994).

Die Purge&Trap-Anreicherung ist eine dynamische Headspace-Technik. Hierbei werden die flüchtigen Analyten aus der Probelösung ausgetrieben, indem die Lösung kontinuierlich mit einem Inertgas (He, Ar, N<sub>2</sub>) durchströmt wird. Nachdem die Analyten in die Gasphase überführt wurden (purge), werden sie durch Ausfrieren oder Adsorption gesammelt (trap). Dies kann entweder in einer Kapillare, die auf sehr tiefe Temperaturen abgekühlt wird (DREISCH UND MUNSON, 1983), oder auf Adsorbentien erfolgen (MORITA ET AL., 1995). Um das Purge&Trap-Verfahren anwenden zu können, muss eine reproduzierbar hohe Ausgasausbeute gewährleistet sein. Dabei nimmt die Ausbeute mit einer zunehmenden Flüchtigkeit der zu analysierenden Substanzen sowie mit einem steigenden Verhältnis von Ausgas- zu Probenvolumen zu. Der Zusammenhang zwischen der Ausgasausbeute und dem Verhältnis von Ausgas- zu Probenvolumen lässt sich wie folgt beschreiben (HAGMAN UND JACOBSSON, 1988; ABEEL ET AL., 1994):

$$A = 1 - \frac{c}{c_0} = 1 - \exp\left(-\frac{H}{RT} \times \frac{V_G}{V_P}\right) \quad \text{Gl. 7}$$

$A$	= Ausgasausbeute	[-]
$c$	= Konzentration des Analyten nach dem Ausgasen	[ng/mL]
$c_0$	= Anfangskonzentration des Analyten	[ng/mL]
$H$	= Henry-Konstante des Analyten	[Pa m <sup>3</sup> /mol]
$R$	= Gaskonstante	[Pa m <sup>3</sup> /mol K]
$T$	= Temperatur	[K]
$V_G$	= Gasvolumen	[mL]
$V_P$	= Probenvolumen	[mL]

Die Probenaufgabe über eine Purge&Trap-Einheit bietet den Vorteil, dass die Analyten fast vollständig von der Probenmatrix abgetrennt werden. Hierdurch können Interferenzen bei der nachfolgenden Detektion nahezu vermieden werden. Des Weiteren wird bei einer direkten Probenaufgabe die Kontaminationsgefahr verringert und eventuelle Verluste vermieden. Außerdem ist es möglich, große Probenvolumina auszugasen, wodurch die Nachweisgrenze des Verfahrens verbessert wird (TANZER UND HEUMANN, 1992).

Die Kapillargaschromatographie ist eine Methode zur Auftrennung von flüchtigen Stoffgemischen. Die Trennung der Analyten beruht auf ihrer wiederholten Verteilung über einer gasförmigen mobilen Phase, dem so genannten Trägergas, und einer stationären Phase. Das Trägergas wird durch eine Stahl- oder Glaskapillare, mit einem Innendurchmesser von 0,1 mm bis 0,53 mm und einer Länge zwischen 10 m und 120 m geleitet. Diese Kapillare ist auf der Innenseite mit einem dünnen Film (0,17 µm bis 5,3 µm) beschichtet, der häufig aus unpolaren Methyl-Polysiloxanen besteht. In Abhängigkeit von den zu analysierenden Analyten kann die Polarität des Films durch eine Substitution der Methylgruppen mit beispielsweise Phenylgruppen erhöht werden. Die Trennleistung der Säule wird durch die Anzahl der theoretischen Böden charakterisiert. Diese lassen sich wie folgt berechnen:

$$N = 5,54 \times \left( \frac{t_{R_S}}{\delta_{t_{1/2}}} \right)^2 \quad \text{Gl. 8}$$

$N$	= Anzahl der theoretischen Böden	[-]
$t_{R_S}$	= Gesamtretentionszeit	[s]
$\delta_{t_{1/2}}$	= Halbwertsbreite des Peaks	[s]

Hierbei gilt, dass eine große Bodenzahl mit einer hohen Trennleistung einhergeht (KOLB, 1999). Die Beschreibung der Trennleistung kann auch über die „Bodenhöhe“ (height equivalent to theoretical plate, HETP) erfolgen, wobei mit geringer Höhe des theoretischen Bodens die Trennleistung zunimmt (KOLB, 1999).

$$HETP = \frac{L}{N} \quad \text{Gl. 9}$$

$HETP$	= Bodenhöhe	[cm]
$L$	= Länge der Säule	[cm]

Der Einfluss des Trägergases sowie des Trägergasflusses auf die theoretische Bodenhöhe wird mit Hilfe der van Deemter-Gleichung beschrieben (KOLB, 1999).

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \times u \quad \text{Gl. 10}$$

$A$	= Einfluss der Streudiffusion am Packmaterial	[cm]
$B$	= Einfluss der axialen molekularen Diffusion	[cm <sup>2</sup> /s]
$C$	= Einfluss der unvollständigen Gleichgewichtseinstellung	[s]
$u$	= Geschwindigkeit des Trägergases	[cm/s]

Die Geschwindigkeit des Trägergases kann aus der Totzeit und der Säulenlänge berechnet werden:

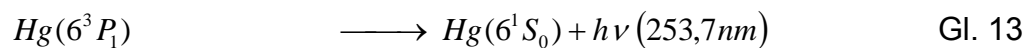
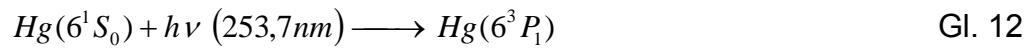
$$u = \frac{L}{t_0} \quad \text{Gl. 11}$$

$t_0$  = Totzeit [s]

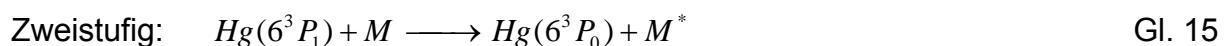
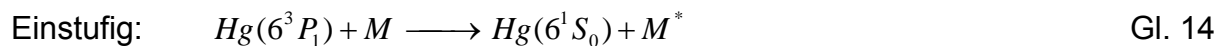
Zum Nachweis von Quecksilber kann die Atomfluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden. Bei dieser Methode werden die Elektronen der Analytotope durch Photonen des gleichen Elements auf ein höheres Energieniveau angehoben und anschließend die emittierte Fluoreszenzstrahlung detektiert. Dabei erfolgt die Messung des emittierten Fluoreszenzlichts im rechten Winkel zum eingestrahltten Anregungslicht. Hierdurch wird vermieden, dass das Anregungslicht ebenfalls detektiert wird. Als Atomfluoreszenzdetektor können sowohl dispersive als auch nicht-dispersive Detektoren verwandt werden. Bei einem nicht-dispersiven Detektor wird das Fluoreszenzlicht direkt von einem Photomultiplier detektiert, während bei einem dispersiven Atomfluoreszenzdetektor ein Monochromator zur Abtrennung von anderen Wellenlängen eingesetzt wird.

Zum Nachweis von Quecksilber mittels Atomfluoreszenzspektroskopie wird die Resonanzfluoreszenz des einatomigen elementaren Quecksilbers nach einer Anregung mit einer Quecksilberdampfampe bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Hierbei verhält sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der Atome (MORITA ET AL., 1995). Diese Methode setzt voraus, dass die verschiedenen Quecksilberspezies vor dem Eintritt in den Detektor in einen elementaren Quecksilberdampf überführt werden. Diese Reduktion und Atomisierung erfolgen entweder durch eine UV-Bestrahlung (HORVAT ET AL., 1988) oder über eine Pyrolyse der flüchtigen Quecksilberspezies unter Sauerstoffausschluss (BLOOM, 1989). Aufgrund der thermischen Instabilität der Organoquecksilberverbindungen bei höheren Temperaturen wird die Pyrolyse zur quantitativen Umsetzung bei einer Temperatur von über 800 °C durchgeführt.

Bei der Resonanzfluoreszenz wird ein Atom durch die Absorption eines Photons in einen energetisch höheren Zustand überführt (Gl. 12). Durch die Abgabe der Energie unter Freisetzung eines Photons geht das angeregte Atom wieder in seinen Grundzustand zurück (Gl. 13). Bei den Quecksilberatomen erfolgt die Anregung aus dem  $6^1S_0$  Grundzustand in den elektronisch angeregten  $6^3P_1$  Zustand.



Zum Transport der Quecksilberatome vom Pyrolyseofen in die Fluoreszenzzelle werden Edelgase eingesetzt, da durch andere Gase Quenching-Effekte auftreten können. Diese Interferenzen entstehen durch Stöße des angeregten Analyten mit anderen Gasmolekülen, wie organischen Stoffen, Kohlendioxid oder Stickstoff (NAKAHARA, 1978). Hierbei wird die Anregungsenergie in einem ein- oder zweistufigen Prozess strahlungslos abgegeben (Gl. 14-16). Dies führt zu einer Depression des Messsignals.



$M$  = interferierendes Molekül

$M^*$  = angeregtes interferierendes Molekül

### 1.1.7 Probenaufbereitung zur Methylquecksilberbestimmung

Biologische Probenmaterialien besitzen eine komplexe Matrix. Deshalb muss zur Quecksilberanalytik in diesen Probenmaterialien ein Aufschluss oder eine Extraktion durchgeführt werden, die eine Freisetzung der Quecksilberverbindungen gewährleistet. In der Literatur ist eine Vielzahl von Methoden zur Aufbereitung von Umweltpro-

ben mit komplexen Matrices (z.B. tierisches Gewebe, Sedimente und Böden) für die speziesspezifische Methylquecksilberbestimmung beschrieben.

Die erste praktikable Methode für einen Nachweis von Methylquecksilber wurde von WESTÖÖ (1966, 1967, 1968) für die Methylquecksilberbestimmung in verschiedenen Lebensmitteln wie beispielsweise Fisch, Eier, Fleisch und Leber entwickelt. Bei dieser Methode wird das Methylquecksilber im Probenmaterial durch die Behandlung mit 6 mol/L Salzsäure aus seiner Bindung an Matrixbestandteile als Methylquecksilberchlorid freigesetzt. Hierbei werden die bindenden Strukturen des Feststoffs, wie beispielsweise die Thiol-Gruppen der Proteine oder Huminstoffe, protoniert. Über einen nachfolgenden Extraktionsschritt wird das Methylquecksilberchlorid in eine organische Phase überführt, wobei der überwiegende Teil der Probenmatrix sowie des anorganischen Quecksilbers(II) abgetrennt wird. Die selektive Extraktion der Quecksilberspezies resultiert aus den Reaktionen der Quecksilberionen mit dem Halogenid. Während die monoalkylischen Quecksilberionen eine kovalente Bindung mit dem Halogenid eingehen, bildet das anorganische Quecksilber mit vier Halogenidionen einen Tetrachloromercurat(II)-Komplex ( $[\text{HgCl}_4]^{2-}$ ). Dabei ist die Affinität des komplexierten, weiterhin ionischen Quecksilbertetrahalogenids zu wässrigen Lösungen größer als zu organischen Lösemitteln. Im Gegensatz dazu besitzt das alkylierte Quecksilberhalogenid eine höhere Affinität zur organischen Phase (SIMPSON, 1961, LIANG ET AL., 1996). Als organisches Lösemittel verwandte WESTÖÖ (1966, 1967, 1968) Benzol. In den nachfolgenden Arbeiten wurde das weniger giftige Toluol bevorzugt (LONGBOTTOM ET AL., 1973). Prinzipiell bieten sich zur Extraktion des Methylquecksilbers vor allem polarere organische Lösungsmittel wie beispielsweise Dichlormethan, ein 3:2 Dichlormethan/Hexan-Gemisch oder ein 3:2 Ethylacetat/Pentan-Gemisch an (EBDON ET AL., 2002).

Anschließend führte WESTÖÖ (1966, 1967, 1968) einen Reinigungsschritt durch. Hierzu wird das Organoquecksilber als Cystein-Komplex in eine wässrige Phase überführt, aus der es dann durch eine Umsetzung mit Halogenwasserstoff erneut freigesetzt wird. Danach wird das Methylquecksilber wieder als Halogenid in ein organisches Lösemittel zurückextrahiert. Die Bestimmung des Methylquecksilbers erfolgte durch Gaschromatographie unter Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors (ECD).

Die Methode von WESTÖÖ (1966, 1967, 1968) wurde in zahlreichen nachfolgenden Arbeiten modifiziert. Durch die Verwendung von Bromid- oder Iodidverbindungen wurden lipophilere Komplexe gebildet, die eine vollständigere Extraktion von der wässrigen in die organische Phase gewährleisten. Darüber hinaus kann durch den Zusatz von Kupfer(II)sulfat die Freisetzung des Methylquecksilbers von organischen Komplexen unterstützt werden (LONGBOTTOM ET AL., 1973; MASON UND BENOIT, 2003).

Weitere Möglichkeiten zur Freisetzung des Methylquecksilbers bestehen in der Auflösung des Probenmaterials, beispielsweise durch eine Verseifung mit KOH und Methanol, einem basischen Aufschluss mit Tetramethylammoniumhydroxid und Methanol oder einer enzymatischen Lyse des Probenmaterials mit Trypsin (LIANG ET AL., 1996; TSENG ET AL., 1997; EBDON ET AL., 2002). Auch durch eine Wasserdampfdestillation kann das Methylquecksilber aus dem Probenmaterial abgetrennt werden. Hierbei wird die Wasserdampflichkeit der quecksilberorganischen Verbindungen ausgenutzt. Das Destillat kann durch weitere Extraktionsschritte gereinigt und anschließend der Methylquecksilbergehalt bestimmt werden. Dieses Verfahren zeichnet sich durch einen hohen Probenumsatz mit sehr guten Wiederfindungsraten aus (HORVAT ET AL., 1993a,b). Allerdings ist seit einiger Zeit bekannt, dass bei der Durchführung der Wasserdampfdestillation aus anorganischem Quecksilber artifizielles Methylquecksilber generiert werden kann. Insbesondere in Sedimenten mit einem hohen anorganischen Quecksilbergehalt erfolgt hierdurch häufig eine Überschätzung des tatsächlichen Methylquecksilbergehalts in der Probe (BLOOM ET AL., 1997; HINTELMANN ET AL., 1997).

Neben den Sedimentproben wurde eine artifizielle Methylquecksilberbildung auch in humusreichen Böden, Blättern und Bakteriensuspensionen beobachtet (BLOOM ET AL., 1997; HINTELMANN ET AL., 1997; HINTELMANN, 1999; FALTER, 1999). Dabei wird artifizielles Methylquecksilber nicht nur bei Destillationen gebildet, sondern kann bei hohen anorganischen Quecksilber(II)konzentrationen beispielsweise auch bei den zuvor beschriebenen Aufbereitungsmethoden mit KOH/Methanol oder durch die Methylquecksilberfreisetzung mit HCl auftreten (HINTELMANN, 1999). Im Gegensatz dazu wurde bei einer Probenaufbereitung mit Kupfersulfat und Kaliumbromid keine artifizielle Methylquecksilberbildung nachgewiesen (BLOOM ET AL., 1997; HINTELMANN, 1999).

Um das Methylquecksilber für eine gaschromatographische Auftrennung zur Verfügung zu stellen, werden die Methylquecksilberhalogenide häufig zu Diorganylen derivatisiert, um damit ein besseres chromatographisches Verhalten bei der GC-Analyse zu erreichen. Hierzu wird oftmals eine Alkylierungsmethode mit Natriumtetraethylborat bzw. Natriumtetrapropylborat in einer wässrigen Lösung oder eine etwas aufwendigere Prozedur mit einem Grignardreagenz in einer nicht-wässrigen Lösung durchgeführt (RAPSOMANIKIS, 1994).

## 1.2 Sulfat-reduzierende Bakterien

Viele Sulfat-reduzierende Bakterien (SRB) besitzen die Fähigkeit Quecksilber zu methylieren (EKSTROM ET AL., 2003). Allerdings stellen die SRB eine phylogenetisch uneinheitliche Gruppe dar, die sich auch morphologisch voneinander unterscheiden. Viele SRB sind oval bis stäbchenförmig. Innerhalb der Gattung *Desulfovibrio* treten vor allem Vibrionen auf. Daneben wurden auch filamentöse oder spirilloide SRB beschrieben (WIDDEL UND BAK, 1992).

Ein gemeinsames Merkmal von SRB ist die dissimilatorische Sulfatreduktion. Das heißt, dass sie ihre Energie durch anaerobe Sulfatatmung gewinnen. Hierbei werden im Gegensatz zur Sauerstoffatmung Sulfat oder andere Schwefelspezies anstelle von Sauerstoff als Elektronenakzeptoren genutzt. Das Endprodukt der Sulfatreduktion ist Sulfid. Dieses führt zu dem für SRB charakteristischen Schwefelwasserstoffgeruch und zu einer Schwarzfärbung des Habitats durch die Bildung von schwerlöslichem Eisensulfid (FRITSCHKE, 2002). Als Substrate werden hauptsächlich kurzkettige Carbonsäuren, wie Acetat, Lactat, Pyruvat und Succinat, sowie Ethanol, Fettsäuren und Wasserstoff verwendet. Diese Substrate stammen häufig aus Gärstoffwechselprodukten fermentativer Bakterien. Hinsichtlich ihrer Substratverwertung lassen sich die SRB in zwei Gruppen einteilen. Man unterscheidet die unvollständigen Oxidierer, deren Endprodukt Acetat ist, von den vollständigen Oxidierern, die ihre Substrate vollständig zu Kohlendioxid und Wasser mineralisieren. Aufgrund ihrer Fähigkeiten zur anaeroben Remineralisierung organischer Substanzen und zur Sulfatreduktion spielen sie sowohl im Kohlenstoff- als auch im Schwefelkreislauf eine bedeutende Rolle (FRITSCHKE, 2002).

Über vergleichende Untersuchungen des 16S rRNA-Gens (ca. 1.500 Nukleotide) ist es möglich, eine phylogenetische Charakterisierung von Mikroorganismen durchzuführen. Aufgrund dieser Sequenzanalysen können die SRB in vier verschiedene phylogenetische Gruppen eingeteilt werden. Dies sind (1) Gram-negative mesophile, (2) Gram-positive sporenbildende, (3) bakterielle thermophile und (4) archaeelle thermophile Sulfatreduzierer (CASTRO ET AL., 2000). Die umfangreichste Gruppe stellt die der Gram-negativen mesophilen Bakterien dar, die den  $\delta$ -Proteobakterien zugeordnet wird. Innerhalb der  $\delta$ -Proteobakterien können die SRB den Familien der Desulfovibrionaceae, Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae und Geobacteraceae zugeordnet werden (MADIGAN ET AL., 2003). Zur Familie der Desulfovibrionaceae gehören die beiden Gattungen *Desulfovibrio* und *Desulfomicrobium* (WIDDEL UND BAK, 1992).

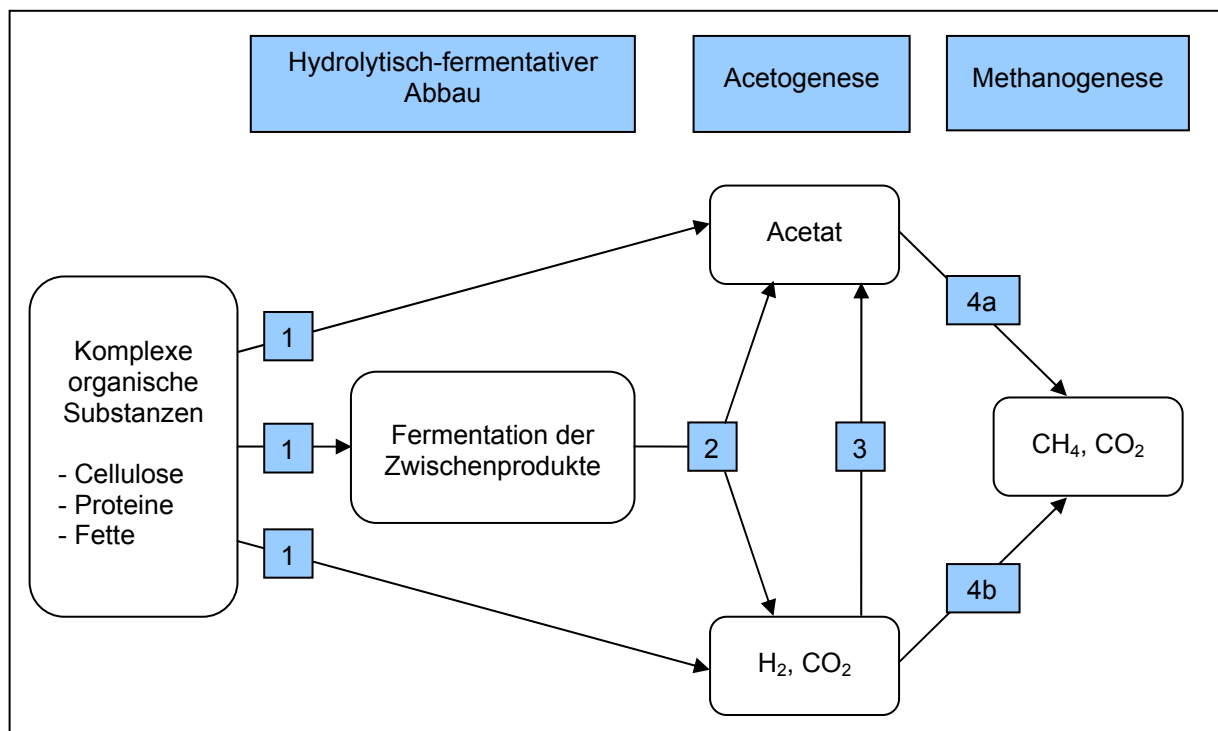
SRB sind häufig in marinen Habitaten anzutreffen (WIDDEL UND BAK, 1992; MADIGAN ET AL., 2003). Dort treten sie hauptsächlich in den anaeroben Zonen der oberen 4 cm des Sediments auf (DEVEREUX ET AL., 1996; LLOBET-BROSSA ET AL., 1998; 2002). In marinen Habitaten finden die SRB aufgrund der hohen Sulfatgehalte von ca. 28 mmol pro Liter Meerwasser optimale Lebensbedingungen (WIDDEL UND BAK, 1992). Ihr Anteil an der Gesamtbakterienpopulation im Sediment betrug in den Untersuchungen von PURDY ET AL. (2001; 2002) 10 % und von WIERINGA ET AL. (2000) 23 %. Aufgrund ihrer Häufigkeit können sie auch an bis zu 50 % der anaeroben Remineralisierung von organischen Substanzen beteiligt sein (JØRGENSEN, 1982). Neben den marinen Sedimenten sind Sulfat-reduzierende Bakterien auch in anoxischen Süßwassersedimenten, Klärschlämmen und im Intestinalsystem verschiedener Wirbeltiere sowie wirbelloser Tiere zu finden (HOWARD UND HUNGATE, 1976; GIBSON ET AL., 1988; TRINKERL ET AL., 1990; GEBHART ET AL., 1993; SASS ET AL., 1998). Die meisten der aus dem Intestinaltrakt von Menschen und Tieren isolierten SRB gehören zu der Gattung *Desulfovibrio* (KUHNIGK ET AL., 1996).

### **1.3 Faulschlamm aus der Abwasserreinigung**

Allgemein entstehen Faulschlämme durch den mikrobiellen Abbau komplexer organischer Substanzen unter anaeroben Bedingungen. Dieser Prozess findet unter natürlichen Bedingungen in anaeroben Sedimenten nährstoffreicher Gewässer und Sümpfen statt. Des Weiteren fallen Faulschlämme auch bei der Abwasserbehand-

lung an. Die Faulschlämme bestehen aus einer feinkörnigen Masse, die durch Metallsulfide grau bis tiefschwarz gefärbt sind (FRITSCH, 2002).

In den Faulschlämmen erfolgt eine Mineralisierung von hochkomplexen organischen Substanzen über die methanogene Nahrungskette. Diese Nahrungskette setzt sich aus vier verschiedenen physiologischen Bakteriengruppen zusammen. Nach ihrer Funktion lassen sich die Mikroorganismen in primäre und sekundäre Gärer sowie acetogene und methanogene Bakterien einteilen (FRITSCH, 2002).



**Abb. 3: Anaerober Abbau von komplexen organischen Verbindungen**

(BRYANT ET AL., 1977).

1 = hydrolytisch/fermentative Bakterien, 2 = obligat Wasserstoff produzierende Bakterien, 3 = homofermentative Essigsäurebakterien, 4a = Essigsäure verwertende methanogene Bakterien, 4b = Wasserstoff verwertende methanogene Bakterien.

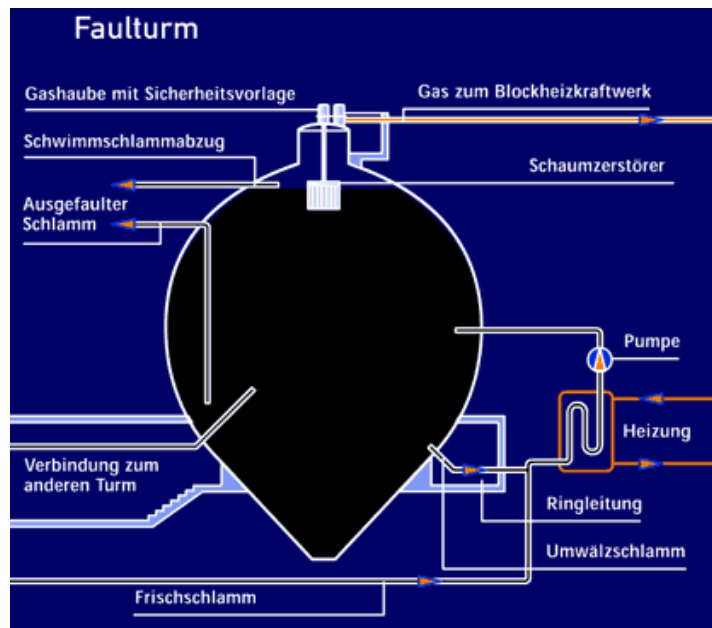
Der anaerobe Abbauprozess erfolgt zunächst durch extrazelluläre Enzyme der hydrolytisch/fermentativen Bakterien. Hierbei werden die komplexen organischen Substanzen wie Proteine, Cellulose und Fette in niedermolekulare lösliche Verbindungen umgesetzt. Die gebildeten Aminosäuren, Kohlenhydrate und Fettsäuren werden dann von fermentativ säurebildenden Bakterien als Substrat verwertet. Hierbei ist Acetat das Hauptprodukt der Zuckerfermentation. Außerdem werden organische Säuren (zum Beispiel Propionsäure, Essigsäure und Buttersäure), Alkohole, Ketone, Kohlendioxid und Wasserstoff produziert. Von diesen Zwischenprodukten

können die methanogenen Bakterien nur Essigsäure, bzw. Wasserstoff und Kohlendioxid direkt zu Methan umsetzen. Daher müssen die gebildeten organischen Säuren und Alkohole zunächst zu Essigsäure umgebaut werden. An diesem Prozess können sowohl homoacetogene Bakterien als auch Sulfat-reduzierende Bakterien beteiligt sein. Die Endprodukte der methanogenen Nahrungskette sind somit letztlich Kohlendioxid und Methan (MADIGAN ET AL., 2003; MUDRACK UND KUNST, 1994).

In einem Klärwerk entstehen während der Abwasserreinigung verschiedene Arten von Schlämmen. Man unterscheidet grob zwischen Rohschlämmen und behandelten Klärschlämmen. Rohschlamm treten als Primärschlamm oder als Überschussschlamm auf. Der Primärschlamm setzt sich aus organischen Substanzen zusammen, die in der mechanischen Reinigungsstufe durch Sedimentation aus dem Abwasser abgetrennt wurden. Der Überschussschlamm stammt aus der biologischen Reinigungsstufe des Belebtschlammverfahrens. Er besteht überwiegend aus den Mikroorganismen der biologischen Reinigungsstufe (MUDRACK UND KUNST, 1994).

Zum Ausfaulen der Rohschlämme werden diese in größeren Kläranlagen den so genannten Faultürmen zugeführt. Hier verweilt der Schlamm für ca. 21 Tage bei mehr als 30 °C. In dieser Zeit bauen Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen die komplexen organischen Substanzen der Rohschlämme über die methanogene Nahrungskette ab. Ein Endprodukt dieses Faulungsprozesses ist ein Gasgemisch aus ca. 40 % Kohlendioxid und ca. 60 % Methan. Das während des Faulungsprozesses produzierte Gas kann zur Energiegewinnung im Blockheizkraftwerk genutzt werden. Weitere Vorteile des Faulungsprozesses sind die Reduzierung von Abfallstoffen, die Verminderung der Geruchsbelästigung und die Vernichtung von pathogenen Keimen (MUDRACK UND KUNST, 1994).

Das Klärwerk Mainz-Mombach besitzt zwei Faultürme mit einem Volumen von jeweils 7.000 m<sup>3</sup>. Die 30 m hohen Türme sind auf dem Klärwerksgelände aufgrund ihrer Eiform gut zu erkennen (Abb. 4). Pro Tag werden rund 6.500 m<sup>3</sup> Klärgas produziert. Um den Faulprozess zu optimieren, wird die Temperatur in den Faultürmen auf 32 °C gehalten (ENTWÄSSERUNGSBETRIEB DER STADT MAINZ, 1999).



**Abb. 4: Schematische Darstellung eines Faulturms.**

(ENTWÄSSERUNGSBETRIEB DER STADT MAINZ (1999);  
<http://www.mainz.de/entwaesserung/faul.htm>).

Der dünnflüssige und dunkle Faulschlamm besitzt mit ca. 2 % bis 5 % einen geringen Feststoffgehalt. Dieser wird durch das Zentrifugieren des Schlammes auf 33% erhöht. Durch die nachfolgende 40- bis 80-minütige Trocknung des entwässerten Faulschlammes mit 120 °C heißer Luft erhöht sich der Feststoffgehalt auf über 90 %. Der getrocknete Schlamm wird thermisch verwertet und die bei der Verbrennung freigesetzte Energie erneut als Heizenergie verwendet (ENTWÄSSERUNGSBETRIEB DER STADT MAINZ, 1999).

Für die Nutzung des Klärschlammes zur Düngung müssen die Grenzwerte der Klärschlammverordnung (AbfKlärVO) nach dem Bundesgesetzblatt I S. 912 vom 15.4.1992 eingehalten werden. Hiernach darf die maximale Quecksilberbelastung im Boden nicht höher als 1 mg Quecksilber pro kg Boden (Trockenmasse), bzw. der Gesamtquecksilbergehalt im Faulschlamm nicht höher als 8 mg Quecksilber pro kg Schlamm-trockenmasse betragen (STREIT, 1991).

## 1.4 Termiten

Termiten treten mit weltweit ungefähr  $2,4 \times 10^{17}$  Tieren in einer sehr hohen Individuenzahl auf (ZIMMERMANN ET AL., 1982) und besitzen aufgrund ihrer Fähigkeit, schwer abbaubare Pflanzenstoffe umzusetzen, als Destruenten eine große Bedeutung im Kohlenstoffkreislauf (GRZIMEK, 1980). Weltweit sind sie mit 28 % an der Nettoprimärproduktion beteiligt und setzen große Mengen von Gasen frei. Es wird angenommen, dass die Termiten jährlich  $1,5 \times 10^8$  t Methan,  $2 \times 10^8$  t Wasserstoff,  $4,6 \times 10^{10}$  t Kohlendioxid,  $1 \times 10^7$  t Kohlenmonoxid und  $7 \times 10^5$  t Dimethyldisulfid produzieren (ZIMMERMANN ET AL., 1982; KÖNIG ET AL., 2002). Aufgrund der hohen Individuenzahl mit ihrer großen Bedeutung für den Umsatz von Biomasse stellen sie auch ein interessantes Untersuchungsfeld für die Quecksilbermethylierung in Insekten dar.

Systematisch gehören die Termiten zu den Insekten. Sie bilden Staaten und sind in ihrem Erscheinungsbild, im Polymorphismus und dem Kastenwesen den Ameisen sehr ähnlich. Deshalb werden sie häufig als „weiße Ameisen“ bezeichnet, was jedoch irreführend ist, da die 2.761 bekannten Termitenarten die eigene Ordnung der Isoptera (Gleichflügler) bilden (STRESEMANN, 1989). Zusammen mit den Schaben und Fangschrecken gehören sie zur Gruppe der Dictyoptera (MADDISON, 2002). Innerhalb der Ordnung der Isoptera lassen sie sich in höhere und niedrigere Termiten einteilen (Abb. 5).



**Abb. 5: Stammbaum der Termiten** (MADDISON, 2002).

Zu der Gruppe der niederen Termiten gehören die Familien Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Rhinotermitidae und Serritermitidae mit insgesamt 803 Arten (vgl. KÖNIG ET AL., 2002). Aufgrund von morphologischen Kriterien kann die Familie Mastotermitidae mit ihrem einzigen rezenten Vertreter *Mastotermes darwiniensis* als ursprünglichste Art angesehen werden. Diese Art zeigt einen hohen Verwandtschaftsgrad zu Schaben. Die Gruppe der höheren Termiten umfasst 1.958 Arten, die alle zur Familie der Termitidae gehören. Damit stellen die höheren Termiten ca. 71% aller Termitenarten (vgl. KÖNIG ET AL., 2002). Die höheren Termiten unterscheiden sich hinsichtlich der niederen Termiten durch das Fehlen von symbiotischen Flagellaten im Intestinaltrakt (KAESTER, 1973).

Termiten sind wärme- und feuchtigkeitsliebend. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich hauptsächlich auf tropische und subtropische Regionen zwischen 47° nördlicher und 47° südlicher Breite (KÖNIG ET AL., 2002). Einzelne Arten treten auch in gemäßigten Breiten auf. So wurde die Gelbfußtermit (*Reticulitermes flavipes*) aus Nordamerika nach Hamburg eingeschleppt und kann dort seit 1937 regelmäßig nachgewiesen werden (STRESEMANN, 1989).

Alle Termiten sind staatenbildend. Dabei bilden einige Arten Staaten mit mehreren Millionen Tieren. Ein Termitenstaat setzt sich aus Tieren von meist drei morphologisch unterschiedlichen Kasten zusammen. Dabei unterscheidet man die Kasten der Geschlechtstiere mit Königin und König als Elternfamilie von den Kasten der Arbeiter und der Soldaten.



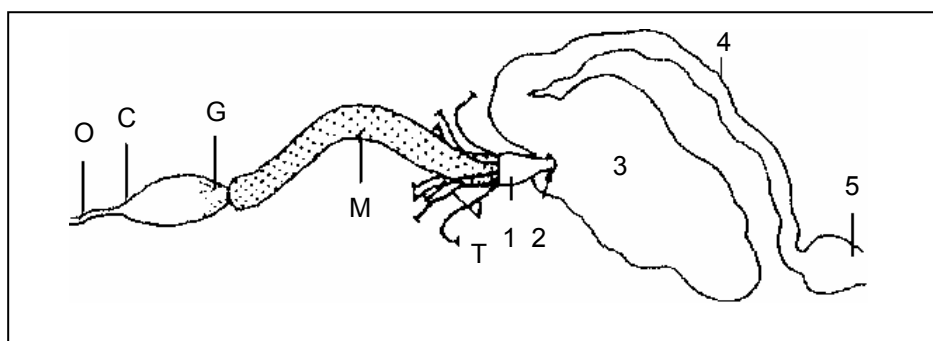
**Abb. 6: Termitenkönigin (*Macrotermes bellicosus*) mit Arbeitern.**

© Duur Aanen

Die Geschlechtstiere werden einmal pro Jahr in großer Anzahl hervorgebracht und schwärmen dann zum Hochzeitsflug aus. Nachdem sie zu Boden gefallen sind, werfen sie ihre Flügel ab und suchen eine geeignete Stelle zur Gründung eines neuen Termitenstaats. Die Tiere der Elternfamilie zeichnen sich hinsichtlich ihrer Größe aus. Insbesondere die Königin lässt sich anhand ihres stark vergrößerten Hinterleibs gut erkennen (Abb. 6). Im Gegensatz zu den Geschlechtstieren sind die Arbeiter und Soldaten stets ungeflügelt. Eine Unterscheidung zwischen den Arbeitern und Soldaten kann über die stark vergrößerten Mundwerkzeuge der Soldaten erfolgen (STRESEMANN, 1989).

Termiten leben in Bauten, die in der Erde oder im Holz angelegt werden. Bei höheren Termiten werden die unterirdischen Bauten zum Teil durch mehrere Meter hohe, oberirdische Hügelbauten erweitert. Als Baustoffe werden mit Speichel vermengte Erde, Exkremente und zerkaute Holzteilchen verwendet.

Das Nahrungsspektrum von Termiten ist vielfältig. Die verschiedenen Termitenarten ernähren sich von Holz, Gras, Dung, Humus und Boden. Außerdem legen einige Arten der höheren Termiten Pilzgärten an (KÖNIG ET AL., 2002). Die aufgenommene Nahrung wird im Intestinalsystem mit Unterstützung von symbiotischen Mikroorganismen aufgeschlossen. Eine schematische Abbildung des Intestinalsystems der Termiten ist in Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 7: Darmtrakt der Termiten *Kaloterмес flavicollis*.**

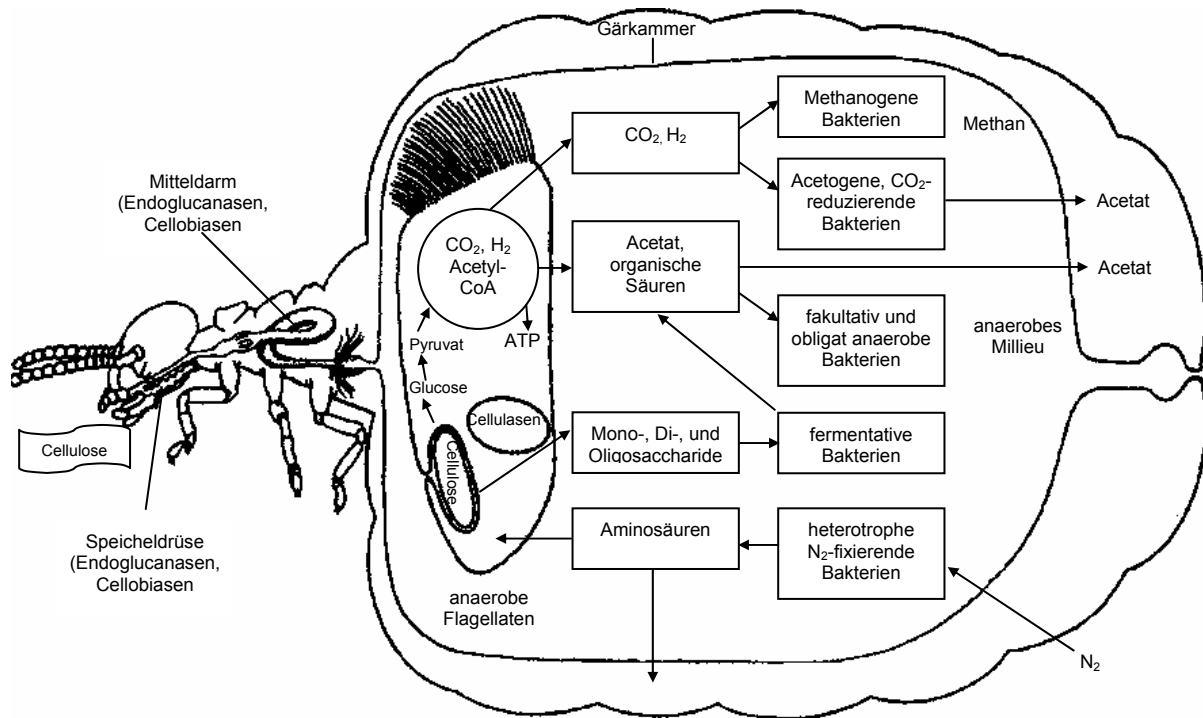
O = Ösophagus, C = Kropf, G = Kaumagen, M = Mitteldarm, T = Maphigische Gefäße, 1 = 1. Hinterdarmsegment, 2 = 2. Hinterdarmsegment, 3 = Gärkammer, 4 = Colon, 5 = Rectum (KRISHNA, 1970).

Das Intestinalsystem besteht aus dem Vorder-, Mittel- und Enddarm. Der Vorderdarm setzt sich aus Ösophagus, Kropf und Kaumagen zusammen. Hieran schließt sich der wenig differenzierte Mitteldarm an. Der Enddarm besteht aus fünf Abschnitten. Die ersten beiden werden als erstes und zweites Hinterdarmsegment bezeichnet. Anschließend folgen Gärkammer, Colon und Rectum.

Die cellulosereiche Nahrung wird von den Termiten durch den Kauapparat mit den kräftigen Mandibeln und dem mit Chitinleisten ausgekleideten muskulösen Kaumagen mechanisch zerkleinert. Anschließend wird die zerkleinerte Nahrung durch den Mitteldarm in den Enddarm transportiert. Hier findet insbesondere in der Gärkammer der mikrobielle Abbau der Nahrung statt. Hierzu hat sich im Laufe der ca. 300 Millionen Jahre langen Entwicklungsgeschichte der Termiten eine komplexe Intestinalflora ausgebildet (EMERSON, 1965).

Die Gärkammer ist dicht mit Mikroorganismen besiedelt. Sie ist bei den niederen Termiten mit bis zu 90 % des Volumens mit symbiotischen Flagellaten gefüllt. Weiterhin treten Bakterien mit einem Titer von  $10^7$  bis  $10^{11}$  Bakterien pro mL Darmvolumen auf. Den größten Anteil machen hiervon Spirochäten, Gram-positive Bakterien und Proteobakterien aus. Neben den Flagellaten und Bakterien findet man auch Pilze und Hefen mit einem Titer von  $10^7$  bis  $5 \times 10^8$  Hefezellen pro mL. Aufgrund des kleinen Volumens von 0,5  $\mu\text{L}$  bis 10  $\mu\text{L}$  und der kontinuierlichen Sauerstoffversorgung über das Tracheensystem stellt sich in der Gärkammer ein anaerobes Gradientensystem ein (KÖNIG ET AL., 2002).

Der mikrobielle Abbau der pflanzlichen Stoffe ist in Abb. 8 schematisch dargestellt. Er erfolgt durch einen dreistufigen Prozess, an dem verschiedene Organismen mitwirken. Im ersten Schritt werden die pflanzlichen Polymere, wie Cellulose und Hemicellulose durch Cellulasen zu Mono-, Di- und Oligosacchariden hydrolysiert. Dies geschieht hauptsächlich in den Nahrungsvakuolen der symbiotischen Flagellaten nach der Phagocytose der mechanisch zerkleinerten Pflanzenpartikel. Dabei werden die von den Flagellaten für den Celluloseabbau verwandten Cellulasen von der Termiten *Mastotermes darwiniensis* selbst produziert (LI ET AL., 2003).



**Abb. 8: Lignocelluloseabbau in der Gärkammer der Termiten**  
(RADEK, 1999).

Die Mono-, Di- und Oligosaccharide werden von den Flagellaten im nächsten Schritt zum Pyruvat umgesetzt. Dieses wird zur Energiegewinnung in den Peroxisomen weiter zu Acetat, Kohlendioxid und Wasserstoff abgebaut. Außerdem werden die Mono-, Di- und Oligosaccharide durch die fermentativen Bakterien zur Energiegewinnung verwendet. Die von Flagellaten und Bakterien gebildeten Gärprodukte sind hauptsächlich kurzkettige Carbonsäuren, insbesondere Acetat, die von der Termitenart als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Am letzten Schritt des Lignocelluloseabbaus sind Mikroorganismen beteiligt, die molekularen Wasserstoff (H<sub>2</sub>) als Elektronendonator nutzen können. Dies erfolgt durch die drei physiologisch unterschiedlichen Gruppen der methanogenen, homoacetogenen sowie Sulfat-reduzierenden Bakterien. Bei holzfressenden Termiten überwiegt der Anteil der acetogenen Bakterien. Das hierbei gebildete Acetat steht der Termitenart als zusätzliche Nahrungsquelle zur Verfügung (RADEK, 1999).

Zur Untersuchung einer Methylquecksilberbildung in Insekten wurde die Termitenart *Mastotermes darwiniensis* verwandt. Sie tritt im tropischen Norden von Australien auf. Als bodenlebende Termiten legen sie ihre Nester unterirdisch oder in den Stämmen sowie Wurzelkronen von Bäumen an. Ihr Volk kann mit mehr als einer Million Tieren sehr individuenreich sein. In Abb. 9 sind ein Soldat sowie ein Arbeiter der australischen Termitenart *Mastotermes darwiniensis* abgebildet.



**Abb. 9: Termiten *Mastotermes darwiniensis*** Soldat (links) und Arbeiter (rechts).  
([http://www.uni-bayreuth.de/grako678/media/Projekte\\_neu.htm](http://www.uni-bayreuth.de/grako678/media/Projekte_neu.htm))

Im Darmtrakt von *Mastotermes darwiniensis* wurden Sulfat-reduzierende Bakterien aus der Gruppe der  $\delta$ -Proteobakterien mit einem Titer von  $1 \times 10^7$  Bakterien pro mL nachgewiesen (DRÖGE ET AL., 2005). Durch die Arbeit von FRÖHLICH ET AL. (1999) wurde das Sulfat-reduzierende Bakterium *Desulfovibrio intestinalis* (DSMZ 11275) aus der Gruppe der  $\delta$ -Proteobakterien aus dem Intestinaltrakt der australischen Termitenart *Mastotermes darwiniensis* isoliert.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der hohen Methylquecksilberkonzentrationen von mehr als 1 µg Methylquecksilber pro g Gewebe in Raubfischen und Meeressäugern wurden bisher zahlreiche Untersuchungen zur Methylquecksilberbildung und -anreicherung in aquatischen Lebensräumen durchgeführt (HARMS UND BUNKE, 2002). Hierbei wurde gezeigt, dass die hohe Methylquecksilberkonzentration in diesen Organismen aus der Methylquecksilberakkumulation über die Nahrungskette resultiert. Das von den Organismen aufgenommene Methylquecksilber wird hauptsächlich von Bakterien produziert, die anorganisches Quecksilber zu Methylquecksilber umsetzen (BERMANN UND BARTHA, 1986). Als hauptverantwortliche Bakteriengruppe für die Quecksilbermethylierung wurden die Sulfat-reduzierenden Bakterien identifiziert. Diese treten vor allem in den anaeroben Sedimentschichten von aquatischen Systemen auf (COMPEAU UND BARTHA, 1985; PAK UND BARTHA, 1998). Weiterhin kann man Sulfat-reduzierende Bakterien auch in nicht aquatischen Lebensräumen, wie beispielsweise im Faulschlamm und im Intestinalsystem von Menschen und Tieren, nachweisen (HOWARD UND HUNGATE, 1976; GIBSON ET AL., 1988; TRINKERL ET AL., 1990; GEBHART ET AL., 1993; SASS ET AL., 1998).

Im Gegensatz zu den aquatischen Lebensräumen wurde die Quecksilbermethylierung in nicht aquatischen Lebensräumen bisher kaum untersucht. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit die mikrobielle Methylquecksilberbildung in weiteren Lebensräumen von Sulfat-reduzierenden Bakterien nachzuweisen. Hierbei wurde zum einen aufgrund der bei der Abwasserreinigung anfallenden großen Mengen an Faulschlämmen der Faulschlamm des Klärwerks Mainz-Mombach als Probenmaterial ausgewählt. Zum anderen wurden Untersuchungen zur Methylquecksilberbildung in Insekten exemplarisch an der Termite *Mastotermes darwiniensis* durchgeführt. Diese ist von besonderer Bedeutung, da die Methylquecksilberbildung in Insekten bisher noch nicht untersucht wurde und die Termiten einen großen Anteil an der weltweiten Biomasse ausmachen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalienliste

Nachfolgend sind die in der Arbeit verwendeten Chemikalien mit Angabe der Reinheit und der Bezugsquelle aufgelistet.

**Tab. 4: Gase**

Gas	Reinheit	Bezugsquelle
Argon	4.6	Westfalen AG, Münster
Helium	4.6	Westfalen AG
Stickstoff	4.6	Westfalen AG

**Tab. 5: Flüssigkeiten**

Flüssigkeit	Reinheit	Bezugsquelle
Acetonitril	99,9 %	Merck, Darmstadt
Chloroform	99,8 %	Fluka, Neu-Ulm
Dichlormethan	99,9 %	Merck
Eisessig	Suprapure	Merck
Methanol	HPLC-Grade	Merck
Methansulfonsäure (70 % in Wasser)	zur Synthese	Roth, Karlsruhe
Natriumlactat in Wasser	50 %	Fluka
Quecksilberchlorid	Ultrapure	Merck
Quecksilberisotopenlösung $^{198}\text{Hg}$	-	AK Heumann, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Universität Mainz
Salpetersäure (65 %ig)	p.a.	Acros Organics, Geel, Belgien
Salzsäure (rauchend)	p.a.	Roth
Schwefelsäure	p.a.	Roth
Wasser	MQ	Milliporeanlage
Wasserstoffperoxid (30 % in Wasser)	Ultrapure	Merck

Tab. 6: Feststoffe

Feststoff	Reinheit	Bezugsquelle
Ammoniumchlorid	rein	Merck
Biotin (Vitamin H)	99,0 %	Fluka
Borsäure 99,8 %	p.a.	Roth
Bromethansulfonsäure	p.a.	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat	99,5 %	Fluka
Cobaltchlorid-Hexahydrat	p.a.	Merck
Cycloheximid	≥ 94 %	Sigma-Aldrich, Seelze
Calcium-D-Pantothenat	≥ 98 %	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat (wasserfrei)	≥ 98 %	Roth
EDTA-Na <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Natriumethyldiamin-tetraacetat)	p.a.	Roth
Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat	99 %	Merck
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	p.a.	Merck
Ethylquecksilberchlorid	NEAT	Sigma-Aldrich
Folsäure	98 %	Sigma
Hefeextrakt	-	Hartge-Marcor, Hackensack
HEPES	≥ 99 %	Roth
Kaliumbromid	p.a.	Roth
Kaliumcarbonat	p.a.	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a. ACS	Roth
Kaliumhydroxid	p.a.	Roth
Kupferchlorid-Dihydrat	p.a.	Merck
Kupfersulfat-Heptahydrat	p.a.	Merck
L(+)- Ascorbinsäure	p.a.	Roth
Liponsäure	99 %	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	≥ 99 % p.a.	Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	≥ 99 % p.a.	Roth
Manganchlorid-Tetrahydrat	p.a.	Merck

**Fortsetzung Tab. 6**

<b>Feststoff</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Methylquecksilberchlorid	PESTANAL	Sigma-Aldrich
Monobrombiman	≥ 90,0 %	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Suprapure	Merck
Natriummolybdat	p.a.	Merck
Natriumsulfat	p.a.	Roth
Natriumtetrapropylborat	98 %	Galab Technologies, Geesthacht
Natriumthioglycolat		Merck
Nickelchlorid-Hexahydrat	p.a.	Fluka
Nicotinsäure (Vitamin B)	≥ 98 %	Fluka
p-Aminobenzoesäure	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Pyridoxin (Vitamin B6)	≥ 99 %	Roth
Quecksilber(II)chlorid	p.a.	Fluka
Riboflavin	≥ 99,0	Merck
Sägemehl (Fichtenholz)	-	-
Thiamin (Vitamin B1)	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	99 %	Sigma-Aldrich
Zinkchlorid	p.a.	Riedel-de Haën, Seelze

## 2.2 Lösungen

### 2.2.1 Extraktionslösungen

**Tab. 7: Kupfersulfatlösung**

Kupfersulfatlösung	[g/L]
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	250,0

Zur Herstellung einer schwefelsauren Kaliumbromidlösung wurden zunächst die Lösungen 1 und 2 (Tab. 8) getrennt voneinander hergestellt. Anschließend wurden die beiden Lösungen zusammengeführt und bis auf 1000 mL aufgefüllt.

**Tab. 8: Schwefelsaure Kaliumbromidlösung**

Schwefelsaure Kaliumbromidlösung	
Lösung 1	
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (konz.)	110 mL
MQ-Wasser	100 mL
Lösung 1 abkühlen lassen	
Lösung 2	
KBr	360 g
MQ-Wasser	700 mL
Kombination von Lösung 1 und 2	ad 1000 mL

### 2.2.2 Derivatisierungsreagenzien

Zur Derivatisierung der Quecksilberverbindungen wurden die folgenden Lösungen vorbereitet (Tab. 9 und 10).

**Tab. 9: Natriumacetatpuffer**

Natriumacetatpuffer (pH 4,6)	[g/L]
Eisessig	153,7
Natriumacetat	118,1

**Tab. 10: Natriumtetrapropylborat**

Natriumtetrapropylborat 2% in KOH	[g/L]
KOH	28,5
Natriumtetrapropylborat	20

Das Propylierungsreagenz wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Zur Derivatisierung der Schwefelspezies wurden die folgenden Lösungen vorbereitet (Tab 11-13):

**Tab. 11: HEPES Puffer**

HEPES Puffer (pH 8,0)	[g/L]
HEPES	11,92
EDTA	1,86

**Tab. 12: Monobrombimanlösung**

Monobrombiman in Acetonitril	[g/L]
Monobrombiman	13,01

**Tab. 13: Methansulfonsäurelösung**

Methansulfonsäure	[g/L]
Methansulfonsäure 70%ig	6,61

### 2.2.3 Quecksilberstandardlösungen

**Tab. 14: Methylquecksilberchloridlösung**

Methylquecksilberchlorid (Stammlösung)	[g]
Methylquecksilberchlorid	0,2
0,5%ige HNO <sub>3</sub>	99,8

**Tab. 15: Ethylquecksilberchloridlösung**

Ethylquecksilberchlorid (Stammlösung)	[g]
Ethylquecksilberchlorid	0,05
Methanol	73,14

Die Organoquecksilberstammlösungen wurden bis zur geeigneten Konzentration in 0,5%iger Salpetersäure verdünnt und bei 4 °C gelagert.

**Tab. 16: Quecksilberchloridlösung**

Quecksilberchlorid (Stammlösung)	[g]
Quecksilber(II)chlorid	0,25
1,0%ige HNO <sub>3</sub>	199,75

Die Quecksilberchloridstammlösung wurde bis zur geeigneten Konzentration in MQ-Wasser verdünnt und direkt verwendet.

#### 2.2.4 Hemmstoffe

Stammlösungen:

**Tab. 17: Natriummolybdatlösung**

Natriummolybdatlösung	[g/L]
Natriummolybdat	20

**Tab. 18: Bromethansulfonsäurelösung**

Bromethansulfonsäurelösung	[g/L]
Bromethansulfonsäure	5

**Tab. 19: Cycloheximidlösung**

Cycloheximidlösung	[g/L]
Cycloheximid	10

### 2.2.5 Medien

**Tab. 20: DSMZ -Medium 63 (modifiziert)**

DSMZ -Medium 63 (modifiziert)	[g/L]
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NH <sub>4</sub> Cl	1,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,1
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,0
DL-Natrium-Lactat	2,0 <sup>*)</sup>
Vitaminlösung 141	10,0
Spurenelementlösung SL-10	2,0
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5
Natriumthioglycolat	0,1
Ascorbinsäure	0,1
pH	7,8

<sup>\*)</sup> in [mL/L], (nach DSMZ -MEDIUM 63)

**Tab. 21: Postgate Medium D (modifiziert)**

Postgate Medium D (modifiziert)	[g/L]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
NH <sub>4</sub> Cl	1,0
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,1
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,6
DL-Natrium-Lactat	2,0 <sup>*)</sup>
Vitaminlösung 141	10,0
Spurenelementlösung SL-10	2,0
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,055
pH	7,5

<sup>\*)</sup> in [mL/L], (nach POSTGATE, 1984)

**Tab. 22: Vitaminlösung 141**

Vitaminlösung 141	[g/L]
Biotin	0,002
Folsäure	0,002
Pyridoxin	0,01
Thiamin (Vitamin B1)	0,005
Riboflavin	0,005
Nikotinsäure	0,005
D-Ca-Pantothenat	0,005
Vitamin B12	0,0001
p-Aminobenzoessäure	0,005
Liponsäure	0,005

(DSMZ -MEDIUM 141)

**Tab. 23: Spurenelementlösung SL-10**

Spurenelementlösung SL-10	[g/L]
HCl (25%ig) 7,7 M	10,0 ml
FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,5
ZnCl <sub>2</sub>	0,07
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,19
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,02
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,024
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,036

(DSMZ -MEDIUM 320)

## 2.3 Probenmaterialien

### 2.3.1 Standardreferenzmaterial

Zur Verifizierung der Methoden zur Methylquecksilber- und Gesamtquecksilberbestimmung wurde das zertifizierte Referenzmaterial CRM 463 (European Commission, Community Bureau of Reference, BCR, Belgien) verwendet. Das CRM 463 besteht aus getrocknetem Thunfisch und besitzt eine Methylquecksilberkonzentration von  $2,83 \pm 0,15 \mu\text{g}$  Quecksilber als Methylquecksilber pro g Trockenmaterial sowie einen Gesamtquecksilbergehalt von  $2,85 \mu\text{g}$  Quecksilber pro g Trockenmaterial.

### 2.3.2 Bakterienkulturen

Die Untersuchungen zur mikrobiellen Quecksilbermethylierung wurden mit dem Sulfat-reduzierenden Bakterium *Desulfovibrio intestinalis* (DSMZ 11275) sowie mit nicht entwässertem Faulschlamm aus dem Klärwerk Mainz-Mombach durchgeführt. Eine Verifizierung der Methode zur Methylquecksilberbestimmung erfolgte mit den aus dem Intestinaltrakt von *Reticulitermes santonensis* isolierten Bakterium *Desulfovibrio desulfuricans* (KRS2, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz).

### 2.3.3 Termiten

Zum Nachweis einer *in vivo* Methylierung in Insekten sowie zur Untersuchung der Quecksilberakkumulation im Insektengewebe wurde die australische Termitenart *Mastotermes darwiniensis* verwendet. Weiterhin wurde diese Termitenart zum Nachweis von Schwefelintermediaten im Darmtrakt eingesetzt. Die Tiere wurden von der Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung (BAM, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Tierhaltung erfolgte bei  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  in Metallkannen. Zur Feuchtigkeitsregulation wurde der Boden der Metallkannen mit angefeuchteten Vermikulit bedeckt. Die Fütterung der Termiten erfolgte mit Kiefern-, Buchen- und Pappelholz.

## 2.4 Probenherstellung

### 2.4.1 Bakterienkulturen

Zum Nachweis einer Methylquecksilberbildung im Faulschlamm der Kläranlage Mainz-Mombach wurden 20 g des nicht entwässerten Faulschlammes mit einer sterilfiltrierten Quecksilberchloridlösung versetzt, so dass die Quecksilberkonzentration im Faulschlamm 1 µg Quecksilber pro g Faulschlamm betrug. Anschließend wurde der Faulschlamm bei 28 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

Die Methylquecksilberbildung durch das Bakterium *Desulfovibrio intestinalis* (DSMZ 11275) wurde in einer Batchkultur untersucht. Hierzu wurden 20 g des modifizierten DSMZ -Mediums 63 (Tab. 20) oder 20 g des modifizierten Postgate Mediums D (Tab. 21) mit 3 % einer Vorkultur beimpft. Anschließend wurden die Kulturen unter anaeroben Bedingungen mit einer sterilfiltrierten Quecksilberchloridlösung versetzt, so dass die Quecksilberkonzentration 1 µg Quecksilber pro g Kulturmedium betrug. Danach wurden die Kulturen für 3 d, 5 d und 8 d bei 28 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

Sowohl für die Untersuchungen der Methylquecksilberbildung im Faulschlamm als auch in der Bakterienkultur von *Desulfovibrio intestinalis* wurden Blindproben hergestellt, indem die Kulturen parallel zu den Proben ohne den Zusatz von anorganischem Quecksilber mitgeführt wurden.

### 2.4.2 Quecksilberfütterung der Termiten *Mastotermes darwiniensis*

Zum Nachweis einer *in vivo* Methylierung durch Insekten sowie zur Bestimmung der Quecksilberakkumulation im Insektengewebe wurden Versuche mit der australischen Termiten *Mastotermes darwiniensis* durchgeführt. Hierbei wurden die Termiten über einen Zeitraum von 14 d mit Sägemehl aus Fichtenholz gefüttert, welches mit unterschiedlichen Konzentrationen an anorganischem Quecksilber angereicht war. Die Quecksilberkonzentrationen wurden auf 0 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg und 250 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl eingestellt. Die Herstellung der quecksilberhaltigen Nahrung erfolgte durch die Zugabe einer Quecksilber(II)chlorid-Standardlösung und MQ-Wasser nach dem unten aufgeführten Pipettierschema (Tab. 24).

**Tab. 24: Pipetierschema zur Herstellung von quecksilberhaltigem Sägemehl**

Sägemehl	HgCl <sub>2</sub> -Lösung <sup>*)</sup>	MQ-Wasser	Berechnete Konzentration von Hg <sup>2+</sup> im Sägemehl
[g]	[g]	[mL]	[µg/g]
2,505	0,000	12,0	0,0
2,502	0,635	12,0	25,2
2,503	1,267	10,8	50,3
2,500	1,885	10,2	74,9
2,502	2,517	9,5	99,9
2,502	3,772	8,3	149,7
2,502	5,037	7,0	200,0
2,501	6,298	6,0	250,1

<sup>\*)</sup> mit einer Konzentration von 99,3 µg Hg/g

Nach der Zugabe der Standardlösung und des MQ-Wassers wurde das Sägemehl mit einem gereinigten Spatel vermengt, so dass das anorganische Quecksilber gleichmäßig in der Nahrung verteilt war. Anschließend wurde das Sägemehl für 5 d in einer geöffneten Petrischale bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Sägemehl erneut gemischt und in 2 mL Zentrifugengefäße abgefüllt. Dabei wurden die Mengen der einzelnen Futterportionen durch Wägung der leeren und befüllten Zentrifugengefäße bestimmt. Die eingewogenen Sägemehlmengen lagen zwischen 0,1 g und 0,2 g. Abschließend wurden die Futterportionen durch einminütiges Zentrifugieren in einer Eppendorf Tischzentrifuge (5415 D) bei 15700 g in den Zentrifugengefäßen fixiert. Die Gesamtquecksilberkonzentrationen im Sägemehl wurden stichprobenartig überprüft.

Zur Durchführung einer Quecksilberfütterung wurden je 50 Termiten mit 0 µg, 150 µg, 200 µg sowie 250 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl und je 100 Termiten mit 25 µg, 50 µg, 75 µg und 100 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl gefüttert. Dazu wurden Versuchsgruppen von je 25 Termiten in einer Petrischale (Ø 9 cm) gehalten, die zur Sauerstoffversorgung der Tiere zuvor mit Luftlöchern versehen wurde. Bis zu vier Petrischalen wurden in einer Plastikbox aufeinander gestellt. Zur Optimierung der Luftfeuchte in den Versuchsbehältern wurde der

Boden der Plastikboxen mit je 10 g angefeuchtetem Vermikulit bedeckt. Die Haltung der Termiten erfolgte bei 28 °C im Dunkeln. Während der Fütterungsphase wurden bei täglich durchgeführten Kontrollen die toten Termiten aus den Petrischalen entfernt und dies zur Ermittlung der Sterberate protokolliert.

Nach Beendigung der Fütterungsphase wurde das mittlere Lebendgewicht von allen Termiten aus einer Petrischale bestimmt. Anschließend wurden die Tiere getötet und die Termiten mit identischer Quecksilberkonzentration in der Nahrung gemeinsam gefriergetrocknet (Lyovac GT 2 Leybold-Heraus). Unmittelbar nach der Gefriertrocknung wurde das mittlere Trockengewicht der Termiten mit identischer Quecksilberkonzentration in der Nahrung ermittelt. Zudem wurden die Mengen an gefressenem Sägemehl über die Gewichtsänderung der Zentrifugengefäße vor und nach dem Fütterungsversuch bestimmt. Hierzu wurden die Zentrifugengefäße vor der Wägung von Verunreinigungen durch Faeces gereinigt.

Zur Vorbereitung des Probenmaterials für die Methyl- und Gesamtquecksilberbestimmung wurden die getrockneten Termiten mit einem gereinigten Spatel zu Pulver zerstoßen und bis zur Analyse in einer mit Parafilm<sup>®</sup> verschlossenen Petrischale aufbewahrt.

### **2.4.3 Schwefelintermediate im Intestinaltrakt von Termiten**

Zum Nachweis von Schwefelintermediaten im Intestinaltrakt von Termiten wurde die Termiten *Mastotermes darwiniensis* mit und ohne Sulfat angereichertem Sägemehl gefüttert. Hierzu wurden je 0,25 g Sägemehl mit 1 mL einer 40 mmol/L Natriumsulfatlösung bzw. 1 mL MQ-Wasser versetzt. Nach der Trocknung der Futterproben wurden je 20 Termiten für 3 d oder 5 d mit den vorbereiteten Futterproben gefüttert. Nach Beendigung der Fütterungsperioden wurden die Termiten getötet und der Darmtrakt unter Stickstoffatmosphäre aus der Termiten herauspräpariert. Danach wurden die festen Bestandteile der Därme durch Zentrifugieren entfernt und der flüssige Darminhalt zur Bestimmung der Schwefelintermediate verwendet.

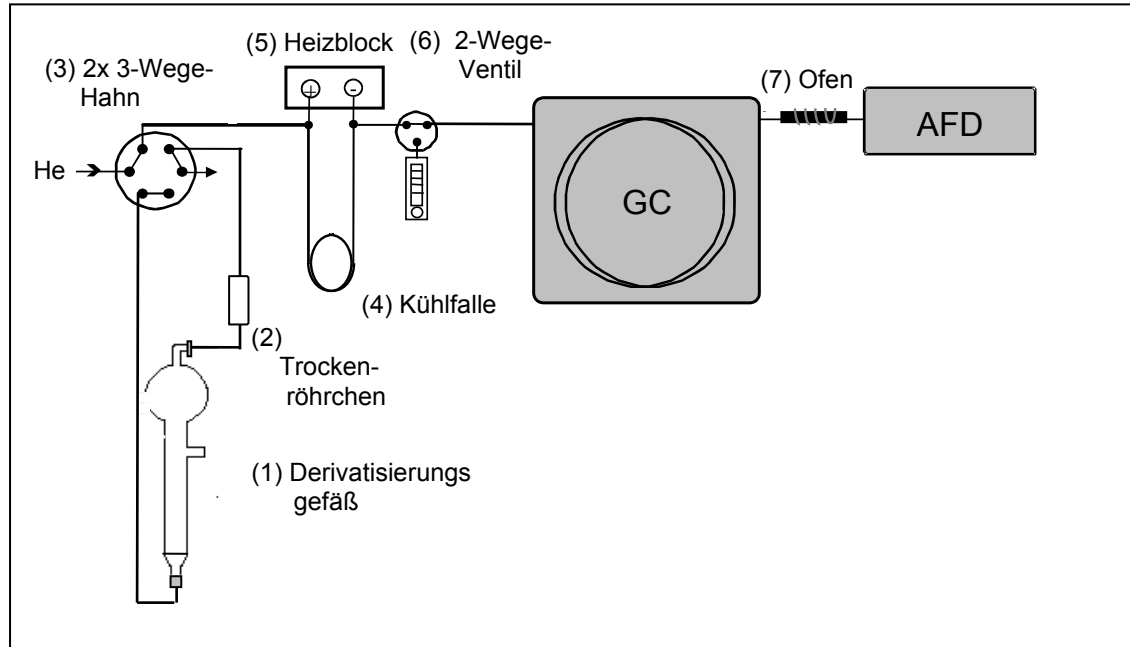
## 2.5 Reinigung der Laborgefäße

Für den Ultrapurennachweis von Methylquecksilber sowie für die Gesamtquecksilberbestimmung wurden die verwendeten Glas- und Metallgeräte durch mehrstündiges Auskochen in 5 % bis 10 %iger  $\text{HNO}_3$  gereinigt. Anschließend wurden die Gefäße in MQ-Wasser ausgekocht und getrocknet. Bis zur Verwendung der Geräte wurden diese in Frischhaltefolie verpackt gelagert. Des Weiteren wurden die nicht hitzestabilen Plastikgefäße zunächst mit 1%iger  $\text{HNO}_3$  und anschließend mit MQ-Wasser für mehrere Stunden ausgeschüttelt.

## 2.6 Spurenanalytische Nachweise

### 2.6.1 Methylquecksilberbestimmung

Die Bestimmung der Methylquecksilberkonzentration erfolgte mit einem Purge&Trap Gaschromatograph-Atomfluoreszenzspektrometer, der bereits in den Arbeiten von SCHEDLBAUER (1998) und KÜLLMER (2002) eingesetzt wurde. Der prinzipielle Geräteaufbau dieses online gekoppelten Systems ist in Abb. 10 dargestellt.



**Abb. 10: Purge&Trap Gaschromatograph-Atomfluoreszenzspektrometer.**  
Einstellung in Position zur thermischen Verflüchtigung und Analyse.

Das Analysesystem zur Methylquecksilberbestimmung bestand aus drei Einheiten. Hierzu gehörten das Purge&Trap-System, der Gaschromatograph sowie der online gekoppelte Atomfluoreszenzdetektor. Dabei stellte das Purge&Trap-System eine dy-

namische Headspace-Technik dar, bei der die Quecksilberspezies in der Probelösung zu flüchtigen Verbindungen derivatisiert und anschließend durch Austreiben (purge) und Einsammeln (trap) für die gaschromatographische Trennung zur Verfügung gestellt wurden. Zu dem Purge&Trap System gehörte ein spezielles Derivatisierungsgefäß (1). Dieses schmale Gefäß besaß eine poröse Keramikplatte, die für Flüssigkeiten undurchlässig war, aber von Gas durchströmt werden konnte. Hierdurch wurden die Analyten nach der Derivatisierung über einen kontinuierlichen Heliumfluss (Helium 4.6; Westfalen AG) aus der Probelösung ausgetrieben. Das ausgetriebene Gas wurde durch ein mit Kaliumcarbonat gefülltes Trockenröhrchen (2) geführt. Dabei wurde das aus der Probelösung mitgerissene Wasser aus dem Trägergas absorbiert. Anschließend wurden die Analyten in einer Kryofalle bei einer Temperatur von  $-196\text{ °C}$  ausgefroren. Die Kryofalle (4) bestand aus einer 30 cm langen MXT Silicosteel Kapillare mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einer deaktivierten, unpolaren Siliziumdioxidschicht, die zum Ausfrieren der Analyten in ein mit flüssigem Stickstoff gefüllten Isoliergefäß eingetaucht wurde. Nachdem das Austreiben der Analyten abgeschlossen war, wurde der Heliumfluss durch das Derivatisierungsgefäß gestoppt, indem er durch die Umstellung eines 2x3-Wege-Hahns (3) direkt zur Kryofalle geleitet wurde. Des Weiteren wurde die Verbindung zwischen der Kryofalle und dem Gaschromatographen über das 2-Wege-Ventil (6) geöffnet. Anschließend wurde die Kapillare aus dem flüssigen Stickstoff herausgenommen und die Analyten durch thermische Verflüchtigung zum Gaschromatographen (GC) geführt. Durch den Einsatz einer beheizten Transferline wurde hierbei eine punktförmige Zuführung der Analyten gewährleistet. Die Auftrennung der Quecksilberspezies erfolgte in einem Gaschromatographen, der mit einer Kapillarsäule ausgestattet war. Diese wurde in einem Ofen über ein Temperaturprogramm erwärmt. Vom Gaschromatographen führte eine Verbindung zu einem Ofen (7), der aus einem mit Quarzwolle gefüllten Quarzrohr bestand. Dieses wurde mit einem Nychrome-Wendel auf eine Temperatur von  $830\text{ °C}$  aufgeheizt. Hierdurch wurden die alkylierten Quecksilberspezies beim Durchströmen des Ofens zu  $\text{Hg}^0$  pyrolysiert. Nach dem Ofen führte eine Kapillarverbindung zum Atomfluoreszenzdetektor (AFD). Dieser wurde mit einem Basissignal von 10 mV bis 20 mV betrieben. Die mit dem Atomfluoreszenzdetektor ermittelten Signale wurden über ein Interface an einen Rechner weitergeleitet. Mit Hilfe der Software Turbochrom 4.1 (PerkinElmer, Überlingen) wurden die erhaltenen Chromatogramme ausgewertet, indem die Signalintensitäten aus den Peakflä-

chen der Quecksilberfraktionen ermittelt wurden. Die für die Methylquecksilberanalytik verwandten Gerätetypen sind in Tab. 25 wiedergegeben.

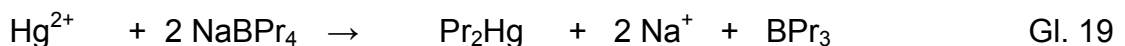
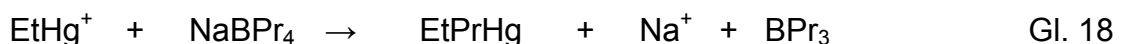
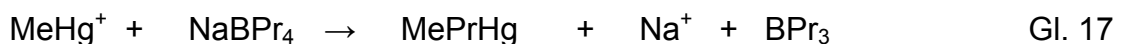
**Tab. 25: Bezeichnung des Gerätetyps**

Gaschromatograph	Autosystem XL, PerkinElmer, Überlingen
Kapillarsäule	(5%Phenyl)-Methyl-Polysiloxan, Länge 15 m, ID. 0,53 mm; Filmdicke 5µm, Alltech GmbH, Unterhachingen
Atomfluoreszenzdetektor	CVAFS 2, Brooks Rand Ltd., Seattle, USA
Interface	PE Neson 900 Series Interface, PerkinElmer, Überlingen

Zur Aufbereitung des Probenmaterials für die Methylquecksilberbestimmung wurde eine saure Phasenextraktion in Kombination mit der Puge&Trap-Technik durchgeführt. Hierzu wurden 6,0 mL Bakterienkultur bzw. 0,075 g - 0,170 g gefriergetrocknetes Termitengewebe und 6,0 mL MQ-Wasser als Probenmaterial eingesetzt. Dieses Material wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen. Zusätzlich wurde eine Blindprobe ohne Probenmaterial zur Kontrolle mitgeführt. Im ersten Schritt wurden zur Probenlösung und zur Blindprobe 0,4 mL bis 0,8 mL Ethylquecksilberchlorid-Standardlösung, mit einer Konzentration von 5 ng Quecksilber pro g Lösung als interner Standard eingewogen und die Lösungen zur Einstellung des Gleichgewichts für 30 min geschüttelt. Zur Durchführung der sauren Phasenextraktion wurden dann 0,8 mL einer 1 mol/L Kupfersulfatlösung und 3,2 mL einer 3 mol/L Kaliumbromidlösung in 10%iger Schwefelsäure zur Probe eingewogen und die Extraktionslösung eine Minute kräftig geschüttelt (LONGBOTTOM ET AL., 1973). Nach einer Reaktionszeit von zehn Minuten wurde das unlösliche Probenmaterial durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 2.460 g und 4 °C in einer Beckmann Kühlzentrifuge von der Extraktionslösung abgetrennt. Der Überstand wurde in vier Aliquote von je 1,9 mL eingeteilt, wobei die Gewichte der Aliquote auf der Analysewaage bestimmt wurden. Zu drei der vier Aliquote wurde eine Methylquecksilberstandardlösung addiert. Dabei wurde die zum ersten Aliquot addierte Menge an Methylquecksilber mit jedem weiteren Aliquot um die gleiche Menge erhöht, wobei die exakte Menge des addierten Standards ebenfalls durch Einwiegen auf der Analysewaage bestimmt wurde.

Im nächsten Schritt wurden die Quecksilberverbindungen aus den Extraktionslösungen in das organische Lösungsmittel Dichlormethan extrahiert, indem die Extraktionslösungen mit 6,0 mL Dichlormethan für zehn Minuten ausgeschüttelt wurden. Zur Unterstützung der sich anschließenden Phasentrennung wurden die Aliquote für zehn Minuten bei 2.460 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend die schwerere organische Phase mit einer langkanuligen Spritze entnommen. Die Rückextraktion der Quecksilberspezies in MQ-Wasser erfolgte durch 30-minütiges Ausgasen von je 1 mL bis 2 mL des organischen Lösemittels in 25 mL MQ-Wasser mittels Stickstoff.

Nach der Rückextraktion in MQ-Wasser wurden 15 mL der Extraktionslösung für die Methylquecksilberbestimmung mittels Purge&Trap-GC-AFS verwandt. Die Derivatisierung der Quecksilberspezies erfolgte im Derivatisierungsgefäß der Purge&Trap-Einheit. Hierzu wurde der pH-Wert der Messlösung mit 0,5 mL eines 4 mol/L Acetat-Puffers auf einen Wert von 4,6 eingestellt und 0,2 mL des Derivatisierungsreagenzes Natriumtetrapropylborat (2%ig) hinzugegeben, wodurch das Derivatisierungsreagenz im Überschuss vorlag. Danach wurde das Derivatisierungsgefäß sofort verschlossen und die Lösung durch kurzes Durchgasen mit Helium gemischt. In der nachfolgenden 10-minütigen Derivatisierungsphase fand, wie in den Gleichungen 17-19 dargestellt, eine Umsetzung der Quecksilberspezies Methyl-, Ethylquecksilber und anorganisches Quecksilber statt. Das elementare Quecksilber zeigte keine Reaktion mit dem Derivatisierungsreagenz Natriumtetrapropylborat ( $\text{NaBPr}_4$ ) (Gleichung 20).



Anschließend wurden die flüchtigen Quecksilberverbindungen nach der dynamischen Headspace-Technik durch einen kontinuierlichen Heliumfluss mit einer Flussrate von 250 mL/min über einen Zeitraum von 30 min aus der Extraktionslösung ausgetrieben. Danach wurden die Quecksilberspezies nach der oben beschriebenen Methode mittels GC-AFS aufgetrennt und detektiert (KÜLLMER, 2002).

Zur gaschromatographischen Auftrennung der propylierten Quecksilberspezies wurde zunächst ein Temperaturprogramm verwandt, das bei einer Temperatur von 30 °C gestartet wurde. Nach 2 min wurde die Temperatur mit einer Heizrate von 20 °C/min auf eine Temperatur von 130 °C erhöht. Des Weiteren wurde ein modifiziertes Temperaturprogramm eingesetzt, bei dem im Gegensatz zu der zuvor durchgeführten kontinuierlichen Aufheizung eine 2-minütige Pause in der Aufheizphase bei einer Temperatur von 102 °C eingefügt wurde.

Zur Quantifizierung der Methylquecksilberkonzentration in den verschiedenen Probenmaterialien wurde das Standardadditionsverfahren in Kombination mit einer Normierung der Analyseergebnisse durch die Verwendung von Ethylquecksilberchlorid als interner Standard durchgeführt. Hierbei wurde die Methylquecksilberkonzentration aus den ermittelten Signalintensitäten von vier Aliquoten einer Probe mit definierten Mengen an zugesetztem Methylquecksilber berechnet.

Zur Ermittlung der Methylquecksilberkonzentration wurde zunächst die Signalintensität der Blindprobe von den ermittelten Signalintensitäten der Aliquote subtrahiert. Anschließend wurden die Signalintensitäten für Methylquecksilber aus den ermittelten Signalintensitäten von Methyl- und Ethylquecksilber wie folgt normiert:

$$nSI_{MeHg} A_n = \frac{SI_{MeHg} A_n \times SI_{EtHg} A_1}{SI_{EtHg} A_n} \quad \text{Gl. 21}$$

$nSI_{MeHg} A_n$  = normierte Methylquecksilbersignalintensität des n-ten Aliqotes [mVs]

$SI_{MeHg} A_n$  = ermittelte Methylquecksilbersignalintensität des n-ten Aliqotes [mVs]

$SI_{EtHg} A_1$  = ermittelte Ethylquecksilbersignalintensität des ersten Aliqotes [mVs]

$SI_{EtHg} A_n$  = ermittelte Ethylquecksilbersignalintensität des n-ten Aliqotes [mVs]

Aus den normierten Signalintensitäten einer Probe erfolgte die Quantifizierung der Methylquecksilberkonzentration über die durch die Standardaddition hinzugefügte Methylquecksilbermenge im Aliquot. Dabei wurde die addierte Methylquecksilbermenge auf die anfängliche Aliquotenmenge bezogen, so dass sich die normierte

Signalintensität aus der unbekanntem Methylquecksilbermenge im Aliquot und der addierten Menge an Methylquecksilberstandard im Bezug zur ursprünglichen Aliquotmenge zusammensetzte (Gleichung 22).

$$nSI_{MeHg} A_n = k_{MeHg} \left( \frac{m_{MeHg} A_n}{m_n} + \frac{m_{MeHg} S_n}{m_n} \right) \quad \text{Gl. 22}$$

$m_{MeHg} A_n$  = Methylquecksilbermenge im n-ten Aliquot [g]

$m_{MeHg} S_n$  = Methylquecksilbermenge durch Standardaddition [g]

$m_n$  = Menge des ursprünglichen n-ten Aliquots [g]

$k_{MeHg}$  = Proportionalitätsfaktor [-]

Da die normierte Signalintensität proportional mit der Methylquecksilberkonzentration anstieg und die unbekanntem Methylquecksilberkonzentration in allen Aliquoten einer Probe identisch war, konnte diese infolgedessen aus dem linearen Zusammenhang zwischen den normierten Signalintensitäten und den Methylquecksilberkonzentrationen durch die Standardaddition berechnet werden. Hierzu wurden zunächst die Parameter der Regressionsgrade wie folgt berechnet (Gleichung 23-25):

$$nSI_{MeHg} A_n = a + b \times c_n \quad \text{Gl. 23}$$

mit 
$$b = \frac{\sum (c_n - \bar{c}) \times (nSI_{MeHg} A_n - \overline{nSI})}{\sum (c_n - \bar{c})^2} \quad \text{Gl. 24}$$

und 
$$a = \overline{nSI} - b \times \bar{c} \quad \text{Gl. 25}$$

$c_n$  = Konzentration des Methylquecksilberstandards im n-ten Aliquot [ng/g]

$\bar{c}$  = mittlere Konzentration des Methylquecksilberstandards in den Aliquoten [ng/g]

$\overline{nSI}$  = mittlere normierte Signalintensität [mVs]

Im nächsten Schritt wurde die unbekannte Konzentration an Methylquecksilber in der Extraktionslösung über den Schnittpunkt der Regressionsgrade mit der Abszisse ( $y = 0$ ) berechnet (Gleichung 26).

$$c_E = -\frac{b}{a} \quad \text{Gl. 26}$$

$c_E$  = Methylquecksilberkonzentration in der Extraktionslösung [ng/g]

Aus dieser Konzentration wurde über die bekannte Menge an eingesetztem Probenmaterial in einer definierten Menge an Extraktionslösung die Methylquecksilberkonzentration im Probenmaterial bestimmt (Gleichung 27).

$$c_P = \frac{E}{P} \times c_E \quad \text{Gl. 27}$$

$E$  = Gesamtmenge der Extraktionslösung [g]

$P$  = Probenmenge [g]

$c_P$  = Methylquecksilberkonzentration in der Probe [ng/g]

### 2.6.2 Gesamtquecksilberbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtquecksilbergehalts erfolgte durch induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) unter Verwendung der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA). Die Analyse der Gesamtquecksilberkonzentration wurde an dem doppelfokussierenden ICP-MS Sektorfeldgerät Element 2 (Thermo Electron, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden die aufbereiteten Probenlösungen durch eine peristaltische Pumpe der Scott Sprühkammer mit einem mikrokonzentrischen PFA Zerstäuber dem ICP-MS zugeführt. Als Zerstäubergas wurde Argon verwendet. Die Betriebsbedingungen des ICP-MS sind in Tab. 26 zusammengefasst.

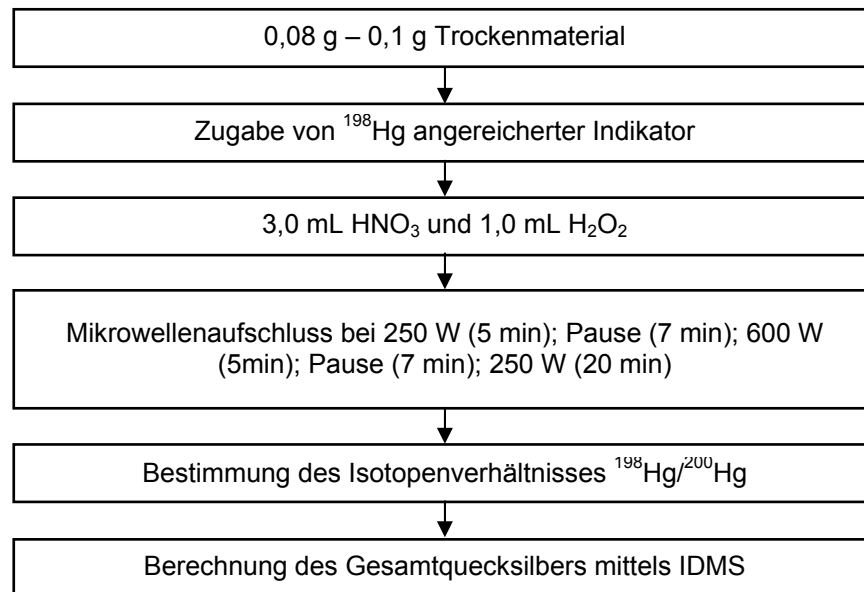
**Tab. 26: Betriebsparameter des ICP-MS**

Radiofrequenz-Leistung	1350 W
Kühlgasflussrate	16 L/min
Zerstäubergasflussrate	0,97 L/min
Hilfsgasflussrate	1,0 L/min
Probenaufnahmerate	0,1 mL/min
gemessene Isotope	$^{198}\text{Hg}$ , $^{200}\text{Hg}$
Integrationszeit pro Wert	0,1 s
Anzahl der Wiederholungen	10
Massenauflösung	300 $\Delta m/m$

Zur Durchführung der Isotopenverdünnungsanalyse wurde eine  $^{198}\text{Hg}$  angereicherte nicht kommerzieller Quecksilberisotopenlösung als Indikator verwandt, deren Isotopenzusammensetzung zunächst durch massenspektrometrische Messungen am ICP-MS bestimmt wurde. Die Isotopenhäufigkeiten setzten sich auf zwei Nachkommastellen gerundet wie folgt zusammen:  $0,00 \pm 0,00 \%$   $^{196}\text{Hg}$ ,  $97,70 \pm 0,33 \%$   $^{198}\text{Hg}$ ,  $1,93 \pm 0,00 \%$   $^{199}\text{Hg}$ ,  $0,14 \pm 0,00 \%$   $^{200}\text{Hg}$ ,  $0,06 \pm 0,00 \%$   $^{201}\text{Hg}$ ,  $0,14 \pm 0,00 \%$   $^{202}\text{Hg}$  und  $0,03 \pm 0,00 \%$   $^{204}\text{Hg}$ . Anschließend wurde der Indikatorgehalt ( $G_{Ind}$ ) der Isotopenlösung über eine inverse MSIVA bestimmt. Hierzu wurde ein Quecksilber(II)chloridstandard mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}$  Quecksilber pro mL Lösung und einer natürlichen Isotopenzusammensetzung ( $0,14 \%$   $^{196}\text{Hg}$ ,  $10,02 \%$   $^{198}\text{Hg}$ ,  $16,84 \%$   $^{199}\text{Hg}$ ,  $23,13 \%$   $^{200}\text{Hg}$ ,  $13,22 \%$   $^{201}\text{Hg}$ ,  $29,8 \%$   $^{202}\text{Hg}$  und  $6,85 \%$   $^{204}\text{Hg}$ ) verwandt. Zu 0,20 g dieses Quecksilberstandards wurden 0,28 g Indikator in 45,7 g einer 1%igen  $\text{HNO}_3$ -Lösung eingewogen und das Isotopenverhältnis bestimmt.

Zur Bestimmung der Gesamtquecksilberkonzentration im Probenmaterial wurde ein mikrowellenunterstützter Aufschluss mit 3,0 mL einer 65 %igen Salpetersäure und 1,0 mL einer 30 %igen Wasserstoffperoxidlösung durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Blindprobe hergestellt, indem ein Mikrowellenaufschluss ohne Probenmaterial in den für den Aufschluss verwendeten Mikrowellengefäßen durchgeführt wurde. Anschließend erfolgte der Probenaufschluss mit 0,08 g bis 0,1 g Probenmaterial. Dabei wurden die eingesetzten Mengen an Probenmaterial und Indikator auf der Analysewaage eingewogen und mit den Aufschlusslösungen versetzt. Der Mikrowel-

lenaufschluss erfolgte in drei Schritten, wobei die Mikrowelle zunächst für 5 min mit 250 W anschließend 5 min mit 600 W und letztlich 20 min mit 250 W betrieben wurde. Zwischen den einzelnen Schritten lag eine 7-minütige Ruhephase. Die Aufschlusslösungen wurden vollständig in Zentrifugenröhrchen überführt und auf 20 mL mit MQ-Wasser aufgefüllt.



**Abb. 11: Aufarbeitungsschema zur Gesamtquecksilberbestimmung**

Zur Berechnung der Gesamtquecksilberkonzentration im Probenmaterial mittels Isotopenverdünnungsanalyse wurden die ermittelten Signalintensitäten für die Quecksilberisotope <sup>198</sup>Hg und <sup>200</sup>Hg verwandt. Hierbei gilt folgende Beziehung für das Isotopenverhältnis  $R$  in der isotopenverdünnten Probe:

$$R = \frac{{}^{198}\text{Hg}}{{}^{200}\text{Hg}} = \frac{{}^{198}h_{Pr} \cdot N_{Pr} + {}^{198}h_{Ind} \cdot N_{Ind}}{{}^{198}h_{Pr} \cdot N_{Pr} + {}^{200}h_{Ind} \cdot N_{Ind}} \quad \text{Gl. 28}$$

$R$	= Quecksilberisotopenverhältnis der isotopenverdünnten Probe	[-]
${}^{198}\text{Hg}$	= Intensität auf der Massenzahl 198	[cps]
${}^{200}\text{Hg}$	= Intensität auf der Massenzahl 200	[cps]
${}^{198}h_{Pr}, {}^{200}h_{Pr}$	= Häufigkeiten der Isotope ${}^{198}\text{Hg}$ und ${}^{200}\text{Hg}$ in der Probe	[%]
${}^{198}h_{Ind}, {}^{200}h_{Ind}$	= Häufigkeiten der Isotope ${}^{198}\text{Hg}$ und ${}^{200}\text{Hg}$ im Indikator	[%]
$N_{Pr}$	= Anzahl der Quecksilberatome in der Probe	[-]
$N_{Ind}$	= Anzahl der Quecksilberatome im Indikator	[-]

Die Häufigkeiten der Quecksilberisotope ( ${}^{198}h_{Pr}, {}^{200}h_{Pr}, {}^{198}h_{Ind}, {}^{200}h_{Ind}$ ) wurden zuvor durch Isotopenverhältnismessungen der Probe sowie des Indikators bestimmt. Zusätzlich wurde die Anzahl der Quecksilberatome im Indikator aus dem Produkt der bekannten Konzentration sowie der bekannten Einwaage berechnet. Anschließend wurde aus dem gemessenen Isotopenverhältnis die unbekannte Anzahl an Quecksilberatomen ( $N_{Pr}$ ) in der Probe ermittelt. Die Berechnung der Elementkonzentration ( $c_{Hg}$ ) in der Probe erfolgte unter Berücksichtigung des gemessenen Blindwertes nach Gleichung 29.

$$c_{Hg} = \frac{1}{E_{Pr}} \left( E_{Ind} \cdot G_{Ind} \cdot \frac{M_{Hg}}{N_A} \cdot \frac{{}^{198}h_{Ind} - R \cdot {}^{200}h_{Ind}}{R \cdot {}^{200}h_{Pr} - {}^{198}h_{Pr}} - B \right) \quad \text{Gl. 29}$$

$c_{Hg}$	= Quecksilberkonzentration der Probe	[ng/g]
$E_{Pr}; E_{Ind}$	= Einwaage der Probe bzw. des Indikators	[g]
$G_{Ind}$	= Indikatorgehalt	[Atome/g]
$M_{Hg}$	= Molmasse von Quecksilber	[g/mol]
$N_A$	= Avogadro-Konstante	[Atome/mol]
$B$	= Blindwert	[g]

### 2.6.3 Bestimmung der Schwefelintermediate

Zur Untersuchung einer *in vivo* Reduktion von Sulfat im Intestinaltrakt der Termiten *Mastotermes darwiniensis* erfolgte eine Bestimmung der Schwefelspezies. Hierzu wurden 100 µL des flüssigen Darminhalts unter Sauerstoffausschluss mit 210 µL eines Derivatisierungsreagenzes, bestehend aus 100 µL HEPES-Puffer, 100 µL Acetonitril sowie 10 µL Monobrombiman, versetzt. Anschließend wurde diese Lösung für 30 min unter Schütteln im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen der Derivatisierungsreaktion wurden 100 µL Methansulfonsäurelösung hinzugegeben und die Probenansätze bis zur weiteren Aufbereitung bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der Schwefelspezies im Darmtrakt der Termiten erfolgte am Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie und FB2, Abteilung Marine Mikrobiologie, an der Universität Bremen nach der Methode von RETHMEIER ET AL. (1997). Dabei wurden je 50 µL der Probenlösungen zur Abtrennung des elementaren Schwefels mit 50 µL Chloroform ausgeschüttelt, bis keine Gelbfärbung mehr in der wässrigen Phase zu erkennen war. Anschließend wurden die wässrigen Phasen mit einer Eppendorf Mikropipette abgenommen und zur Sulfatbestimmung mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) eingesetzt. Die verbliebenen Chloroformphasen wurden für die elementare Schwefelbestimmung verwandt.

Die Bestimmung der elementaren Schwefelkonzentration erfolgte mittels Reverse-Phase HPLC (Merck-Hitachi System) durch UV Absorption bei 263 nm. Als Säule wurde eine LiChrospher 100, RP 18 Säule (125-4; 5 µm) verwandt und der Schwefel mit einem 20:1 Methanol-Wasser-Gemisch von der Säule eluiert. Die Flussrate betrug 1 mL/min.

Der Sulfatgehalt wurde mittels HPLC mit einer Anionenaustauschersäule (Polyspher IC AN-1 (Merck)) und anschließender Detektion durch indirekte UV Messung bei 254 nm mit einem Merck-Hitachi L-4250 UV-Vis Detektor nachgewiesen. Die Elutionslösung mit einem pH-Wert von 4,0 setzte sich aus 1,5 mmol/L Phthalsäure 1,38 mmol/l Tris(hydroxymethyl)amminomethan und 300 mmol/L Borsäure zusammen. Die Flussrate betrug 1,3 mL/min.

Die Auftrennung der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobrombiman derivatisierten niedermolekularen Schwefelspezies Thiosulfat, Sulfid und Sulfid erfolgte mittels HPLC (Merck-Hitachi System), die mit einer L-6210 Pumpe verbunden war. Dabei war die HPLC mit einer Reversed-Phase Säule (LiChrospher 60, RP select B (125-4; 5 µm)) ausgestattet, die in einem LaChrom Säulenofen bei einer Temperatur von 35 °C betrieben wurde. Dieses System war mit einem Fluoreszenzdetektor (F-1050) verbunden, welcher die Analyten bei 380 nm anregte und das emittierte Licht bei 480 nm detektierte. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Zur Elution der Schwefelspezies wurde die HPLC mit einem Gradientensystem aus (A) 0,25%iger Essigsäure (pH 4,0) und (B) 100%igem Methanol wie folgt betrieben: 0 min bis 7 min: 12 % B; 7 min bis 15 min: 12 % bis 30 % B; 15 min bis 19 min: 30 % B; 19 min bis 23 min: 30 % bis 50 % B; 23 min bis 30 min: 50 % bis 100 % B; 30 min bis 33 min: 100 % B; 33 min bis 33,1 min: 100 % bis 12 % B; 33,1 min bis 36 min: 12 % B.

Die Quantifizierung der einzelnen Schwefelspezies erfolgte über eine externe Kalibrierung.

## 2.7 Berechnungen der Gesamt- und Methylquecksilberkonzentrationen

Zur Berechnung der Gesamtquecksilberanreicherung im Termitengewebe durch eine erhöhte Quecksilberaufnahme mit der Nahrung wurde die ermittelte Quecksilberkonzentration in den Termiten um die Gesamtquecksilberkonzentration in unbelasteten Termiten sowie um die durch die im Intestinaltrakt vorhandene Quecksilbermenge bereinigt. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 30.

$$Hg_a = Hg_m - Hg_{ter0} - Hg_i \quad \text{Gl. 30}$$

$Hg_a$  = Hg-Konzentration in den Termiten durch Quecksilberakkumulation [ng/g]

$Hg_m$  = Quecksilberkonzentration in den Termiten [ng/g]

$Hg_{ter0}$  = Hg-Konzentration in den Termiten ohne Hg-Zusatz im Futter [ng/g]

$Hg_i$  = Hg-Konzentration im Intestinalsystem [ng/g]

Die durch die Quecksilbermenge im Intestinaltrakt hervorgerufene Quecksilberkonzentration wurde nach Gleichung 31 berechnet.

$$Hg_i = Hg_{sd} \times Nahr_{auf} \times Nahr_{ret} \quad \text{Gl. 31}$$

$Hg_{sd}$  = Hg-Konzentration im Sägemehl [µg/g]

$Nahr_{auf}$  = Nahrungsaufnahme pro g Termiten und Tag [µg/g d]

$Nahr_{ret}$  = Verweildauer des Sägemehls im Intestinaltrakt<sup>\*)</sup> [d]

<sup>\*)</sup> entspricht 1d (KÖNIG ET AL., 2002)

Der Anteil des akkumulierten Methylquecksilbers im Termitengewebe wurde nach Gleichung 32 berechnet.

$$MeHg_a = MeHg_m - MeHg_{ter0} \quad \text{Gl. 32}$$

$MeHg_a$  = Methylquecksilberkonzentration im Gewebe durch Akkumulation [µg/g]

$MeHg_m$  = Methylquecksilberkonzentration in Termiten [µg/g]

$MeHg_{ter0}$  = Methylquecksilberkonzentration der unbelasteten Termiten [µg/g]

## 3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel wird die Weiterentwicklung einer Aufbereitungsmethode zur Methylquecksilberbestimmung mittels Purge&Trap Gaschromatographie-Atomfluoreszenzspektroskopie für verschiedene biologische Probenmaterialien beschrieben. Weiterhin werden die Ergebnisse der Methylquecksilberbildung im Faulschlamm des Klärwerks Mainz-Mombach sowie die Auswirkungen einer Aufnahme von anorganischem Quecksilber bei Insekten anhand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* dargestellt.

### 3.1 Methylquecksilberbestimmung

Zur Untersuchung einer mikrobiellen Methylquecksilberbildung war es notwendig, die Methylquecksilberkonzentrationen in verschiedenen biologischen Probenmaterialien zu bestimmen. Dabei stand für den Nachweis von Methylquecksilber im Arbeitskreis Heumann, Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Universität Mainz, ein Purge&Trap Gaschromatograph-Atomfluoreszenzdetektor (GC-AFD) zur Verfügung. Als Probenmaterialien wurden Bakterienkulturen, Termiten und Faulschlämme eingesetzt. Diese biologischen Probenmaterialien besaßen komplexe Matrices. Zusätzlich enthielten die Probenmaterialien zum Teil erhebliche Mengen an Quecksilber(II)chlorid, die zu Beginn der Methylierungsversuche zur Probe hinzugegeben wurden.

#### 3.1.1 Weiterentwicklung einer Methode zur Methylquecksilberbestimmung

Zur Aufbereitung des biologischen Probenmaterials mit einem hohen Quecksilberchloridgehalt wurde eine saure Phasenextraktion nach der Methode von LONGBOTTOM ET AL. (1973) durchgeführt. Für die Extraktion der Quecksilberspezies wurde Dichlormethan verwandt (BAEYENS ET AL., 1999; QIAN ET AL.; 2000). Anschließend wurden die Quecksilberspezies durch Rückextraktion aus dem organischen Lösemittel in MQ-Wasser für eine *in situ* Propylierung zur Methylquecksilberbestimmung mittels Purge&Trap-GC-AFS zur Verfügung gestellt (KÜLLMER, 2002). Die Quantifizierung der Methylquecksilberkonzentration erfolgte über das Standardadditionsverfahren. Hierbei wurde die Methylquecksilberkonzentration aus vier Aliquoten einer Probe mit definierten Mengen an zugesetztem Methylquecksilber berechnet.

Vor der Implementierung des Standardadditionsverfahrens wurde zunächst der Einfluss der Probenaufbereitung auf die Reproduzierbarkeit der ermittelten Signalintensitäten anhand von identischen Aliquoten einer Probe untersucht. Hierzu wurden Bakteriensuspensionen von *Desulfovibrio desulfuricans* im modifizierten Postgate Medium D (Tab. 21) hergestellt, die mit 0,5 ng Quecksilber als Methylquecksilber bzw. 5,0 ng Quecksilber als Methylquecksilber pro g Bakteriensuspension versetzt wurden. Anschließend erfolgte eine Aufbereitung des Probenmaterials nach der oben beschriebenen sauren Phasenextraktion. Hierbei wurde die saure Extraktionslösung vor der Extraktion in das organische Lösemittel in vier Aliquote eingeteilt und die Signalintensitäten der vier parallel behandelten Aliquoten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 27 wiedergegeben.

**Tab. 27: Methylquecksilbersignalintensitäten in Aliquoten.**

Methylquecksilber- konzentration in der Bakteriensuspension <sup>*)</sup> [ng/g]	Signalintensität [mVs]				Mittelwert ± Standardabweichung
	Aliquot 1	Aliquot 2	Aliquot 3	Aliquot 4	
0,5	29,4	31,4	30,6	50,4	35,5 ± 10,0
5,0	729,1	692,7	932,5	750,7	776,3 ± 107

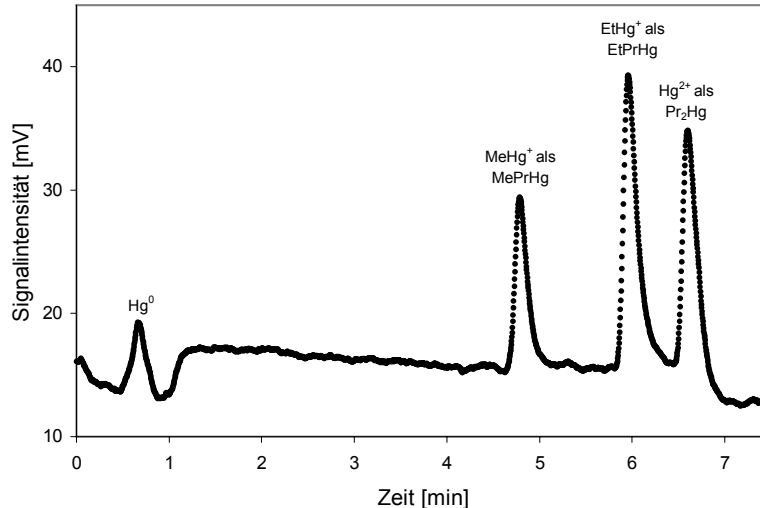
<sup>\*)</sup> von *Desulfovibrio desulfuricans*

Sowohl in den Proben mit 0,5 ng Methylquecksilber als auch 5,0 ng Methylquecksilber pro g Bakteriensuspension konnte in allen Aliquoten ein Methylquecksilbersignal detektiert werden. Allerdings variierten die ermittelten Signalintensitäten innerhalb einer Probe zum Teil erheblich. Die relativen Standardabweichungen der vier Signalintensitäten lagen bei 28 % für die Probe mit 0,5 ng Methylquecksilber pro g Bakteriensuspension und 14 % für die Probe mit 5,0 ng Methylquecksilber pro g Bakteriensuspension. Bei der Überprüfung der Werte nach dem Ausreißertest von DIXON UND DEAN (1951) wurde der Wert im vierten Aliquot aus der Messreihe mit 0,5 ng Quecksilber als Methylquecksilber pro g Bakteriensuspension als Ausreißer identifiziert ( $p = 0,95$ ).

Zur Korrektur der aufgetretenen Abweichungen wurde für die Methylquecksilberbestimmung mittels Standardadditionsverfahren Ethylquecksilberchlorid als interner

Standard eingesetzt und hierüber die ermittelten Signalintensitäten normiert. Hierzu wurde der interne Standard zu Beginn der Probenaufbereitung zur Probe hinzugegeben und nach der Bestimmung der Signalintensitäten von Ethyl- und Methylquecksilber die Normierung der Signalintensitäten von Methylquecksilber für alle Aliquote einer Probe nach Gleichung 21 durchgeführt.

Durch die Verwendung von Ethylquecksilberchlorid als interner Standard musste neben dem elementaren Quecksilber und den propylierten Quecksilberspezies Methylpropyl- und Dipropylquecksilber zusätzlich Ethylpropylquecksilber bei der gaschromatographischen Auftrennung berücksichtigt werden. Zur Auftrennung wurde zunächst ein Temperaturprogramm zum Aufheizen der Kapillarsäule mit einer Starttemperatur von 30 °C (2 min) und einer kontinuierlichen Aufheizrate mit 20 °C/min bis zu einer Temperatur von 130 °C verwandt. In Abb. 12 ist die Auftrennung von  $\text{Hg}^0$  und den propylierten Quecksilberspezies  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$  und  $\text{Hg}^{2+}$  anhand eines Chromatogramms dargestellt.

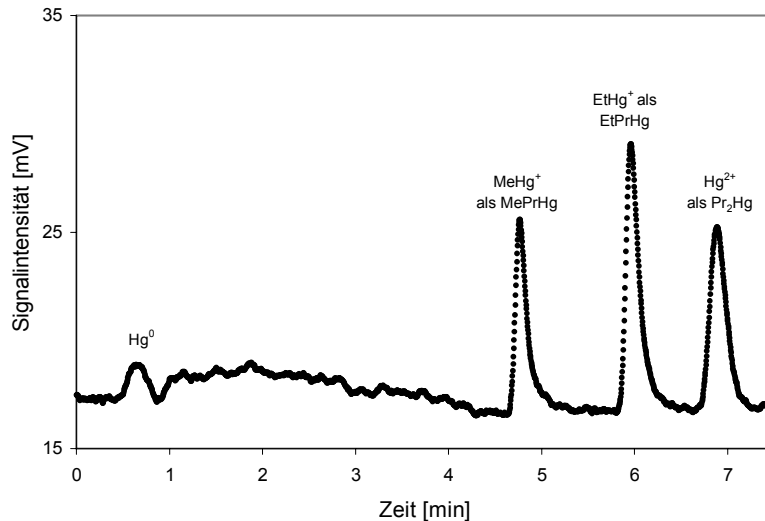


**Abb. 12: Chromatogramm der Quecksilberspezies bei kontinuierlicher Aufheizung der Kapillarsäule.**

Gaschromatographische Auftrennung von  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{MePrHg}$ ,  $\text{EtPrHg}$  und  $\text{Pr}_2\text{Hg}$  über einem Ofentemperaturprogramm mit 30 °C (2 min), 20 °C/min bis 130 °C.

Abb. 12 zeigt eine schlechte Basislinientrennung der Peakflächen von Ethylpropylquecksilber und Dipropylquecksilber. Aus diesem Grund wurde das Temperaturprogramm zur Auftrennung der Quecksilberspezies im Gaschromatograph modifiziert, indem die Aufheizphase bei 102 °C für 2 min unterbrochen wurde. Abb. 13 zeigt die

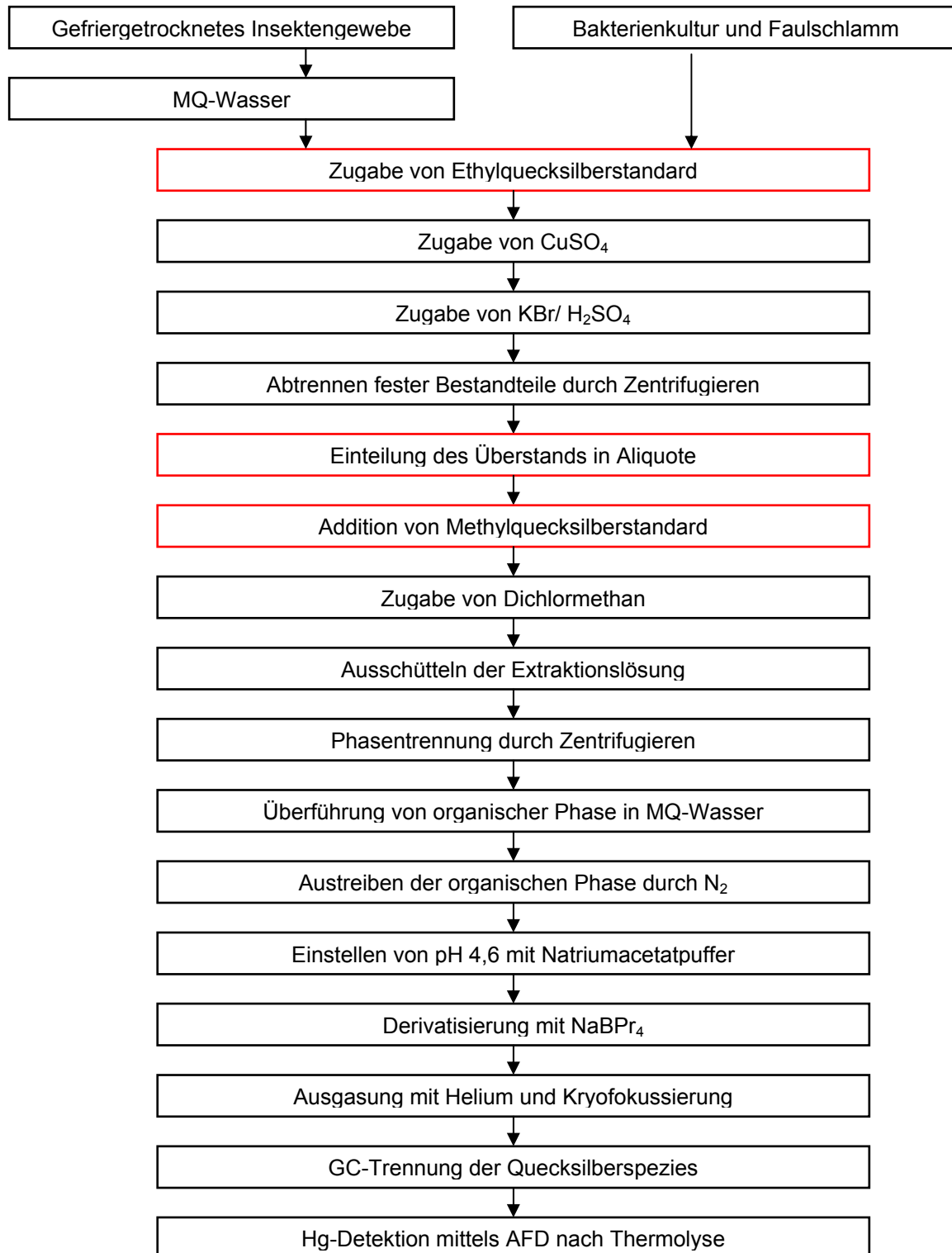
Auftrennung von  $\text{Hg}^0$  und der propylierten Quecksilberspezies  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$  und  $\text{Hg}^{2+}$  mit dem modifizierten Temperaturprogramm anhand eines Chromatogramms.



**Abb. 13: Chromatogramm der Quecksilberspezies bei diskontinuierlicher Aufheizung der Kapillarsäule.**  
 Gaschromatographische Auftrennung von  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{MePrHg}$ ,  $\text{EtPrHg}$  und  $\text{Pr}_2\text{Hg}$  über ein Ofentemperaturprogramm mit  $30\text{ }^\circ\text{C}$  (2 min),  $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  bis  $102\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $102\text{ }^\circ\text{C}$  (2 min),  $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  bis  $130\text{ }^\circ\text{C}$ ).

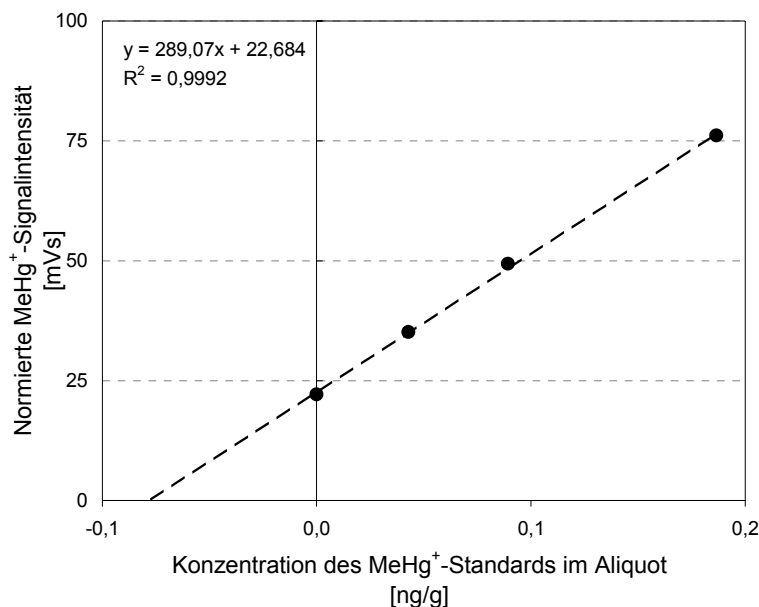
Abb. 13 zeigt, dass die eingefügte Pause bei der Aufheizung der Säule zu einer späteren Eluierung von Dipropylquecksilber führte. Hierdurch wurde eine Basislinientrennung der beiden Fraktionen von Ethylpropyl- und Dipropylquecksilber erreicht. Für elementares Quecksilber lag die Retentionszeit bei 0,7 min, für Methylpropylquecksilber bei 4,8 min, für Ethylpropylquecksilber bei 6,0 min und für Dipropylquecksilber bei 6,9 min.

In Abb. 14 sind die einzelnen Probenaufbereitungsschritte der weiterentwickelten Methode zur Methylquecksilberbestimmung unter Berücksichtigung der notwendigen Maßnahmen für die Quantifizierung mittels Standardadditionsverfahren in Kombination mit Ethylquecksilberchlorid als interner Standard zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 14: Aufarbeitungsschema zur Methylquecksilberbestimmung** in biologischen Proben mittels Purge&Trap Gaschromatographie-Atomfluoreszenzspektrometrie (rot: nötige Schritte zur Quantifizierung).

Die Quantifizierung der Methylquecksilberkonzentration in einer Probe erfolgte aus den normierten Methylquecksilbersignalintensitäten und den durch die Standardaddition hinzugefügten Methylquecksilberkonzentrationen in den Aliquoten. Dabei wurde die addierte Methylquecksilbermenge auf die anfängliche Aliquotenmenge bezogen und damit die Konzentrationserhöhung im Bezug zur unbekanntem Aliquotenkonzentration zur Methylquecksilberquantifizierung verwandt (Gleichung 22). In Abb. 15 sind die normierten Signalintensitäten einer Probe in Abhängigkeit von den Methylquecksilberkonzentrationen durch die Standardaddition dargestellt und die daraus resultierende Regressionsgrade eingezeichnet.



**Abb. 15: Normierte Methylquecksilbersignalintensitäten der Aliquote einer Probe.**

Abb. 15 zeigt die lineare Zunahme der normierten Signalintensitäten mit zunehmender Methylquecksilberkonzentration im Aliquot, mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,999.

### 3.1.2 Überprüfung der Richtigkeit der Methode

Nach der Ausarbeitung der Methode zur Methylquecksilberbestimmung in biologischen Probenmaterialien wurde diese anhand des zertifizierten Referenzmaterials CRM 463 sowie anhand von Bakterienkulturen mit definierten Mengen an hinzugefügtem Methylquecksilber auf ihre Richtigkeit überprüft.

Die Bestimmung der Methylquecksilberkonzentration erfolgte in drei Parallelen des zertifizierten Referenzmaterials CRM 463 mit einer Methylquecksilberkonzentration von  $2,83 \pm 0,15 \mu\text{g}$  Quecksilber als Methylquecksilber pro g CRM 463. Hierzu wurde das Referenzmaterial wie in Abb. 14 beschrieben aufbereitet und die Methylquecksilberkonzentration bestimmt. Zur Überprüfung der Notwendigkeit des internen Standards wurden zusätzlich zwei der drei Proben ohne Berücksichtigung dieses ausgewertet. Um die Richtigkeit der Methode bei einem Überschuss an anorganischem Quecksilber zu überprüfen, wurde zu einer vierten Probe 3,36 mg anorganisches Quecksilber pro g CRM hinzugegeben. Die Ergebnisse der Methylquecksilberbestimmung sind in Tab. 28 dargestellt.

**Tab. 28: Ermittelte Methylquecksilberkonzentration im CRM 463.**

Parallelen	Methylquecksilberkonzentration [ $\mu\text{g/g}$ ]			
	1	2	3	4 <sup>*)</sup>
Ohne internen Standard	2,73	1,93	n.b.	n.b.
Mit internen Standard	2,68	2,88	2,73	2,88

n.b. = nicht bestimmt; <sup>\*)</sup> = mit 3,36 mg Quecksilber als Quecksilberchlorid pro g CRM 463

Ohne Verwendung des internen Standards lagen die ermittelten Methylquecksilberkonzentrationen im CRM 463 bei  $2,73 \mu\text{g}$  und  $1,93 \mu\text{g}$  Quecksilber als Methylquecksilber pro g CRM 463. Damit wichen die ermittelten Werte mit 3,5 % und 31,8 % vom zertifizierten Wert des Referenzmaterials ab. Die relativen Standardabweichungen der ermittelten Signalintensitäten für Ethylquecksilber betragen 3,5 % für die erste und 36,2 % für die zweite Parallele. In den gleichen Proben, die unter Verwendung des internen Standards ausgewertet wurden, ergaben sich Abweichungen von 5,3 % und 1,7 %. Für die drei Parallelen, die mit dem internen Standard ausgewertet wurden, ergab sich im Mittel eine Methylquecksilberkonzentration von  $2,77 \pm 0,11 \mu\text{g}$  Quecksilber als Methylquecksilber pro g CRM 463. Die ermittelte Methylquecksilberkonzentration im CRM 463 mit zusätzlichem anorganischem Quecksilber lag bei  $2,88 \mu\text{g}$  Quecksilber als Methylquecksilber pro g CRM 463.

Zur Überprüfung der Richtigkeit der ausgearbeiteten Methode für die Methylquecksilberbestimmung in Bakteriensuspensionen wurden Bakterienkulturen von *Desulfovibrio desulfuricans* verwandt. Diese wurden im modifizierten Postgate Medium D (Tab. 21) angezogen und mit 0,60 ng bis 0,69 ng Quecksilber als Methylquecksilber pro g Bakteriensuspension versetzt. Anschließend erfolgten die Aufarbeitung des Probenmaterials sowie die Methylquecksilberquantifizierung nach der in Abb. 14 beschriebenen Methode. Die Ergebnisse dieser Methylquecksilberbestimmung sind in Tab. 29 dargestellt.

**Tab. 29: Wiederfindungsrate von Methylquecksilber in Bakterienkulturen<sup>\*)</sup>**

Eingestellte Methylquecksilberkonzentration [ng/g]	Bestimmte Methylquecksilberkonzentration [ng/g]	Wiederfindungsrate [%]
0,628	0,627	99,8
0,600	0,683	86,2
0,690	0,716	96,2

<sup>\*)</sup> von *Desulfovibrio desulfuricans* im modifizierten Postgate Medium D

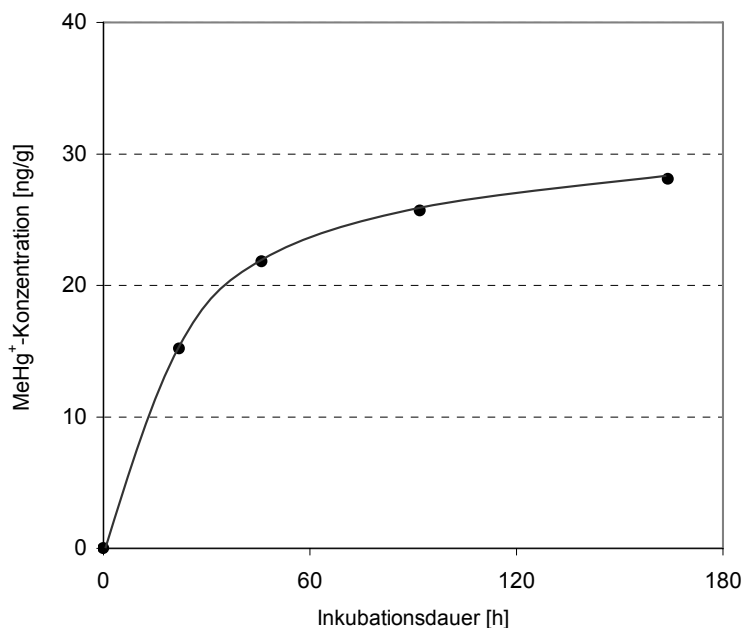
Die Wiederfindungsrate der drei Methylquecksilberbestimmungen in Bakterienkulturen lag in einem Bereich von 86,2 % bis 99,8 %.

## 3.2 Quecksilbermethylierung im Faulschlamm

Die Methylquecksilberbildung im Faulschlamm wurde an dem nicht entwässerten Faulschlamm aus den Faultürmen des Klärwerks Mainz-Mombach untersucht. Hierbei erfolgte die Methylquecksilberbestimmung nach der in Abb. 14 ausgearbeiteten Aufbereitungsmethode.

### 3.2.1 Zeitversuch

In diesem Versuch wurde die Methylquecksilberbildung im nicht entwässerten Faulschlamm über einen Zeitraum von 164 h untersucht. Hierzu wurde der Faulschlamm mit  $1,1 \mu\text{g}$  Quecksilber als Quecksilber(II)chlorid pro g Schlamm bei einer Temperatur von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Aus diesem Ansatz wurde nach 0 h, 22 h, 46 h, 92 h und 164 h Probenmaterial unter sterilen Bedingungen entnommen und in diesem die Methylquecksilberkonzentration bestimmt. In Abb. 16 sind die ermittelten Methylquecksilberkonzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer dargestellt.



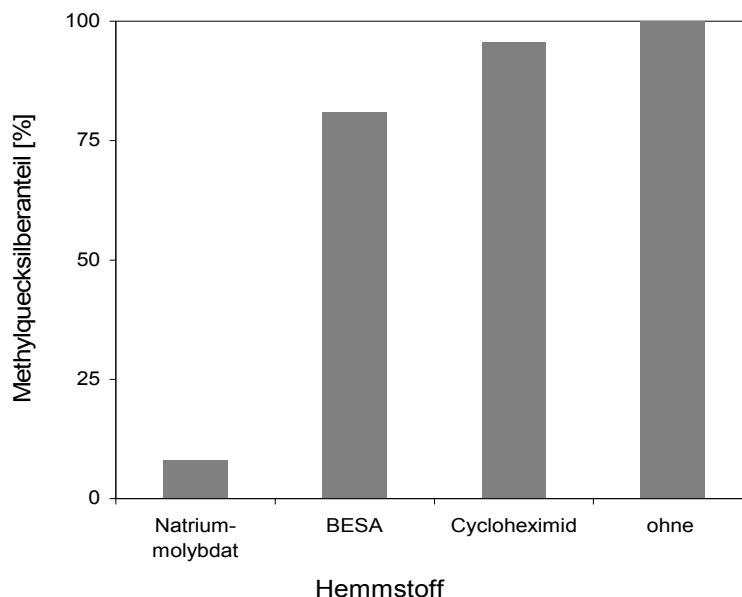
**Abb. 16: Methylquecksilberbildung im Faulschlamm**  
des Klärwerks Mainz-Mombach mit  $1,1 \mu\text{g}$  Quecksilber  
als Quecksilberchlorid pro g Faulschlamm.

Abb. 16 zeigt, dass die Methylquecksilberkonzentration im Faulschlamm zu Beginn der Inkubationsphase rasch anstieg. Nach 22 h konnten mit 15 ng Quecksilber als Methylquecksilber bereits 1,4 % und nach 46 h mit 22 ng Quecksilber als Methyl-

quecksilber pro g Faulschlamm Feuchtgewicht 2,0 % des eingesetzten Quecksilbers als Methylquecksilber wiedergefunden werden. Im weiteren Verlauf der Inkubation nahm die Methylquecksilberkonzentration nur noch im geringen Maße zu. Nach 164 h konnten 28,1 ng Quecksilber als Methylquecksilber pro g Faulschlamm Feuchtgewicht nachgewiesen werden. Damit betrug der Methylquecksilberanteil 2,6 % vom eingesetzten anorganischen Quecksilber. Folglich nahm die Methylquecksilberkonzentration in den letzten 118 h der Inkubationszeit um 0,6 % zu.

### 3.2.2 Hemmstoffversuche

Zur näheren Charakterisierung der für die Quecksilbermethylierung im Faulschlamm verantwortlichen Organismen wurden Hemmstoffversuche durchgeführt. Hierzu wurde je 1 g Faulschlamm in 20 mL des modifizierten Postgate Mediums D über einen Zeitraum von 3 d mit 0,89 µg bis 0,97 µg anorganischem Quecksilber pro g Gesamtprobe inkubiert. Die spezifische Hemmung erfolgte für die Sulfat-reduzierenden Bakterien mit 2 mmol/L Natriummolybdat, für die methanogenen Bakterien mit 0,6 mol/L Bromethansulfonsäure und für die Eukaryoten mit 90 mg Cycloheximid pro g Gesamtprobe. Abb. 17 zeigt die in den Hemmstoffproben gefundenen Methylquecksilberanteile in Relation zur ungehemmten Probe in den Faulschlammkulturen.



**Abb. 17: Methylquecksilberbildung in Faulschlammkulturen bei spezifischer Hemmung verschiedener Organismengruppen.**  
(Inkubationsbedingungen: 1 g Faulschlamm in 20 mL des modifizierten Postgate Medium D mit 0,9 µg HgCl<sub>2</sub>-Hg pro g Kulturmedium; Inkubationsdauer: 70 h).  
(BESA: Bromethansulfonsäure).

Die geringste Methylquecksilbermenge wurde in der mit Natriummolybdat gehemmten Probe gefunden. Sie entsprach nur 8 % der ohne Hemmstoff inkubierten Probe. In der mit Bromethansulfonsäure gehemmten Probe lag der Anteil des gebildeten Methylquecksilbers bei 81 %. Durch die Zugabe von Cycloheximid war die Methylquecksilberbildung mit 96 % kaum beeinflusst.

### 3.3 Quecksilberfütterung der Termiten *Mastotermes darwiniensis*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Termiten *Mastotermes darwiniensis* über einen Zeitraum von 14 d mit unterschiedlichen Konzentrationen an Quecksilber(II)chlorid gefüttert und anschließend die Auswirkungen der Quecksilberkonzentrationen auf die Nahrungsaufnahme sowie auf die Sterblichkeit der Tiere untersucht. Zusätzlich wurden die über die Nahrung aufgenommenen Mengen an Quecksilber berechnet und die Gesamtquecksilber- und Methylquecksilberanreicherungen in den Termiten bei unterschiedlichen Konzentrationen an anorganischem Quecksilber in der Nahrung bestimmt. Abschließend wurden Untersuchungen mit einem Sulfat-reduzierenden Bakterium aus dem Intestinaltrakt der Termiten vorgenommen.

#### 3.3.1 Auswirkungen der Quecksilberkonzentrationen in der Nahrung

Die Untersuchungen der Auswirkungen von unterschiedlichen anorganischen Quecksilberkonzentrationen in der Nahrung auf die Nahrungsaufnahme und Sterblichkeit der Termiten erfolgten an Versuchsgruppen von je 25 Tieren. Dabei wurden je 2 Versuchsgruppen Sägemehl mit einer Quecksilberkonzentration von 0 µg, 150 µg, 200 µg und 250 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl und je 4 Versuchsgruppen Sägemehl mit 25 µg, 50 µg, 75 µg und 100 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl als Nahrung angeboten.

##### 3.3.1.1 Nahrungsaufnahme der Termiten *Mastotermes darwiniensis*

Die mittlere Menge an aufgenommener Nahrung pro Versuchsgruppe wurde aus dem Quotienten der gefressenen Menge an Sägemehl und der Summe der Lebensstage der Termiten während der Versuchsdauer berechnet. Zu diesem Zweck wurde die gefressene Menge an Sägemehl aus der Gewichts Differenz der angebotenen Nahrungsportionen vor und nach der Fütterungsperiode bestimmt. Die Summe der Lebensstage je Versuchsgruppe wurde aus der täglichen Erfassung der lebenden Termiten ermittelt. In Tab. 30 sind die mittleren Sägemehlmengen, die pro Termiten und Tag aufgenommen wurden, in Abhängigkeit von der Quecksilberkonzentration in der Nahrung dargestellt.

**Tab. 30: Mittlere Sägemehlaufnahme der Termiten *Mastotermes darwiniensis*<sup>\*1)</sup>**

Quecksilberkonzentration im Sägemehl	Anzahl der Proben <sup>*2)</sup>	Mittlere Sägemehlaufnahme	Minimale und maximale Sägemehlsaufnahme	Standardabweichung
[µg/g]		[mg/Termite d]	[mg/Termite d]	
0	2	0,12	0,11 – 0,13	
25	4	0,08	0,00 – 0,16	0,07
50	4	0,09	0,06 – 0,15	0,04
75	4	0,04	0,01 – 0,06	0,02
100	4	0,04	0,00 – 0,09	0,04
150	2	0,07	0,06 – 0,07	
200	2	0,07	0,03 – 0,10	
250	2	0,04	0,01 – 0,07	

<sup>\*1)</sup> während eines 14-tägigen Fütterungszeitraums, <sup>\*2)</sup> mit je 25 Tieren

Die mittlere Nahrungsaufnahme ohne zusätzliches Quecksilber im Sägemehl lag bei 0,12 mg Sägemehl pro Termiten und Tag. Eine höhere Nahrungsaufnahme konnte nur bei je einer Versuchsgruppe, die mit 25 µg und 50 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl gefüttert wurden, festgestellt werden. In allen anderen Versuchsgruppen mit zusätzlichem Quecksilber war die Nahrungsaufnahme geringer. Dabei konnte keine Abhängigkeit der aufgenommenen Nahrungsmenge von der Menge an zugesetztem Quecksilber in der Nahrung festgestellt werden (Spearman Rangkorrelationskoeffizient:  $n = 24$ ,  $p = -0,42$ ) (KÖHLER ET AL., 2002). Die geringste mittlere Nahrungsaufnahme zeigte sich mit 0,04 mg pro Termiten und Tag bei den Termiten mit einer Quecksilberkonzentration von 75 µg, 100 µg und 250 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl.

3.3.1.2 Sterblichkeit der Termiten *Mastotermes darwiniensis*

Die Sterblichkeit der Termiten wurde über das relative Verhältnis von gestorbenen zu eingesetzten Termiten berechnet. In Tab. 31 ist die relative Sterblichkeit der Termiten je Versuchsgruppe in Abhängigkeit von der anorganischen Quecksilberkonzentration in der Nahrung dargestellt.

**Tab. 31: Relative Sterblichkeit der Termiten *Mastotermes darwiniensis* <sup>\*1)</sup>**

Quecksilberkonzentration im Sägemehl	Anzahl der Proben <sup>*2)</sup>	Mittlere Sterblichkeit	Minimale und maximale Sterblichkeit	Standardabweichung
[µg/g]		[%]	[%]	
0	2	30	24 - 36	
25	4	36	16 - 52	15,0
50	4	29	12 - 44	14,0
75	4	23	20 - 28	3,8
100	4	29	20 - 52	15,4
150	2	20	16 - 24	
200	2	24	13 - 32	
250	2	36	32 - 40	

<sup>\*1)</sup> während eines 14-tägigen Fütterungszeitraums, <sup>\*2)</sup> mit je 25 Tieren

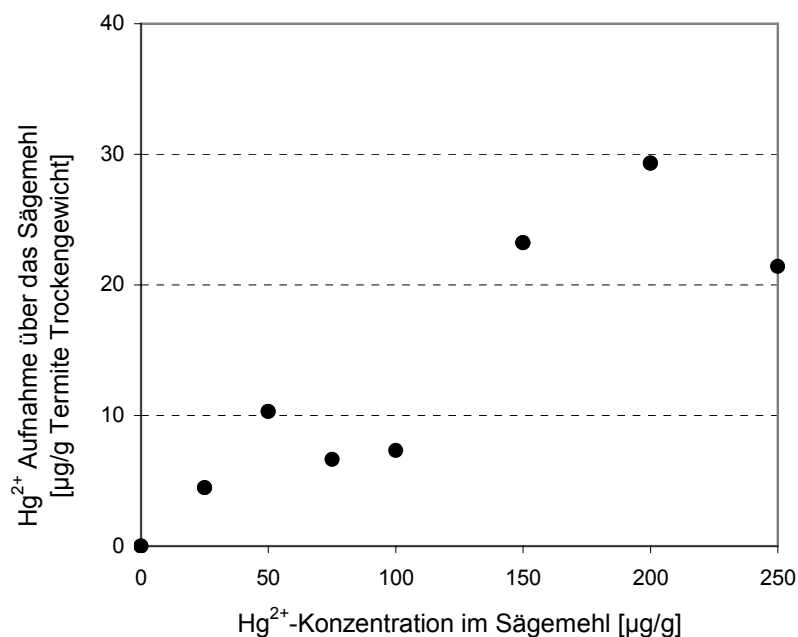
Die relativen Sterblichkeiten lagen in einem Bereich von 20 % bis 36 %. Der Mittelwert betrug 28,4 %. Die mittlere Sterblichkeit der Termiten bei der Aufnahme von unbelastetem Sägemehl entsprach mit 30 % dem Mittelwert. Eine Abhängigkeit der Sterblichkeit von der anorganischen Quecksilberkonzentration in der Nahrung konnte nicht festgestellt werden (Spearman Rangkorrelationskoeffizient:  $n = 24$ ,  $p = -0,17$ ).

### 3.3.2 Quecksilber in der Termite

Im Folgenden ist die Gesamt- und Methylquecksilberanreicherung in der Termite *Mastotermes darwiniensis* in Abhängigkeit von der mit der Nahrung aufgenommenen Quecksilbermenge dargestellt. Um die Quecksilberaufnahme mit der Anreicherung in Bezug setzen zu können, wurden alle Werte auf das Trockengewicht der Tiere mit identischer Quecksilberkonzentration bezogen.

#### 3.3.2.1 Aufnahme von anorganischem Quecksilber

Die Gesamtquecksilberkonzentration im unbehandelten Sägemehl lag unter 0,05 µg Quecksilber pro g Sägemehl. Durch die Beimischung von anorganischem Quecksilber wurden die Quecksilberkonzentrationen auf 25 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg und 250 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl erhöht. Aus diesen Konzentrationen und den mittleren Mengen des bei identischer Quecksilberkonzentration pro g Termiten Trockengewicht aufgenommenen Sägemehls wurden die durchschnittlichen Mengen an anorganischem Quecksilber, die von den Termiten mit dem Sägemehl aufgenommen wurden, berechnet. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Abb. 18 dargestellt.



**Abb. 18: Quecksilberaufnahme über die Nahrung.**

Die über das Sägemehl aufgenommenen Mengen an anorganischem Quecksilber lagen in einem Bereich zwischen 0,0 µg und 29,3 µg Quecksilber pro g Termiten Trockengewicht. Anhand der Abb. 18 ist zu erkennen, dass die aufgenommene Menge an anorganischem Quecksilber pro g Termiten Trockengewicht mit zunehmender Quecksilberkonzentration im Sägemehl ansteigt. Abweichungen hiervon zeigen die aufgenommenen Quecksilbermengen bei den Konzentrationen von 75 µg, 100 µg und 250 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl.

### 3.3.2.2 Gesamtquecksilber im Termitengewebe

Die Gesamtquecksilberkonzentration in den Termiten wurde mittels der im Kapitel 2.6.2 beschriebenen Methode der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA) bestimmt. In Tab. 32 sind die ermittelten Quecksilberkonzentrationen im Trockenmaterial der Termiten in Abhängigkeit von der anorganischen Quecksilberkonzentration im Sägemehl dargestellt.

**Tab. 32: Gesamtquecksilberkonzentration und Akkumulation in der Termiten *Mastotermes darwiniensis*<sup>\*1)</sup>.**

Anorganische Quecksilberkonzentration im Sägemehl	Gesamtquecksilberkonzentration in gefriergetrockneten Termiten	Tägliche anorganische Quecksilberaufnahme mit der Nahrung pro g Termiten (Trockengewicht) <sup>*2)</sup>	Akkumuliertes Quecksilber im Termitengewebe	Anteil zur Gesamtquecksilberaufnahme <sup>*3)</sup>
[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[%]
0	0,06	< 0,0003	-	-
25	2,12	0,3	1,7	38,6
50	5,08	0,7	4,3	41,6
75	7,37	0,5	6,8	103,6
100	6,49	0,5	5,9	80,9
150	5,23	1,7	3,5	15,1
200	11,16	2,1	9,0	30,7
250	12,86	1,5	11,3	52,7

\*1) nach einem 14-tägigen Fütterungszeitraum

\*2) Berechnung auf Basis der mittleren Nahrungsaufnahme

\*3) Berechnung unter Abzug des Quecksilbermenge im Darminhalt und der natürlichen Quecksilberkonzentration

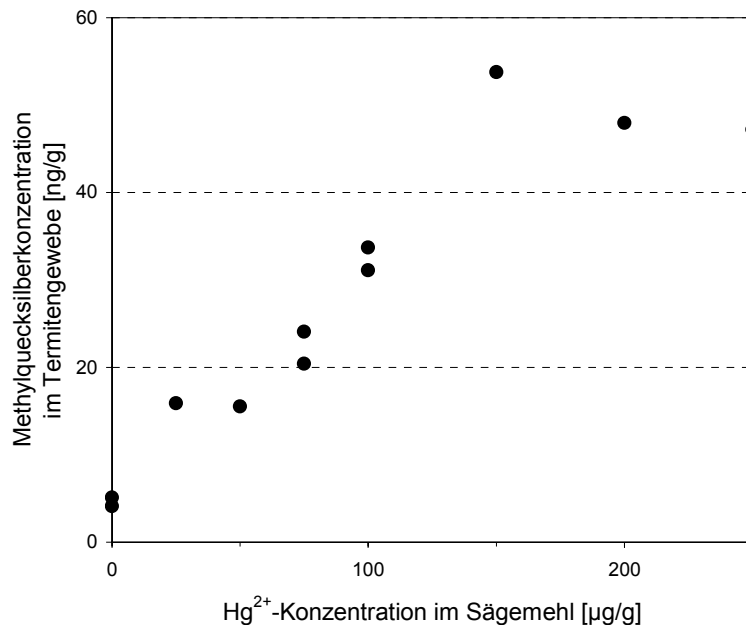
In den Termiten, die ohne zusätzliches Quecksilber im Sägemehl gefüttert wurden, wurde eine Gesamtquecksilberkonzentration von 61 ng Quecksilber pro g Termiten Trockengewicht festgestellt. Mit einer zunehmenden Quecksilberkonzentration in der Nahrung von 25 µg bis 250 µg anorganischem Quecksilber stiegen die Quecksilberkonzentrationen in den gefriergetrockneten Termiten von 2,12 µg auf 12,86 µg Gesamtquecksilber pro g Termiten Trockengewicht an. Abweichungen hiervon zeigten die Termiten, die mit einer Quecksilberkonzentration von 100 µg und 150 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl gefüttert wurden. In diesen beiden Gruppen wurde eine geringere Gesamtquecksilberkonzentration im Vergleich zu der vorangegangenen Gruppe ermittelt.

Da die Gesamtquecksilberkonzentration in den Termiten aus den gefriergetrockneten Tieren bestimmt wurde, setzte sich der Quecksilbergehalt aus der ursprünglich in der Termiten vorhandene Quecksilbermenge, der während der Fütterungszeit im Termitengewebe akkumulierten Menge an Quecksilber und der im Darmtrakt befindlichen Menge an anorganischem Quecksilber zusammen. Über die bekannte Quecksilberbelastung in unbehandelten Termiten und der nach Gleichung 31 durchgeführten Kalkulation der im Darmtrakt befindlichen Mengen an Quecksilber wurde dann die Menge an akkumuliertem Quecksilber nach der Gleichung 30 berechnet. Nach dieser Bereinigung der Messwerte ergab sich eine Gesamtquecksilberakkumulation im Termitengewebe von 1,7 µg bis 11,3 µg Quecksilber pro g Trockengewicht.

Weiterhin wurde der Anteil des akkumulierten Gesamtquecksilbers aus der Zunahme der Quecksilberkonzentration im Termitengewebe und der pro g Termiten Trockengewicht aufgenommenen Quecksilbermengen berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 32 wiedergegeben. Der Anteil des im Termitengewebe akkumulierten Gesamtquecksilbers lag in einem Bereich von 15,1 % bis 103,6 %. Dabei ließ sich keine Abhängigkeit von der anorganischen Quecksilberkonzentration durch die zur Verfügung gestellte Nahrung feststellen. Der höchste Anteil an akkumuliertem Gesamtquecksilber trat in den Gruppen mit der geringsten Nahrungsaufnahme auf.

### 3.3.2.3 Methylquecksilber im Termitengewebe

Die Methylquecksilberkonzentration in den gefriergetrockneten Termiten wurde mittels der in Abb. 14 dargestellten Methode bestimmt. Die erhaltenen Methylquecksilberkonzentrationen sind in Abb. 19 in Abhängigkeit der anorganischen Quecksilberkonzentrationen in der Nahrung dargestellt.

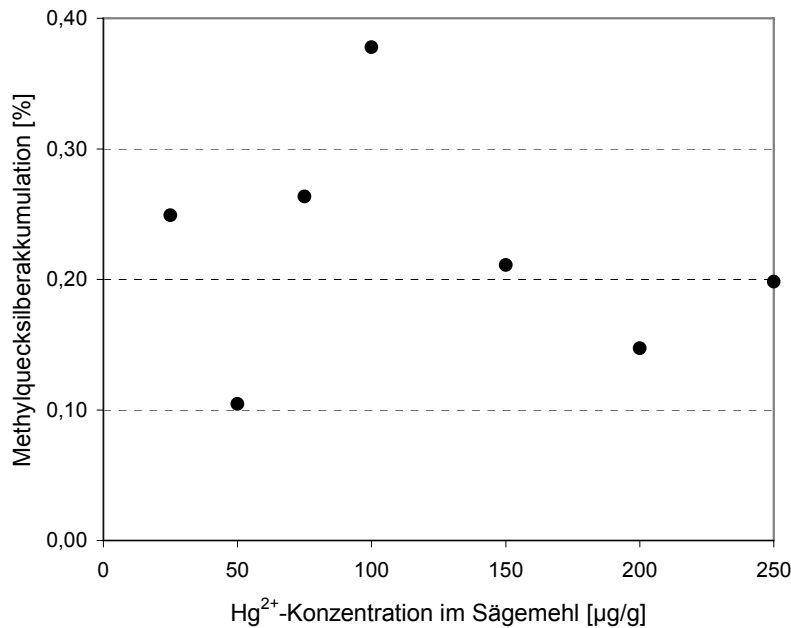


**Abb. 19: Methylquecksilberkonzentration im Termitengewebe.**

Die Methylquecksilberkonzentrationen in Termiten, die ohne zusätzliches Quecksilber im Holz oder Sägemehl gefüttert wurden, betragen 4,1 ng bis 5,6 ng Quecksilber pro g Termiten Trockengewicht. Bezogen auf das Lebendgewicht der Termiten lag der Methylquecksilbergehalt bei 1,3 ng Quecksilber pro g Termiten. Abb. 19 zeigt, dass mit einer Zunahme der Quecksilberkonzentration von 25 µg auf 150 µg Quecksilber pro g Sägemehl die Methylquecksilberkonzentrationen in den gefriergetrockneten Tieren von 15,9 ng bis auf 53,8 ng Quecksilber als Methylquecksilber pro g Termiten anstiegen. Eine weitere Erhöhung der anorganischen Quecksilberkonzentrationen bis zu 250 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl führte zu keiner weiteren Zunahme der Methylquecksilberkonzentrationen.

Aus den Methylquecksilberkonzentrationen in den Termiten und der mit dem Sägemehl pro g Termiten Trockengewicht aufgenommenen Quecksilbermengen wurde der

Anteil des akkumulierten Methylquecksilbers unter Berücksichtigung der Methylquecksilberkonzentration in den unbelasteten Tieren berechnet. Diese Berechnung erfolgte nach Gleichung 32. In Abb. 20 ist der Anteil des akkumulierten Methylquecksilbers in Abhängigkeit von der Quecksilberkonzentration in der Nahrung dargestellt.



**Abb. 20: Methylquecksilberakkumulation im Termitengewebe.**

Anteil des im Termitengewebe akkumulierten Methylquecksilbers zur über das Sägemehl aufgenommenen Menge an Quecksilber(II).

Der Anteil des im Termitengewebe akkumulierten Methylquecksilbers liegt in einem Bereich von 0,15 % bis 0,38 %. Eine Abhängigkeit von der Quecksilberkonzentration im Sägemehl konnte nicht festgestellt werden.

Neben der Methylquecksilberbestimmung in den Termiten wurden die Methylquecksilberkonzentrationen im Sägemehl bestimmt. Hierfür wurde stichprobenartig Sägemehl mit einer Konzentration von 0 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg und 250 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl verwandt. Dabei wurde mit 0,1 g Sägemehl mehr Probenmaterial zur Methylquecksilberbestimmung eingesetzt als von den untersuchten Termiten während der Fütterungsperiode gefressen wurde. In allen Proben konnte kein Methylquecksilber im Sägemehl detektiert werden.

### 3.3.3 Sulfat-reduzierende Bakterien im Intestinaltrakt

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sulfat-reduzierenden Bakterien aus dem Intestinaltrakt der Termiten *Mastotermes darwiniensis* untersucht. Hierzu wurde zum einen ihre *in vivo* Aktivität nachgewiesen und zum anderen das aus der Termiten isolierte Sulfat-reduzierende Bakterium *Desulfovibrio intestinalis* (FRÖHLICH ET AL., 1999) auf seine Fähigkeit zur Methylquecksilberbildung überprüft.

#### 3.3.3.1 Nachweis von Schwefelintermediaten

Zur Untersuchung der *in vivo* Aktivität von Sulfat-reduzierenden Bakterien im Intestinalsystem der Termiten *Mastotermes darwiniensis* wurden Termiten über einen Zeitraum von 3 d und 5 d mit und ohne Sulfat angereichertem Sägemehl gefüttert. Anschließend wurden die Schwefelspezies elementarer Schwefel, Sulfat, Sulfit, Thiosulfat und Sulfid im Intestinaltrakt nach der in Abschnitt 2.6.3 beschriebenen Methode bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 33 dargestellt.

**Tab. 33: Schwefelintermediate im Intestinaltrakt von *Mastotermes darwiniensis*.**

Fütterungsbedingungen	Schwefel [μmol/L]	Sulfat [mmol/L]	Sulfit [μmol/L]	Thiosulfat [μmol/L]	Sulfid [μmol/L]	Gesamt Schwefel [mmol/L]
3 d, ohne zusätzliches Sulfat	0,0	0,6	0,0	0,0	4,1	0,6
3 d, ohne zusätzliches Sulfat	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,4
5 d, ohne zusätzliches Sulfat	0,0	1,0	0,0	0,0	12,5	1,0
3 d, mit zusätzlichem Sulfat <sup>*)</sup>	0,0	17,5	0,0	391,0	197,5	18,1
3 d, mit zusätzlichem Sulfat <sup>*)</sup>	0,0	6,0	0,0	29,5	116,0	6,1
5 d, mit zusätzlichem Sulfat <sup>*)</sup>	6,2	23,9	0,0	14,6	115,4	24,0

<sup>\*)</sup> Konzentration: 1,0 mL einer 40 mmol/L Natriumsulfatlösung in 0,25 g Sägemehl

Wie der Tab. 33 zu entnehmen ist, konnten im Intestinaltrakt der Termiten ohne zusätzliches Sulfat in der Nahrung nur die Schwefelspezies Sulfat und Sulfid nachge-

wiesen werden. Die Konzentrationen des Sulfats lagen in einem Bereich von 0,4 mmol/L bis 1,0 mmol/L und die des Sulfids erreichten maximal 12,5  $\mu\text{M}$ . Durch den Sulfatzusatz in der Nahrung stiegen die Konzentrationen von Sulfat und Sulfid an. Die maximal gefundene Sulfatkonzentration lag bei 23,9 mM, die des Sulfids bei 197,5  $\mu\text{M}$ . Zusätzlich konnte in allen drei Proben Thiosulfat in einem Konzentrationsbereich von 14,6  $\mu\text{mol/L}$  bis 391,0  $\mu\text{mol/L}$ , und in einer der drei Proben 6,2  $\mu\text{mol/L}$  elementarer Schwefel nachgewiesen werden. Sulfit konnte weder in den Proben mit noch ohne Sulfatzusatz detektiert werden. Einen Einfluss der Fütterungsdauer auf die ermittelten Konzentrationen der Schwefelspezies war nicht festzustellen.

### 3.3.3.2 Quecksilbermethylierung durch eine Reinkultur

Die Untersuchung einer Quecksilbermethylierung durch die Aktivität von Bakterien aus dem Intestinaltrakt der Termiten wurde an dem Sulfat-reduzierenden Bakterium *Desulfovibrio intestinalis* durchgeführt. Zum Nachweis der Methylierung wurde *D. intestinalis* in verschiedenen Medien über einen Zeitraum von 3 d, 5 d und 8 d mit einer Quecksilberkonzentration von 1  $\mu\text{g}$  anorganischem Quecksilber pro g Kulturmedium inkubiert. Als Kulturmedien wurden das modifizierte DSMZ-Medium 63 sowie das modifizierte Postgate Medium D mit einer Sulfatkonzentration von 200  $\mu\text{mol/L}$  verwendet. Nach der Inkubation über 5 d traten die Bakterien mit einem Titer von ca.  $2,1 \times 10^8$  Bakterien pro mL Kulturmedium auf. Anschließend erfolgte der Nachweis des Methylquecksilbers nach der in Abb. 14 beschriebenen Methode.

Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass in den Ansätzen Methylquecksilber vorhanden war. Allerdings waren die ermittelten Methylquecksilbersignale so gering, dass eine einwandfreie Quantifizierung durch das Standardadditionsverfahren nicht erfolgen konnte. Die Methylquecksilberkonzentrationen lagen in einer Größenordnung von ungefähr 0,05 ng pro g Bakteriensuspension.

## 4 Diskussion

Zum Nachweis einer mikrobiellen Quecksilbermethylierung wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Probenaufbereitungsmethode zur Methylquecksilberbestimmung in biologischen Probenmaterialien mit einem hohen Gehalt an anorganischem Quecksilber ausgearbeitet. Diese wurde anhand von verschiedenen Materialien mit definierten Mengen an Methylquecksilber auf ihre Richtigkeit überprüft. Anschließend wurden Methylierungsversuche mit dem Faulschlamm der Kläranlage Mainz-Mombach, Bakterienkulturen von Sulfat-reduzierenden Bakterien sowie der Termitenart *Mastotermes darwiniensis* durchgeführt. Hierzu wurden diesen Probenmaterialien größere Mengen an anorganischem Quecksilber(II) zugeführt und nach einer bestimmten Zeit die Methylquecksilberkonzentration im Probenmaterial bestimmt.

### 4.1 Methylquecksilberbestimmung

In der analytischen Chemie stellt die Methylquecksilberbestimmung eine große Herausforderung dar. Insbesondere in biologischen Probenmaterialien, in denen der Analyt in geringen Konzentrationen auftritt, muss eine Analysetechnik angewandt werden, die einen speziesspezifischen Nachweis auch in geringen Konzentrationen ermöglicht. Zusätzlich muss zur Freisetzung des an die Matrix gebundenen Analyten eine Probenaufbereitung durchgeführt werden, die der konkreten analytischen Aufgabenstellung angepasst ist. Eine besondere Schwierigkeit stellt hierbei eine unerwünschte Speziesumwandlung während der Probenaufbereitung dar. Diese führt hauptsächlich bei einem geringen Methyl- zu anorganischem Quecksilber(II)-Anteil zu einem systematisch fehlerhaften Analyseergebnis. Weiterhin müssen bei der Methylquecksilberbestimmung aufgrund der geringen Konzentrationen des Analyten die Reinheit der Chemikalien sowie der verwendeten Labor- und Analysegeräte gewährleistet sein. Außerdem müssen Querkontaminationen und Memoryeffekte vermieden werden (MART, 1979; TSCHÖPEL UND TÖLG, 1982).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für den Nachweis einer mikrobiellen Quecksilbermethylierung die Methylquecksilbergehalte in verschiedenen biologischen Probenmaterialien mit sehr geringen Methylquecksilberkonzentrationen bestimmt. Für diese Untersuchungen stand ein Purge&Trap Gaschromatograph-Atomfluoreszenzspektrometer (GC-AFS) zur Verfügung. Dieses Analysesystem wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten von SCHEDLBAUER (1998) und KÜLLMER (2002) zur Konzentrationsbestimmung von Methylquecksilberverbindungen in Wasser-, Luft- und Feststoffproben eingesetzt. Bei dieser online gekoppelten Analysetechnik stellte die Atomfluoreszenzspektroskopie (CV-AFS) eine nachweisstarke Methode zur Detektion von Quecksilber im Ultraspurenbereich dar. Die Nachweisgrenze des in dieser Arbeit eingesetzten nicht-dispersiven Atomfluoreszenzdetektors (CV AFS 2, Brooks Rand Ltd, Seattle, USA) betrug 0,5 pg Quecksilber absolut (BROOKS RAND LTD, 1990). Durch die Koppelung des Atomfluoreszenzdetektors (AFD) mit einem Kapillar-Gaschromatograph (CGC) wurde ein speziesspezifischer Nachweis von Quecksilber erreicht. Aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze stellt diese Analysetechnik auch eine geeignete Methode für einen Methylquecksilbernachweis für die in dieser Arbeit verwandten Probenmaterialien dar.

Neben den sehr geringen Methylquecksilberkonzentrationen besaßen die eingesetzten Probenmaterialien aufgrund ihres hohen Anteils an organischer Substanz im Gegensatz zu den in vorangegangenen Arbeiten untersuchten Luft- und Wasserproben sehr komplexe Matrices. Hierdurch lag das Methylquecksilber, wie in anderen biologischen Probenmaterialien, an die Matrix gebunden vor (RAMAMOORTHY UND KUSHNER, 1975; SKYLLBERG ET AL., 2000). Um das Methylquecksilber von der komplexen biologischen Probenmatrix freizusetzen, musste eine Aufbereitung des Probenmaterials durchgeführt werden. Außerdem traten in den Probenmaterialien aufgrund der für die Methylierungsversuche hinzugegebenen Mengen an Quecksilber(II)chlorid im Vergleich zu den zu erwartenden Methylquecksilbermengen zum Teil hohe Gehalte an anorganischem Quecksilber auf. In Abhängigkeit von der durchgeführten Probenaufbereitung konnten diese hohen anorganischen Quecksilbergehalte bei der Quecksilberbestimmung zu extrem hohen Signalintensitäten führen, die bei wiederholtem Auftreten eine Schädigung des Detektors verursacht (BROOKS RAND LTD, 1990). Neben der Schädigung des Detektors bestand durch den Überschuss an anorganischem Quecksilber die Gefahr, dass bei einer unerwünschten Speziesum-

wandlung von anorganischem Quecksilber zu Methylquecksilber eine signifikante Erhöhung des zu bestimmenden Methylquecksilbers auftritt. Dieses während der Probenaufbereitung artifiziiell gebildete Methylquecksilber verursacht eine Überschätzung der Methylquecksilberkonzentration im Probenmaterial (HINTELMANN, 1999). Zusätzlich mussten bei der Auswahl der Aufbereitungsmethode die geringen Mengen der zur Verfügung stehenden Probenmaterialien berücksichtigt werden. Diese ließen keine mehrfachen Wiederholungsmessungen zu und setzten damit eine Analyse mit einer sehr hohen Präzision voraus. Damit stellen die in dieser Arbeit verwendeten Probenmaterialien mit ihren geringen Methylquecksilberkonzentrationen, hohen Mengen an anorganischem Quecksilber, komplexen Matrices sowie geringen Probenmengen eine besondere Herausforderung für die Methylquecksilberbestimmung dar.

Für die Auswahl einer geeigneten Probenaufbereitungsmethode mussten insbesondere die hohen anorganischen Quecksilberkonzentrationen des Probenmaterials berücksichtigt werden. Eine geeignete Aufbereitungsmethode für diese Probenmaterialien, die sowohl das Abtrennen von anorganischem Quecksilber gewährleistete sowie die artifiziielle Methylquecksilberbildung verhinderte, stellte die saure Phasenextraktion mit Kupfersulfat- und schwefelsaurer Kaliumbromidlösung dar (LONGBOTTOM ET AL., 1973; HINTELMANN, 1999). Bei dieser Methode wurde das anorganische Quecksilber aus der Probe abgetrennt und gelangte somit nicht mehr zum Detektor. Außerdem wurden bei der Überprüfung der Richtigkeit dieser Methode auch bei hohen anorganischen Quecksilber(II)gehalten keine erhöhten Methylquecksilbergehalte gefunden. Somit konnte eine unerwünschte Speziesumwandlung während der Probenaufbereitung ausgeschlossen werden. Auch BLOOM ET AL. (1997) und HINTELMANN (1999) stellten keine artifiziielle Methylquecksilberbildung bei der Anwendung der sauren Phasenextraktion zur Methylquecksilberbestimmung fest. Durch die Kombination der sauren Phasenextraktion mit der Purge&Trap-Technik konnte die Probelösung ohne weitere Aufreinigungsschritte zur Methylquecksilberbestimmung eingesetzt werden (LIANG ET AL., 1996).

Zur Quantifizierung der Methylquecksilberkonzentration wurde das Standardadditionsverfahren angewandt. Ausschlaggebend für die Auswahl dieses Verfahrens war die Verwendung von biologischen Probenmaterialien mit unterschiedlichen Matrices. Hierfür bot das Standardadditionsverfahren im Gegensatz zu einer externen Kalibrie-

rung den Vorteil, dass die jeweiligen Matrixeffekte der verschiedenen Probenmaterialien, die zu unterschiedlichen Depressionen der Signalintensitäten führen könnten, berücksichtigt wurden (FUNK ET AL., 1992). Ein Nachteil bei der Anwendung des Standardadditionsverfahrens resultiert aus dem hohen Zeitaufwand für die Methylquecksilberquantifizierung. Aufgrund der Messdauer von ca. 50 min pro Aliquot bedurfte die Methylquecksilberbestimmung inklusive Probenaufbereitung mindestens 8 h.

Eine Voraussetzung für die Durchführung des Standardadditionsverfahrens war, dass sich die ermittelten Signalintensitäten proportional zu den Methylquecksilbermengen in den einzelnen Aliquoten verhielten. Allerdings zeigten die Signalintensitäten von je vier identischen Aliquoten zweier Bakteriensuspensionen mit zugesetztem Methylquecksilber zum Teil deutliche Abweichungen zwischen den ermittelten Werten. Diese Abweichungen waren auf unterschiedliche Extraktionseffektivitäten während der Probenaufbereitung bzw. auf Unterschiede in der Detektorempfindlichkeit infolge von Temperaturschwankungen im Labor zurückzuführen.

Aufgrund der Abweichungen wurde eine Korrektur der ermittelten Werte vorgenommen. Diese erfolgte über eine Normierung der Signalintensitäten durch die Verwendung eines internen Standards. Wegen seiner chemischen Ähnlichkeit zu Methylquecksilber wurde Ethylquecksilber als interner Standard verwandt. Dieser verhielt sich während der Probenaufbereitung und Analyse analog zum Analyten Methylquecksilber (WESTÖÖ, 1966), so dass sich die Signalintensitäten des Analyten und des internen Standards in gleicher Weise veränderten. Auch in den Arbeiten von GARCÍA FERNÁNDEZ ET AL. (2000) und YANG ET AL. (2003) wurde Ethylquecksilber als interner Standard erfolgreich zur Methylquecksilberbestimmung mittels ICP-MS eingesetzt. Ein weiterer Aspekt für die Auswahl von Ethylquecksilber als interner Standard war seine Nachweisbarkeit mit dem in dieser Arbeit verwandten elementspezifischen Detektor.

Durch die Normierung der Methylquecksilbersignale nach Gleichung 21 (Kapitel 2.6.1) konnten die Einflüsse der Probenaufbereitung bzw. der Unterschiede in der Detektorempfindlichkeit infolge von Temperaturschwankungen im Labor auf die Signalintensitäten von Methylquecksilber korrigiert werden. Dies zeigt sich im Vergleich

der Analyseergebnisse des CRM 463, die mit und ohne die Verwendung des internen Standards ausgewertet wurden (Tab. 28). Während die erste Parallele mit einer relativen Standardabweichung von nur 3,5 % für die ermittelten Ethylquecksilbersignalintensitäten auch ohne die Verwendung des internen Standards zu einem guten Analyseergebnis führte, zeigte die zweite Parallele mit einer relativen Standardabweichung von 36,2 % für die ermittelten Ethylquecksilbersignalintensitäten ohne die Berücksichtigung des internen Standards eine Abweichung von mehr als 30 % vom zertifizierten Referenzmaterial. Durch die Korrektur mit dem internen Standard betrug die Abweichung der zweiten Parallele nur 1,7 %. Ein weiterer Vorteil des internen Standards bestand in der Vereinfachung der Probenaufbereitung. Aufgrund der durchgeführten Normierung mussten die einzelnen Aufbereitungsschritte nach der Zugabe der Standardlösungen weder vollständig noch reproduzierbar durchgeführt werden. Somit bestand nach der Zugabe der Standardlösungen keine Notwendigkeit mehr, die Mengen der eingesetzten Extraktionslösungen exakt zu bestimmen. Dies war insbesondere bei der Verwendung des leicht flüchtigen Extraktionsmittels Dichlormethan ein großer Vorteil.

Die Überprüfung der Richtigkeit der Methode wurde zum einen am zertifizierten Referenzmaterial 463, bestehend aus gefriergetrocknetem Thunfisch, durchgeführt. Dieses Referenzmaterial wurde verwendet, um die Richtigkeit der Methode für gefriergetrocknetes Termitenmaterial zu überprüfen, da für Insekten kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung stand. Zur Überprüfung der Richtigkeit der Methode für eine Methylquecksilberbestimmung in Bakteriensuspensionen wurden Bakteriensuspensionen von einem Sulfat-reduzierenden Bakterium hergestellt, die mit einer definierten Menge an Methylquecksilber versetzt wurden. In den untersuchten Materialien wurde auch bei hohen Mengen an zugesetztem anorganischem Quecksilber(II) eine gute Übereinstimmung der Analyseergebnisse mit den Methylquecksilberkonzentrationen im Probenmaterial festgestellt.

## 4.2 Quecksilbermethylierung im Faulschlamm

Über das Abwasser wird den kommunalen Klärwerken Quecksilber aus vielen kleinen diffusen Quellen zugeführt. Diese stammen beispielsweise aus quecksilberhaltigen Medikamenten oder amalgamhaltigen Zahnfüllungen. Dadurch können, insbesondere von Krankenhäusern, höhere Quecksilberbelastungen ausgehen (LORDI ET AL., 1978). Durch die Abwasserbehandlung der Klärwerke wird das Schwermetall nicht aus dem Abwasser entfernt. Das Quecksilber gelangt an organisches Material absorbiert mit den im Reinigungsprozess anfallenden Schlämmen in die Faultürme. Dort steht das Quecksilber den Mikroorganismen während des Faulungsprozesses zur Methylierung zur Verfügung. Um das Methylierungspotenzial erfassen zu können, wurde die Methylierungsaktivität im Faulschlamm untersucht.

### 4.2.1 Zeitversuch

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methylquecksilberbildung am Faulschlamm des Klärwerks Mainz-Mombach nachgewiesen. Hierzu wurde nicht entwässerter Faulschlamm des Klärwerks Mainz-Mombach mit  $1,1 \mu\text{g}$  anorganischem Quecksilber(II) pro g Faulschlamm inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 0 h, 22 h, 46 h, 92 h und 164 h wurde der Methylquecksilbergehalt in der Probe bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass der Methylquecksilbergehalt zu Beginn der Inkubation rasch anstieg. Nach 46 h waren bereits 2,0 % des eingesetzten Quecksilbers zu Methylquecksilber umgesetzt. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm der Methylquecksilbergehalt in der Probe nur noch im geringen Maße zu. Nach 164 Stunden lag der Anteil des umgesetzten Methylquecksilbers bei 2,6 %.

Der Verlauf der Methylquecksilberbildung im Faulschlamm zeigte deutliche Parallelen zu dem in verschiedenen anoxischen Sedimenten (limnisch, brackig und marin). Auch hier konnte nach der Zugabe von Quecksilber(II)chlorid zu Beginn der Inkubation ein rascher Anstieg des Methylquecksilbergehalts beobachtet werden, der nach wenigen Tagen eine Sättigung erreichte (COMPEAU UND BARTHA, 1985; PAK UND BARTHA, 1998; KING ET AL., 2000).

Vergleicht man den Anteil des gebildeten Methylquecksilbers im Faulschlamm mit dem in anoxischen Sedimenten, kann man eine etwas höhere Methylierungsaktivität

im Faulschlamm feststellen. Während der maximale Anteil des methylierten Quecksilbers in anoxischen Süßwassersedimenten nur 1,5 % bis 2,2 % betrug (PAK UND BARTHA, 1998), wurden im Faulschlamm 2,6 % des zur Verfügung stehenden Quecksilbers methyliert.

Als Ursache für die höhere Methylierungsaktivität im Faulschlamm kann der hohe Anteil an organischer Substanz angesehen werden. So konnten CHOI UND BARTHA (1994) in Sedimenten von Meeresmündungen und PAK UND BARTHA (1998) in Süßwassersedimenten zeigen, dass eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an organischer Substanz und der Methylierungsaktivität bestand. Im Vergleich zu einem Anteil zwischen 24 % und 31 % an organischer Substanz in den Sedimenten von Süßwasserseen, war der Anteil im Klärschlamm mit 54 % deutlich höher (PERS. MIT. SCHÄFER, KLÄRWERK MAINZ-MOMBACH).

#### **4.2.2 Hemmstoffversuche**

Zur Identifizierung der für die Quecksilbermethylierung im Faulschlamm verantwortlichen Bakteriengruppe wurden Hemmstoffversuche durchgeführt. Hierbei wurden die Gruppen der Sulfat-reduzierenden Bakterien, der methanogenen Bakterien sowie der eukaryotischen Organismen spezifisch mit Natriummolybdat, Bromethansulfonsäure und Cycloheximid gehemmt. Nach einer Inkubationszeit von 3 d wurde der Methylquecksilbergehalt in den verschiedenen Ansätzen bestimmt und mit einem nicht gehemmten Probenansatz verglichen.

Die Auswirkungen der verschiedenen Hemmstoffe auf die Methylquecksilberbildung waren sehr unterschiedlich. Während durch die Hemmung der SRB der Methylquecksilbergehalt in der Probe um mehr als 90 % reduziert wurde, konnte durch die spezifische Hemmung der methanogenen Bakterien lediglich ein Rückgang um ca. 20 % beobachtet werden. Der Einfluss der Hemmung der eukaryotischen Organismen auf die Verminderung des Methylquecksilbergehalts war mit weniger als 5 % sehr gering. Folglich konnten aufgrund dieses Hemmstoffversuchs die Sulfat-reduzierenden Bakterien als hauptverantwortliche Bakteriengruppe für die Quecksilbermethylierung im Faulschlamm identifiziert werden.

Dieses Ergebnis zeigte erneut eine Übereinstimmung mit vergleichbaren Untersuchungen in anoxischen Sedimenten. So konnte die überragende Rolle der Sulfat-reduzierenden Bakterien für die Quecksilbermethylierung in mehreren Hemmstoffversuchen nachgewiesen werden. Dabei fanden COMPEAU UND BARTHA (1985) eine Reduktion der Methylquecksilbermenge um 95 % in Sedimenten von Meeresmündungen bzw. PAK UND BARTHA (1998) um mehr als 95 % in Süßwassersedimenten.

Die hohe Übereinstimmung zwischen der Methylierungsaktivität im Faulschlamm und in Sedimenten lässt sich auf die vergleichbaren Beschaffenheiten der Habitate zurückführen. In beiden Fällen handelt es sich um anaerobe Lebensräume mit einem hohen Gehalt an organischem Material, das von Bakterien über die methanogene Nahrungskette abgebaut wird. An diesem Abbau sind Sulfat-reduzierenden Bakterien beteiligt (MADIGAN ET AL., 2003), die somit in beiden Habitaten gleichermaßen für die Quecksilbermethylierung zur Verfügung stehen.

In dem Klärwerk Mainz-Mombach, mit einer mittleren Quecksilberkonzentration von 0,62 mg Quecksilber pro kg Faulschlamm Trockengewicht bzw. 0,02 mg Quecksilber pro kg Faulschlamm Feuchtgewicht, werden pro Tag mit rund 300 m<sup>3</sup> Primärschlamm und 400 m<sup>3</sup> Überschussschlamm ca. 15 g Quecksilber in die Faultürme eingebracht (PERS. MIT. SCHÄFER, KLÄRWERK MAINZ-MOMBACH). Geht man für die Quecksilbermethylierung in den Faultürmen von dem in dieser Arbeit festgestellten Anteil von 2,6 % an umgewandeltem Quecksilber aus, beträgt die tägliche Methylquecksilberproduktion in den Faultürmen ca. 0,4 g Methylquecksilber.

### 4.3 Quecksilberfütterung der Termiten *Mastotermes darwiniensis*

Quecksilber tritt in der Umwelt ubiquitär auf (ADAM ET AL., 1980). Daher wird es von den Organismen mit der Nahrung aufgenommen und gelangt hierdurch auch in das Intestinalsystem von Menschen und Tieren. Dort steht das anorganische Quecksilber der Intestinalflora zur Methylierung zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Aufnahme von anorganischem Quecksilber exemplarisch anhand der Termiten *Mastotermes darwiniensis* untersucht. Hierzu wurden die Termiten mit anorganischem Quecksilber gefüttert und anschließend die Folgen der Quecksilberaufnahme in Bezug zur Nahrungsaufnahme, Sterblichkeit sowie Gesamt- und Methylquecksilberanreicherung untersucht. Die Auswahl einer Termitenart als Modellorganismus für Insekten erfolgte zum einen aufgrund der hohen Gesamtindividuenzahl von Termiten mit schätzungsweise  $10^{17}$  Tieren (ZIMMERMANN, 1982). Zum anderen spielen diese Tiere als Destruenten eine große Bedeutung im Kohlenstoffkreislauf, da sie die Fähigkeit besitzen schwer abbaubare Pflanzenstoffe umzusetzen (GRZIMEK, 1980).

#### 4.3.1 Auswirkungen der Quecksilberkonzentrationen in der Nahrung

Das von den Tieren mit der Nahrung aufgenommene Quecksilber ist ein sehr toxisches Element (GREENWOOD UND VON BURG, 1984). Im Folgenden werden die hieraus resultierenden Auswirkungen in Bezug auf die Nahrungsaufnahme und Sterblichkeit bei einer zunehmenden Quecksilberbelastung in der Nahrung darlegt.

##### 4.3.1.1 Nahrungsaufnahme der Termiten *Mastotermes darwiniensis*

Die mittlere Nahrungsaufnahme der Termiten ohne zusätzliches Quecksilber in der Nahrung betrug 0,12 mg Sägemehl pro Termiten und Tag. Eine größere Menge wurde nur in je einer von vier Versuchsgruppen mit einer geringen Quecksilberbelastung von 25 µg und 50 µg Quecksilber pro g Sägemehl festgestellt. In allen anderen Versuchsgruppen mit zusätzlichem Quecksilber war die Nahrungsaufnahme geringer. Aufgrund dieser Beobachtung liegt der Schluss nahe, dass die Termiten in der Lage sind, das Quecksilber in der Nahrung zu detektieren und mit einer verminderten Nahrungsaufnahme zu reagieren. Allerdings ließ sich kein statistischer Zusammenhang

zwischen der Menge an addiertem Quecksilber in der Nahrung und der Menge an aufgenommenem Sägemehl feststellen.

Auch in anderen Arbeiten wurde eine verminderte Nahrungsaufnahme bei erhöhten Quecksilberkonzentrationen in der Nahrung festgestellt. Dies konnte beispielsweise durch Fütterungsversuche an der Großen Wegschnecke (*Arion ater*) (MARIGOMEZ ET AL., 1986) und an der Kellerassel (*Porcellio scaber*) (JEREB ET AL., 2003) gezeigt werden. Ein weiterer Hinweis für eine sensible Reaktion der Termiten auf die erhöhten Quecksilberkonzentrationen ist, dass sie auch auf andere Giftstoffe mit einer verminderten Nahrungsaufnahme reagieren (PERS. MIT. FRÖHLICH).

#### 4.3.1.2 Sterblichkeit der Termiten *Mastotermes darwiniensis*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte während der 14-tägigen Fütterungsphase kein Einfluss der Quecksilberkonzentration in der Nahrung auf die Sterblichkeit der Termiten festgestellt werden. Die Sterblichkeit der Tiere ohne zusätzliche Quecksilberbelastung in der Nahrung betrug 30 %. Eine vergleichbare Sterblichkeit in einem Bereich von 20 % bis 36 % wurde für die Tiere mit erhöhten Quecksilbergehalten in der Nahrung festgestellt.

Auch bei anderen Invertebraten nahm die Sterblichkeit durch eine kurzfristig erhöhte Quecksilberaufnahme nicht zu. So konnten LAWRENCE UND MASON (2001) während einer sechstägigen Fütterungsphase an dem Amphipoden *Leptocheirus plumulosus* keine erhöhte Sterblichkeit feststellen, die auf den Konsum von belasteten Algen (2,8 µg anorganisches Quecksilber pro g Algen Feuchtwicht) zurückzuführen war. Auch die Schnecke *Arion ater* reagierte zu Beginn der Fütterungsphase nicht auf erhöhte Quecksilberkonzentrationen. Erst nach 16 d zeigten die Schnecken, die mit 1000 µg anorganischem Quecksilber pro g Nahrung gefüttert wurden, eine erhöhte Mortalität (MARIGOMEZ ET AL., 1986).

### 4.3.2 Quecksilber in der Termite

Nach der Aufnahme von Quecksilber mit der Nahrung kann dieses über das Intestinalsystem in das Gewebe aufgenommen werden (STREIT, 1991). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Quecksilberakkumulation in Abhängigkeit von der Quecksilberaufnahme untersucht. Hierzu wurden zunächst die unterschiedlichen Quecksilberbelastungen der Termiten durch die aufgenommenen Mengen an anorganischem Quecksilber in Abhängigkeit von den Quecksilberkonzentrationen in der Nahrung ermittelt. Anschließend wurde die Gesamt- und Methylquecksilberanreicherung im Termitengewebe in Bezug zu den Quecksilberkonzentrationen in der Nahrung bestimmt. Anhand der Methylquecksilberanreicherung im Termitengewebe mit und ohne zusätzliche Quecksilberbelastung in der Nahrung wurden Rückschlüsse auf die Quecksilbermethylierung des aufgenommenen Quecksilbers gezogen.

#### 4.3.2.1 Aufnahme von anorganischem Quecksilber

Die aufgenommenen Mengen an anorganischem Quecksilber wurden aus den gefressenen Mengen an Sägemehl und der jeweiligen Quecksilberkonzentration des Sägemehls berechnet. Sie dienten zur Beurteilung der Quecksilberbelastungen der Termiten und zur Berechnung der Gesamt- und Methylquecksilberakkumulation im Termitengewebe. Da die Gesamt- und Methylquecksilberakkumulation aus den Gesamt- und Methylquecksilberkonzentrationen des gesamten Termitenmaterials mit identischer Quecksilberkonzentration in der Nahrung bestimmt wurden, musste sich auch die Gesamtmenge des aufgenommenen Quecksilbers auf dieses Probenmaterial beziehen. Daher wurde zur Berechnung der aufgenommenen anorganischen Quecksilbermengen der Mittelwert aus den gefressenen Sägemehlmengen der Versuchsgruppen mit identischer Quecksilberkonzentration in der Nahrung bestimmt. Des Weiteren wurden hierdurch auch eventuelle Fehler in der Bestimmung der gefressenen Nahrungsmengen, die zum Beispiel durch die Verschleppung von Sägemehl oder dem Wiegen von Kot verursacht wurden, durch einen größeren Probenumfang minimiert.

Die Quecksilberkonzentration im Sägemehl setzte sich aus der Gesamtquecksilberkonzentration des unbehandelten Sägemehls und der addierten Menge an anorganischem Quecksilber zusammen. Die Bestimmung der Gesamtquecksilbermenge im

unbehandelten Sägemehl ergab einen Wert von weniger als 0,05 µg Quecksilber pro g Sägemehl. Damit war die Grundbelastung des Sägemehls mit den in verschiedenen Holzarten ermittelten Quecksilberkonzentrationen von maximal 0,053 µg Quecksilber pro g gefriergetrocknetem Holz vergleichbar (SCHEFFKNECHT, 2002). Aufgrund dieser geringen Quecksilberbelastung im unbehandelten Sägemehl besaß diese keinen Einfluss auf die eingestellten Konzentrationen der mit anorganischem Quecksilber angereicherten Proben.

Aus der aufgenommenen Menge an unbelastetem Sägemehl ergab sich eine Quecksilberbelastung von weniger als 0,01 µg Quecksilber pro g Termiten Trockengewicht. Dies entspricht einer täglichen Quecksilberaufnahme von weniger als 6 pg Quecksilber pro Termiten. Im Vergleich hierzu war die Quecksilberbelastung durch die mit der Nahrung aufgenommene Menge an anorganischem Quecksilber bei allen Termiten mit zusätzlichem Quecksilber in der Nahrung deutlich erhöht. Sie lag in einem Bereich zwischen 4,5 µg und 29,3 µg Quecksilber pro g Termiten Trockengewicht. Dabei stieg die Menge des mit der Nahrung aufgenommenen Quecksilbers mit Ausnahme der Proben von 75 µg, 100 µg und 250 µg anorganischem Quecksilber im Sägemehl linear an. Die Ausnahmen resultierten aus einer verminderten Sägemehlaufnahme bei den angegebenen Konzentrationen (siehe Tab. 30).

#### 4.3.2.2 Gesamtquecksilber im Termiten

In dieser Arbeit wurde die Gesamtquecksilberkonzentration in Termiten bestimmt, deren Nahrung mit unterschiedlichen Konzentrationen an anorganischem Quecksilber belastet war. In den Termiten, die ohne zusätzliches Quecksilber im Sägemehl gefüttert wurden, wurde eine Gesamtquecksilberkonzentration von 19 ng Quecksilber pro g Lebendgewicht bzw. 61 ng Quecksilber pro g Trockengewicht festgestellt. Damit lag die Gesamtquecksilberkonzentration in den Termiten in einer vergleichbaren Größenordnung wie in verschiedenen Organen von Kellerasseln, die aus einer Quecksilber unbelasteten Umgebung entnommen wurden (JEREB ET AL., 2003). Im Gegensatz dazu waren die Gesamtquecksilberkonzentrationen von aquatischen Insekten aus Quecksilber belasteten Wasserkörpern ca. um das 2 bis 25-fache höher (TREMBLAY ET AL., 1998) (siehe Tab. 34).

**Tab. 34: Gesamtquecksilberkonzentration in Invertebraten**

Probe	Gesamtquecksilber		Referenz
	[ng/g]		
	Lebendgewicht	Trockengewicht	
<i>Mastotermes darwiniensis</i> <sup>1)</sup> (Isoptera, Insecta)	19	61	eigene Arbeit
<i>Porcellio scaber</i> (Isopoda, Crustacea)			
Drüsengewebe	9,9	n.b.	JEREB ET AL. (2003)
Intestinaltrakt	30	n.b.	
Insekten <sup>1,2)</sup> aus aquatischen Lebensräumen			
unbelasteter Wasserkörper	n.b.	50 - 160	TREMBLAY ET AL. (1998)
belasteter Wasserkörper	n.b.	140 - 1500	

<sup>1)</sup> vollständige Insekten <sup>2)</sup> aus den Insektenordnungen Trichoptera und Diptera, n.b. = nicht bestimmt

Mit einer zunehmenden anorganischen Quecksilberbelastung in der Nahrung von 25 µg bis 250 µg Quecksilber pro g Sägemehl nahm auch die Gesamtquecksilberkonzentration in den Termiten von 2,1 µg auf 12,9 µg pro g Trockengewicht zu. Dabei resultieren die im Trockenmaterial der Termiten ermittelten Quecksilberkonzentrationen aus den Quecksilbermengen im Termitengewebe und des Intestinaltrakts. Aus diesem Grund wurde die Zunahme der Quecksilberkonzentration im Termitengewebe, die durch die Aufnahme des quecksilberhaltigen Sägemehls erfolgte, unter Berücksichtigung der Quecksilbermengen im Intestinaltrakt sowie der Quecksilberkonzentration in den unbelasteten Termiten, berechnet. Danach ergab sich eine Gesamtquecksilberakkumulation im Termitengewebe von 1,7 µg bis 11,3 µg Quecksilber pro g Trockengewicht. Damit stieg die Gesamtquecksilberkonzentration im Termitengewebe im Vergleich zu unbelasteten Termiten um das 30 bis 190-fache an. Dieses Ergebnis zeigt eine eindeutige Akkumulation des über die Nahrung aufgenommenen Quecksilbers im Termitengewebe. Dass die Quecksilberbelastung in der Umgebung einen direkten Einfluss auf die Gesamtquecksilberkonzentration im Insektengewebe besitzt, zeigt sich auch in einer höheren Gesamtquecksilberkonzentration in aquatischen Insekten bei zunehmender Quecksilberbelastung im Wasserkörper (TREMBLAY ET AL., 1998).

Bezieht man die im Termitengewebe akkumulierte Menge an Gesamtquecksilber auf die mit der Nahrung aufgenommene Menge an anorganischem Quecksilber, zeigt sich, dass 15 % bis 104 % des aufgenommenen Quecksilbers im Termitengewebe wieder zu finden waren. Hierbei konnte kein Einfluss der anorganischen Quecksilberkonzentration in der Nahrung und dem Anteil des akkumulierten Gesamtquecksilbers festgestellt werden. Dagegen zeigte sich ein Trend, dass mit geringeren Nahrungsportionen eine höhere Quecksilberakkumulation einherging.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit war die Quecksilberakkumulation in anderen Untersuchungen deutlich geringer. In der Kellerassel konnten nur 1 % bis 4 % des mit der Nahrung aufgenommenen Quecksilbers wiedergefunden werden. Hierbei wurde angenommen, dass der überwiegende Teil des Quecksilbers als elementares Quecksilber verloren ging (JEREB ET AL., 2002; NOLDE ET AL., 2005). Auch in der Garnele *Hyaella azteca* wurde nur eine Nettoakkumulation von 3 % bis 8 % durch die Fütterung mit Quecksilber angereicherter Nahrung festgestellt (DEFREITAS ET AL., 1981).

Die in dieser Arbeit ermittelten Quecksilberakkumulationen wurden auf Grundlage der ermittelten Quecksilbermengen im Termitengewebe und der über das Sägemehl zugeführten Quecksilbermengen berechnet. Da Termiten allerdings auch ihren eigenen Kot fressen (KÖNIG ET AL., 2002), kann hierdurch die Menge des aufgenommenen Quecksilbers höher sein als die Menge, die über das gefressene Sägemehl berechnet wurde. Dadurch führt eine Kotalaufnahme, insbesondere bei einer geringen Menge an gefressenem Sägemehl, zu einer scheinbar erhöhten Quecksilberakkumulation. Hiermit ließe sich auch die in dieser Arbeit beobachtete höhere Akkumulation bei einer geringeren Nahrungsaufnahme erklären.

#### 4.3.2.3 Methylquecksilber in Termiten

Neben der Gesamtquecksilberbelastung im Termitengewebe wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Auswirkungen einer anorganischen Quecksilberaufnahme mit der Nahrung auf die Methylquecksilberanreicherung im Gewebe untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Methylquecksilberkonzentrationen in Termiten ohne zusätzliches Quecksilber in der Nahrung 4,1 ng bis 5,6 ng Quecksilber pro g Termite

Trockengewicht, bzw. 1,3 ng Quecksilber pro g Termiten Lebendgewicht betragen. Im Vergleich hierzu waren die Methylquecksilberkonzentrationen in verschiedenen Organen der herbivoren Kellerassel um das 3 bis 6-fache höher als in den gefriergetrockneten Termiten (JEREB ET AL., 2003). Stellt man die Methylquecksilberkonzentration der beiden terrestrischen Invertebraten der von aquatischen Insekten auf entsprechender Trophieebene gegenüber, zeigt sich, dass die Methylquecksilberkonzentrationen der aquatischen Organismen im Durchschnitt deutlich höher sind (Tab. 35).

**Tab. 35: Methylquecksilberkonzentration und Methylquecksilberanteil in terrestrischen Invertebraten und aquatischen Insekten**

Organismus	MeHg- Konzentration [ng/g]		MeHg / Gesamt-Hg [%]	Referenz
	Lebend- gewicht	Trocken- gewicht		
<i>Mastotermes darwiniensis</i> <sup>1</sup> (Isoptera, Insecta)				
Sägemehlaufnahme	1,3	4,1	7	eigene Arbeit
Holzaufnahme	n.b.	4,5	n.b.	
	n.b.	5,6	n.b.	
<i>Porcellio scaber</i> (Isopoda, Crustacea)				
Drüsengewebe	7,3	n.b.	77	JEREB ET AL. (2003)
Intestinaltrakt	4,2	n.b.	14	
Insektenlarven <sup>2)</sup> aus Flüssen im westlichen Maryland (USA)				
Herbivore	2 - 30	n.b.	10 - 50	MASON ET AL. (2000)
Predatoren	>10 - 60	n.b.	60 - 100	
Aquatische Insekten und anderen Invertebraten <sup>3)</sup> von der Küste eines experimentellen Talsperre in nordwestlichen Ontario (Kanada)				
Sammler und Schredder	n.b.	18,9 – 136,0 (Ø 71,5)	n.b.	HALL ET AL. (1998)
Predatoren	n.b.	19,0 – 715,5 (Ø 189,0)	n.b.	

\*1) Vollständige Insekten

\*2) Vollständige Insekten aus den Ordnungen Diptera, Trichoptera, Ephemeroptera, Plecoptera, Plecoptera, Odonata, Megaloptera.

\*3) Vollständige Insekten aus den Ordnungen Ephemeroptera, Trichoptera, Odonata, Hemiptera, Coleoptera und Invertebraten aus der Ordnung Amphipoda.

n.b. = nicht bestimmt

Aus den ermittelten Gesamt- und Methylquecksilberkonzentrationen in den Termiten ohne zusätzliches anorganisches Quecksilber in der Nahrung wurde der Anteil des Methylquecksilbers zum Gesamtquecksilber bestimmt. Er betrug nur 7 %. Ähnlich geringe Methylquecksilberanteile konnten bei MASON ET AL. (2000) in einigen herbivoren Insektenlarven festgestellt werden. Im Gegensatz dazu waren die Methylquecksilberanteile in den räuberisch lebenden Insektenlarven mit 60 % bis 100 % deutlich höher. Dies entspricht den allgemeinen Beobachtungen, dass der Methylquecksilberanteil in den Organismen mit zunehmender Trophieebene ansteigt (MASON UND BENOIT, 2003). Daher lässt sich der geringe Methylquecksilberanteil der überwiegend holzfressenden Termiten auf ihre niedrige Trophieebene zurückführen.

Mit zunehmender anorganischer Quecksilberbelastung in der Nahrung von 25 µg bis 150 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl wurde ein deutlicher Anstieg der Methylquecksilberkonzentrationen in den Termiten von 15,9 ng auf 53,8 ng Quecksilber pro g Trockengewicht nachgewiesen. Eine weitere Erhöhung der Quecksilberkonzentration in der Nahrung bis zu 250 µg Quecksilber pro g Sägemehl führte zu keinem weiteren Anstieg der Methylquecksilberkonzentration im Termitengewebe. Da im Sägemehl kein Methylquecksilber nachgewiesen werden konnte, war eine signifikante Methylquecksilberaufnahme über die Nahrung ausgeschlossen. Dies zeigt, dass die Quecksilbermethylierung erst nach der Nahrungsaufnahme erfolgte. Damit konnte erstmalig eine *in vivo* Methylierung von Quecksilber in Insekten nachgewiesen werden.

Die Methylquecksilberanreicherung im Termitengewebe entsprach dem Verlauf einer typischen Substratsättigungskurve von enzymatischen Reaktionen, bei der die Methylierungskapazität bei einer Konzentration von 150 µg Quecksilber pro g Sägemehl erreicht wurde (Abb. 19). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Quecksilbermethylierung in den Termiten durch einen enzymatischen Prozess erfolgte, der für die Methylierung von Quecksilber von CHOI ET AL. (1994) im Zellextrakt von *Desulfovibrio desulfuricans* nachgewiesen wurde.

Der Anteil des akkumulierten Methylquecksilbers lag in einem Bereich von 0,15 % bis 0,38 %. Vergleichbar zu der Gesamtquecksilberakkumulation konnte auch hier keine Abhängigkeit zwischen dem Anteil des akkumulierten Methylquecksilbers und der

Quecksilberkonzentration im Sägemehl festgestellt werden. Da wahrscheinlich, wie in Abschnitt 4.3.2.2 beschrieben, die absolut aufgenommenen Mengen an anorganischem Quecksilber aufgrund von zusätzlich gefressenem Kot höher waren, war der tatsächliche Anteil des akkumulierten Methylquecksilbers geringer. Geht man davon aus, dass das Defizit der Sägemehlaufnahme von den Tieren durch eine höhere Kotaufnahme ausgeglichen wurde, kann der Anteil des akkumulierten Methylquecksilbers auf der Basis der Aufnahmemengen von unbelastetem Sägemehl berechnet werden. Dieser lag dann in einem Bereich von 0,06 % bis 0,17 %.

Da auch von RUDD ET AL. (1980) und ROWLAND ET AL. (1975a) eine Quecksilbermethylierung durch den Darminhalt von verschiedenen Fischen und Ratten nachgewiesen wurde, war die Quecksilbermethylierung wahrscheinlich auf die enzymatische Aktivität der Intestinalflora der Termiten zurückzuführen. Hierfür spricht auch der geringe Anteil des im Termitengewebe akkumulierten Methylquecksilbers. Dieser war vergleichbar mit einem Anteil von 0,05 % bis 0,25 % des im Darminhalt von Ratten nach einer Inkubationszeit von 16 bis 24 Stunden methylierten Quecksilbers (LUDWICKI, 1989). Daher liegt der Schluss nahe, dass das von den Termiten gefressene anorganische Quecksilber ebenfalls während seiner ca. 24-stündigen Darmpassage durch die Intestinalflora zu Methylquecksilber umgewandelt, anschließend über die Darmwand resorbiert und im Termitengewebe akkumuliert wurde.

Wie anhand der geringen Methylquecksilberbelastung in den Termiten ohne zusätzliches Quecksilber in der Nahrung zu erkennen war, spielt die Methylquecksilberanreicherung in den Termiten unter natürlichen Bedingungen mit einer geringen Quecksilberbelastung in der Umgebung eine untergeordnete Rolle. Allerdings nimmt die Methylquecksilberkonzentration in den Tieren bei einer dauerhaft erhöhten Quecksilberaufnahme durch eine *in vivo* Methylierung stetig zu.

### 4.3.3 Sulfat-reduzierende Bakterien im Intestinaltrakt

Sulfat-reduzierende Bakterien besitzen eine große Bedeutung bei der anaeroben Remineralisierung von organischen Substanzen. Obgleich ihre hauptsächlichen Lebensräume marine und limnische Sedimente sind, treten sie ebenfalls im Intestinaltrakt von Menschen und Tieren auf (HOWARD UND HUNGATE, 1976; GIBSON ET AL., 1988; TRINKERL ET AL., 1990; GEBHART ET AL., 1993). Auch im Darmsystem der Termiten *Mastotermes darwiniensis* lassen sich Sulfat-reduzierende Bakterien nachweisen (FRÖHLICH ET AL., 1999; DRÖGE ET AL. 2005), deren Aktivität in Bezug zur *in vivo* Sulfatreduktion und zur Quecksilbermethylierung untersucht wurde.

#### 4.3.3.1 Nachweis von Schwefelintermediaten

In Anwesenheit von Sulfid reagiert Quecksilber(II) mit der Bildung des schwerlöslichen Quecksilber(II)sulfids. Dieses führt zu einer verminderten Verfügbarkeit des anorganischen Quecksilbers für die Methylierung (COMPEAU UND BARTHA, 1985; BENOIT ET AL., 2001). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *in vivo* Reduktion von Sulfat über den Vergleich der Konzentrationen von Schwefelintermediaten im Intestinaltrakt der Termiten untersucht. Hierzu wurden die Tiere mit und ohne Sulfatzusatz in der Nahrung gefüttert und anschließend die Konzentration der Schwefelspezies elementarer Schwefel, Sulfat, Sulfit, Thiosulfat und Sulfid im Darmtrakt bestimmt. Dabei lag die Sulfatkonzentration im Darmtrakt der Termiten ohne zusätzliches Sulfat in der Nahrung in einem Bereich von 0,4 mmol/L bis 1,0 mmol/L. Diese Analysewerte zeigten eine hohe Übereinstimmung mit den Sulfatkonzentrationen von 0,3 mmol/L bis 0,7 mmol/L, die im Intestinalsystem von verschiedenen Termiten nachgewiesen wurden (KUHNIGK ET AL., 1996). Als reduzierte Schwefelspezies konnte nur Sulfid detektiert werden. Die Konzentration lag bei maximal 12,5 µmol/L. Aufgrund der Anwesenheit von Sulfid im Intestinaltrakt von Termiten lässt sich eine verminderte Quecksilbermethylierung durch eine Bildung des schwerlöslichen Quecksilber(II)sulfids nicht ausschließen.

Durch eine zusätzliche Sulfataufnahme mit der Nahrung stieg die Sulfatkonzentration bis zu 23,9 mmol/L an. Gleichzeitig nahmen auch die Konzentrationen der reduzierten Schwefelspezies zu. Dabei stieg die Sulfidkonzentration im Vergleich zu den Termiten ohne zusätzliches Sulfat in der Nahrung um mehr als das 10-fache an. Au-

ßerdem konnten auch Thiosulfat und in einer der drei Proben elementarer Schwefel nachgewiesen werden. Aufgrund der Konzentrationszunahme an reduzierten Sulfat-spezies im Intestinaltrakt der Termiten, muss eine *in vivo* Reduktion des zusätzlich mit der Nahrung aufgenommenen Sulfats erfolgt sein.

Die Konzentrationen der ermittelten Schwefelspezies zeigten keine Abhängigkeit von der Fütterungsdauer. Daher sind die Unterschiede in den Schwefelkonzentrationen möglicherweise auf unterschiedliche Mengen an aufgenommener Nahrung zurückzuführen. Eine unterschiedliche Nahrungsaufnahme in parallelen Versuchsgruppen wurde bereits bei der Fütterung von anorganischem Quecksilber beobachtet.

Die bisher durchgeführten *in vitro* Versuche zum Nachweis einer Sulfatreduzierung zeigten, dass Sulfat-reduzierende Bakterien für diese Reduktion verantwortlich sind. Auch für eine Anreicherungskultur von Sulfat-reduzierenden Bakterien aus dem Darmtrakt der Termiten *Mastotermes darwiniensis* und für den aus dieser Termitenart isolierten Sulfat-reduzierendem Bakterium *Desulfovibrio intestinalis* (FRÖHLICH ET AL., 1999) wurde eine *in vitro* Sulfatreduktion nachgewiesen. Bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Bakterien wurden durch die Anreicherungskultur 4,9 nmol Sulfat pro Stunde und mL und durch die Reinkultur 0,2 nmol bis 0,7 nmol Sulfat pro Stunde und mL reduziert (DRÖGE ET AL., 2005). Daher liegt der Schluss nahe, dass die *in vivo* Reduktion von Sulfat im Intestinaltrakt ebenfalls durch Sulfat-reduzierende Bakterien erfolgte, die mit einem Titer von  $1 \times 10^7$  Bakterien pro mL Darminhalt im Intestinaltrakt der Termiten *Mastotermes darwiniensis* auftraten (DRÖGE ET AL., 2005).

#### 4.3.3.2 Quecksilbermethylierung durch eine Reinkultur

Da die Sulfat-reduzierenden Bakterien bei der Quecksilbermethylierung eine hervorragende Rolle einnehmen (COMPEAU UND BARTHA, 1985; PAK UND BARTHA, 1998), wurde im Rahmen dieser Arbeit der bisher einzige von FRÖHLICH ET AL. (1999) aus dem Termitendarm von *Mastotermes darwiniensis* isolierte Sulfatreduzierer *Desulfovibrio intestinalis* auf seine Fähigkeit zur Methylquecksilberbildung untersucht. Hierzu wurde das Bakterium mit 1,0 µg anorganischem Quecksilber in verschiedenen für Sulfat-reduzierende Bakterien geeigneten Kulturmedien über einen Zeitraum von 3 d, 5 d und 8 d inkubiert. Hierbei stieg die Anzahl der Bakterien nach einer Inkubations-

zeit von 5 d auf einen Titer von  $2,1 \times 10^8$  Bakterien pro ml Kulturmedium an. Anschließend wurde die Methylquecksilberkonzentration in der Bakteriensuspension bestimmt. Hierbei wurde gezeigt, dass in allen Ansätzen ca. 0,05 ng Methylquecksilber pro g Bakteriensuspension gebildet wurde, die allerdings aufgrund der geringen Konzentration durch das Standardadditionsverfahren nicht genau quantifiziert werden konnten. Damit betrug der Anteil des zu Methylquecksilber umgesetzten Quecksilbers nur ca. 0,005 %.

Im Vergleich zu anderen Reinkulturen von Sulfat-reduzierenden Bakterien wurde durch *Desulfovibrio intestinalis* nur wenig Methylquecksilber gebildet. So konnten PAK UND BARTHA (1998) in einer Reinkultur des aus dem Sediment isolierten SRB *Desulfovibrio desulfuricans* eine deutlich höhere Methylquecksilberbildung nachweisen. Nach einer Inkubationszeit von 5 d mit 1 µg anorganischem Quecksilber pro g Bakteriensuspension waren ca. 2 % des eingesetzten anorganischen Quecksilbers zu Methylquecksilber umgewandelt.

Obwohl durch *Desulfovibrio intestinalis* nur eine geringe Menge an anorganischem Quecksilber methyliert wurde, konnte gezeigt werden, dass eine Methylquecksilberbildung durch Bakterien aus dem Intestinaltrakt erfolgte. Auch in vorausgegangenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass einige Darmbakterien die Fähigkeit besitzen, anorganisches Quecksilber zu methylieren. So wiesen ROWLAND ET AL. (1975b) an verschiedenen Mikroorganismen aus dem menschlichen Darm eine Quecksilbermethylierung nach (siehe Tab. 36), die mit 0,008 % bis 0,1 % ebenfalls gering waren.

**Tab. 36: Methylquecksilberbildende Mikroorganismen aus dem menschlichen Intestinaltrakt (aus ROWLAND ET AL., 1975b)**

Mikroorganismus	Anzahl getesteter Stämme	Anzahl methylierender Stämme	Gebildetes Methylquecksilber [ng/g]	Methylierungsrate [%]
<i>Streptococcus</i>	6	4	2,1 - 5,8	0,046 - 0,116
<i>Staphylococcus</i>	10	6	0,5 - 5,0	0,01 - 0,1
<i>Escherichia coli</i>	5	3	0,9 - 3,0	0,018 - 0,06
Hefen	9	4	0,7 - 1,7	0,014 - 0,034
<i>Lactobacillus</i>	9	1	0,5	0,01
<i>Bacteroides</i>	10	3	0,4 - 0,6	0,008 - 0,012
<i>Bifidobacterium</i>				

Aufgrund der geringen Methylquecksilberbildungsrate im menschlichen Darm, geht für den Menschen von einer *in vivo* Methylierung keine Gefährdung aus (BARREGÅRD ET AL., 1994). Allerdings steigt mit abnehmender Größe der Organismen und der damit verbundenen Zunahme der spezifischen Metabolismusrate die Gefahr durch die Methylquecksilberakkumulation im Gewebe. Dies lässt sich zum einen auf die höhere Nahrungsaufnahme pro kg Körpergewicht und der bei identischer Nahrung damit verbundenen höheren Menge an aufgenommenem anorganischem Quecksilber zurückführen. Zum anderen führt eine geringere Körpergröße auch zu einer schnelleren Anreicherung des Methylquecksilbers in den Organismen. Damit besitzt die *in vivo* Methylquecksilberbildung insbesondere für kleine Organismen, wie beispielsweise Insekten, eine höhere Bedeutung für die Anreicherung von Methylquecksilber im Körper und stellt damit eine potenzielle Gefährdung dieser Organismen dar.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine mikrobielle Quecksilbermethylierung in Insekten anhand der australischen Termiten *Mastotermes darwiniensis* sowie im Faulschlamm des Klärwerks Mainz-Mombach nachgewiesen. Diese Untersuchungen waren von besonderem Interesse, da sie weiteren Aufschluss zur Methylquecksilberbildung außerhalb von aquatischen Systemen gaben.

Zum Nachweis der Methylquecksilberbildung wurde den Probenmaterialien zunächst Quecksilber(II)chlorid zugeführt und nach einem definierten Zeitraum die Methylquecksilberkonzentration bestimmt. Die Bestimmung der Methylquecksilberkonzentration erfolgte mit einem online gekoppelten Purge&Trap-Gaschromatograph-Atomfluoreszenzdetektor (GC-AFD). Dieses elementspezifische und nachweisstarke Analysesystem wurde durch den Arbeitskreis Heumann, Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Universität Mainz, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit zur Methylquecksilberbestimmung verwandten Probenmaterialien setzten eine anspruchsvolle Analyseverfahren voraus, da sie zum einen geringe Methylquecksilberkonzentrationen sowie komplexe Probenmatrizes besaßen. Zusätzlich enthielten die Probenmaterialien zum Teil erhebliche Mengen an anorganischem Quecksilber, die ohne Abtrennung vom Probenmaterial eine Schädigung des Atomfluoreszenzdetektors verursachen können. Des Weiteren kann in Anwesenheit von anorganischem Quecksilber bei verschiedenen Aufbereitungsmethoden artifizielles Methylquecksilber gebildet werden. Dies führt insbesondere bei einem geringen Anteil von Methylquecksilber zu anorganischem Quecksilber zu einer systematischen Abweichung im Analyseergebnis. Aus diesem Grund musste zur Methylquecksilberbestimmung in den Probenmaterialien zunächst eine geeignete Probenaufbereitungs- und Quantifizierungsmethode ausgearbeitet werden.

Aufgrund der hohen Mengen an hinzugefügtem anorganischem Quecksilber wurde in dieser Arbeit eine saure Phasenextraktion mit Kupfersulfat und schwefelsaurer Kaliumbromidlösung durchgeführt. Diese Methode bietet im Vergleich zu anderen Probenaufbereitungsmethoden den Vorteil, dass das anorganische Quecksilber aus den

Probenmaterialien abgetrennt wird. Zusätzlich steht diese Methode nicht im Verdacht artifizielles Methylquecksilber zu bilden. Diese Extraktionsmethode wurde mit einer *in situ* Derivatisierung zum Methylquecksilbernachweis mittels Purge&Trap GC-AFD kombiniert, wodurch auf weitere Aufreinigungsschritte der Probelösung verzichtet werden konnte.

Die Quantifizierung der Methylquecksilberkonzentration in den Probenmaterialien mit komplexer Matrix erfolgte mittels Standardadditionsverfahren. Dieses Verfahren bot den Vorteil, dass die unterschiedlichen Matrizes der Proben berücksichtigt wurden. Zusätzlich wurde Ethylquecksilberchlorid als interner Standard eingesetzt. Hierdurch konnten eventuelle Einflüsse der Probenaufbereitung und der Detektorempfindlichkeit auf die ermittelte Methylquecksilbersignalintensitäten korrigiert werden. Die Richtigkeit der Methode wurde am zertifizierten Referenzmaterial CRM 463, mit und ohne zusätzliches anorganisches Quecksilber, sowie an Bakterienkulturen mit definierten Mengen an zugesetztem Methylquecksilberstandard nachgewiesen.

Anhand der Untersuchung der Methylquecksilberbildung im Faulschlamm des Klärwerks Mainz-Mombach konnte eine hohe Methylierungskapazität im Faulschlamm durch Sulfat-reduzierende Bakterien nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Methylquecksilberbildung zu Beginn der Inkubation mit Quecksilber(II)chlorid rasch anstieg. Nach 46 h waren bereits 2,0 % des eingesetzten anorganischen Quecksilbers zu Methylquecksilber umgesetzt. Im weiteren Verlauf nahm die Methylquecksilbermenge im Faulschlamm nur noch geringfügig zu. Nach 164 h war das Maximum mit 2,6 % an umgewandeltem Quecksilber erreicht. Aufgrund von Hemmstoffversuchen konnten gezeigt werden, dass die Sulfat-reduzierenden Bakterien mit mehr als 90 % an der Methylquecksilberbildung beteiligt waren und somit die hauptverantwortliche Bakteriengruppe für die Methylquecksilberbildung im Faulschlamm stellten.

Der Nachweis einer *in vivo* Quecksilbermethylierung in Insekten erfolgte an der Termitenart *Mastotermes darwiniensis*. Hierzu wurden die Tiere über einen Zeitraum von 14 d mit Sägemehl, das unterschiedliche Konzentrationen an anorganischem Quecksilber enthielt (0 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg und 250 µg Quecksilber pro g Sägemehl), gefüttert. Anschließend wurden die Methylquecksilberkonzentrationen in den Termiten in Abhängigkeit von der anorganischen Quecksilber-

konzentration in der Nahrung untersucht. Ohne zusätzliches Quecksilber in der Nahrung lag die Methylquecksilberkonzentration in einem Bereich von 4,1 ng bis 5,6 ng Quecksilber pro g Termiten Trockengewicht.

Mit zunehmender Quecksilberbelastung in der Nahrung von 25 µg bis 150 µg anorganischem Quecksilber pro g Sägemehl stiegen die Methylquecksilberkonzentrationen von 15,9 ng auf 53,8 ng Quecksilber pro g Trockengewicht. Durch eine weitere Erhöhung der Quecksilberkonzentration im Sägemehl nahm die Methylquecksilberkonzentration in den Termiten nicht weiter zu. Damit entsprach die Methylquecksilberanreicherung im Termitengewebe dem typischen Verlauf einer Substratsättigungskurve von enzymatischen Reaktionen, bei der die Methylierungskapazität bei einer Konzentration von 150 µg Quecksilber pro g Sägemehl erreicht wurde.

Neben einer Methylquecksilberanreicherung im Termitengewebe wurde eine Methylierungsaktivität von *Desulfovibrio intestinalis*, ein aus dem Darmtrakt der Termiten *Mastotermes darwiniensis* isoliertes Sulfat-reduzierendes Bakterium, festgestellt. Dies zeigt, dass eine Quecksilbermethylierung durch Darmbakterien stattfindet und das gebildete Methylquecksilber aus dem Darmtrakt in das Gewebe resorbiert wird.

Aufgrund der nachgewiesenen *in vivo* Methylquecksilberbildung in Insekten sollten in zukünftigen Arbeiten die Methylquecksilberbildung in weiteren Invertebraten untersucht werden. Hierbei wäre es wegen des hohen Zeitbedarfs für die Methylquecksilberbestimmung mittels Standardadditionsverfahren von Vorteil, eine Quantifizierung durch eine speziesspezifische massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse vorzunehmen. Zu diesem Zweck muss ein online gekoppeltes Purge&Trap-Gaschromatographie-Massenspektrometer-System eingesetzt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abeel, S.M., Vickers, A.K., Decker, D. (1994) Trends in purge and trap. J. Chromatogr. Sci. 32: 328-338.
- Adam, K. Jönck, P., Gattner, H., Zirngiebl, E. (1980) Quecksilber In: Foerst, W. (Hrsg.) Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie. 4. Auflage, VCH-Verlag Weinheim Bd. 19, 643-671.
- Alli, A., Jaffe, R. Jones, R. (1994) Analysis of organomercury compounds in sediments by capillary GC with atomic fluorescence detection. J. High Resolut. Chromatogr. 17: 745-748.
- Al-Tikriti, K., Al-Mufti, A.W. (1976) An outbreak of organomercury poisoning among Iraqi farmers. Bull. World Health Organ. 53: 15-20.
- Baeyens, W., Leermakers, M., Molina, R., Holsbeek, L., Joiris, C.R. (1999) Investigation of headspace and solvent extraction methods for the determination of dimethyl- and monomethylmercury in environmental matrices. Chemosphere 39: 1107-1117.
- Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O. (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems, FEMS Microbiol. Rev. 27: 335-384.
- Barregård, L., Horvat, M., Schütz, A. (1994) No indication of in vivo methylation of inorganic mercury in chloralkali workers. Environ. Res. 67: 160-167.
- Benoit, J.M., Gilmour, C.C., Mason, R.P. (2001) The influence of sulfide on solid-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). Environ. Sci. Technol. 35: 127-132.
- Bentley, R., Chasteen, T.G. (2002) Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 250-271.
- Berman, M., Bartha, R. (1986) Levels of chemical versus biological methylation of mercury in sediments. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36: 401-404.
- Bloom, N.S. (1989) Determination of picogram levels of methylmercury by aqueous phase ethylation, followed by cryogenic gas chromatography with cold vapour atomic fluorescence detection. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 1131-1140.

- Bloom, N.S., Colman, J.A., Barber, L. (1997) Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius J. Anal. Chem.* 358: 371-377.
- Brooks Rand Ltd (1990) CV AFS Mercury Analyser, Operational Manual, Seattle.
- Bryant, M.P., Leon Campbell, L., Reddy, C.A., M. Crabill, R. (1977) Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H<sub>2</sub>-utilizing methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1162-1169.
- Castro, H.F., Williams, N.H., Ogram, A. (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 1-9.
- Choi, S.C., Bartha, R. (1994) Environmental factors affecting mercury methylation in estuarine sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 805-812.
- Choi, S.C., Chase Jr, T., Bartha, R. (1994) Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1342-1346.
- Clarkson, T.W., Magos, L., Myers, G.J. (2003) The toxicology of mercury- current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.* 349: 1731-1737.
- Compeau, G.C., Bartha R. (1985) Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 498-502.
- DeFreitas A.S.W., Lloyd K.M., Qadri S.U. (1981) Mercury bioaccumulation in the detritus-feeding benthic invertebrate, *Hyalella azteca* (Saussure). *Proc. N. S. Inst. Sci.* 31: 217-236.
- DeSimone, R.E., Penley, M.W., Charbonneau, L., Smith, S.G., Wood, J.M., Hill, H.A.O., Pratt, J.M., Ridsdale, S., Williams, R.J.P. (1973) The kinetics and mechanism of cobalamin-dependent methyl and ethyl transfer to mercuric ion. *Biochim. Biophys. Acta* 304: 851-863.
- Devereux, R., Winfrey, M.R., Winfrey, J., Stahl, D.A. (1996) Depth profile of sulfate-reducing bacterial ribosomal RNA and mercury methylation in an estuarine sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 23-31.
- Dixon, R.B., Dean, W.J. (1951) Simplified statistics for small numbers of observations. *Anal. Chem.* 23: 636-638.
- Dreisich, F.A., Munson (1983) Purge-and-trap analysis using fused silica capillary column GC/MS. *J. Chromatogr. Sci.* 21: 111-118.

Dröge S., Limper, U., Emtiazi, F., Schönig, I., Pavlus, N., Drzyzga, O., Fischer, U., König, H. (2005) *In vitro* and *in vivo* sulfate-reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose-chafer *Pachnoda marginata*. J. Gen. Appl. Microbiol. 51: 57-64.

DSMZ 11275

<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm011275.html>.

DSMZ Medium 63

<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/media/medium000063.html>.

DSMZ Medium 141

<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/media/medium000141.html>.

DSMZ Medium 320

<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/media/medium000320.html>.

Durth, A., Schaum, C., Meda, A., Wagner, M., Hartmann, K.H., Jardin, N., Kopp, J., Otte-Witte, R. (2005): Ergebnisse der DWA-Klärschlammhebung 2003. DWA

Ebdon, L., Foulkes, M.E., Le Roux, S., Muñoz-Olivas, R. (2002): Cold vapour atomic fluorescence spectrometry and gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence spectrometry for routine determination of total and organometallic mercury in food samples. Analyst 127: 1108-1114.

Ebinghaus, R., Hintelmann, H., Wilken, R.D. (1994) Mercury-cycling in surface waters and in the atmosphere – species analysis for the investigation of transformation and transport properties of mercury. Fresenius J. Anal. Chem. 350: 21-29.

Ekstrom, E.B., Morel, F.M.M., Benoit, J.M. (2003) Mercury methylation independent of the acetyl-coenzym A pathway in sulfate-reducing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5414-5422.

Emerson, A.E. (1965) A review of the *Mastotermitidae* (Isoptera) including a new fossil genus from Brazil. Amer. Mus. Novitates 2236: 1-46.

Entwässerungsbetrieb der Stadt Mainz (Hrsg) (1999) Vom Abwasser zum Rheinwasser.

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

- Fischer, P., Gustin, M.S. (2002) Influence of natural sources on mercury in water, sediment and aquatic biota in seven tributary streams of the east fork of the upper Carson River, California. *Water Air Soil Poll.* 133: 283-295.
- Fitzgerald, W.F. (1995) Is mercury increasing in the atmosphere? The need for an atmospheric mercury network (AMNET). *Water Air Soil Poll.* 80: 245-254.
- Fitzgerald, W.F., Clarkson, T.W. (1991) Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environ. Health Pers.* 96: 159-166.
- Fitzgerald, W.F., Engstrom, D.R., Lamborg, C.H., Tseng, C.-M., Balcom, P.H., Hammerschmidt, C.R. (2005) Modern and historic atmospheric mercury fluxes in northern Alaska: global sources and arctic depletion. *Environ. Sci. Technol.* 39: 557-568.
- Fritsche, W. (Hrsg.) (2002) *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Fröhlich, J., Sass, H., Babenzien, H.-D., Kuhnigk, T., Varma, A., Saxena, S., Nalepa, C., Pfeiffer, P., König, H. (1999) Isolation of *Desulfovibrio intestinalis* sp. nov. from the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis*. *Can. J. Microbiol.* 45: 145-152.
- Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G. (1992) *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. VCH Verlag, Weinheim.
- García Fernández, R., Montes Bayón, M., Gracia Alonso, J.I., Sanz-Medel, A. (2000) Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* 35: 639-646.
- Gebhart, C.J., Barn, S.M., McOrist, S., Lin, G.-F., Lawons H.K. (1993) Ileal symbiont *intracellularis*, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 533-538.
- Geldmacher-von Mallinckrodt, M. (1984) Akute Toxizität von Metallen beim Menschen. In: Merian, E. (Hrsg.) *Metalle in der Umwelt*, Verlag Chemie Weinheim, 223-228.
- Gibson, G.R., Cummings, J.H., MacFarlane, G.T. (1988) Competition for hydrogen between sulfate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 241-247.

- Greenwood, M.R., von Burg, R. (1984) Quecksilber. In: Merian, E. (Hrsg.) Metalle in der Umwelt, Verlag Chemie Weinheim, 511-539.
- Grzimek, B. (Hrsg.) (1980) Tierleben- Enzyklopädie des Tierreichs, Kindler, Zürich.
- Hagman, A., Jacobsson, S. (1988) Trapping efficiency of capillary cold traps. J. Chromatogr. 448: 117-126.
- Hall, B.D., Rosenberg, D.M., Wiens, A.P. (1998) Methyl mercury in aquatic insects from an experimental reservoir. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55: 2036-2047.
- Hamasaki, T., Nagase, H., Yoshioka, Y., Sato, T. (1995) Formation, distribution and ecotoxicity of methylmetals of tin, mercury and arsenic in the environment. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 25: 45-91.
- Harms, U., Bunke, M. (2002) Ausarbeitung und Validierung einer Methode zur Bestimmung von Monomethylquecksilber und anorganischem Quecksilber in Fischgeweben und Zooplankton. Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit Forschungsbericht FKZ 200 22 230, 1-83.
- Harper, A., Löffler, G., Petrides, P., Weiss, L. (Hrsg.) (1975) Physiologische Chemie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Hintelmann, H. (1999) Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. Chemosphere 39: 1093-1105.
- Hintelmann, H., Falter, R., Ilgen, G., Evans, R.D. (1997) Determination of artifactual formation of monomethylmercury ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) in environmental samples using stable  $\text{Hg}^{2+}$  isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition. Fresenius J. Anal. Chem. 358: 363-370.
- Horvat, M., Bloom, N.S., Liang, L. (1993a) Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples Part I. Sediments. Anal. Chim. Acta 281: 135-152.
- Horvat, M., Bloom, N.S., Liang, L. (1993b) Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples Part II. Water. Anal. Chim. Acta 282: 153-168.

- Horvat, M., May, K., Stoeppler, M., Byne, A.R. (1988) Comparative studies of methylmercury determination in biological and environmental samples. *Appl. Organomet. Chem.* 2: 515-525.
- Howard, B.H., Hungate, R.E. (1976) *Desulfovibrio* of the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 598-602.
- Jensen, S., Jernelöv, A. (1969) Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature* 223: 753-754.
- Jereb, V., Horvat, M., Drobne, D., Pihlar, B. (2003) Transformations of mercury in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea). *Sci. Total. Environ.* 304: 269-284.
- Jørgensen, B.B. (1982) Mineralization of organic matter in the sea-bed - the role of sulphate reduction. *Nature* 296: 643-645.
- Kaester, A. (1973) *Lehrbuch der speziellen Zoologie. Band I,3 Teil B*, Fischer, Stuttgart.
- King, J.K., Kostka, J.E., Frischer, M.E., Saunders, F.M. (2000) Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2430-2437.
- Köhler, W., Schachtel, G., Voleske, P. (2002) *Biostatistik. Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler*. 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Kolb, B. (1999) *Gaschromatographie in Bildern. Eine Einführung*. Wiley-VCH, Weinheim.
- König, H., Fröhlich, J., Berchtold, M., Wenzel, M. (2002) Diversity and microhabitats of the hindgut flora of termites. *Recent Res. Devel. Microbiology* 6: 125-156.
- Krishna, K. (1970) Taxonomy, phylogeny and distribution of termites. In: Krishna, K., Weesner, F.H. (Hrsg) *Biologie of Termites Vol. 2*, Academic Press, New York, 127-152.
- Kuhnigk, T., Branke, J., Krekeler, D., Cypionka, H., König, H. (1996) A feasible role of sulfate-reducing bacteria in the termite gut. *System. Appl. Microbiol.* 19: 139-149.
- Küllmer, K. (2002) Weiterentwicklung einer GC/AFD-Methode zur Bestimmung von Methylquecksilberverbindungen in der Umwelt und deren Anwendung in anthro-

- pogen beeinflussten und unbeeinflussten Regionen. Dissertation Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Küster, F.W., Thiel, A. (1985) Rechentafeln für die chemische Analytik. De Gruyter, Berlin, New York.
- Lawrence, A.L., Mason, R.P. (2001) Factors controlling the bioaccumulation of mercury and methylmercury by estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. Environ. Poll. 111: 217-231.
- Li, L., Fröhlich, J., Pfeiffer, P., König, H. (2003) Termite gut symbiotic archaezoa are becoming living metabolic fossils. Eukaryot. Cell 2: 1091-1098.
- Liang, L., Horvat, M., Cernichiari, E., Gelein, B., Balogh, S. (1996) Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation-gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry. Talanta 43: 1883-1888.
- Lindqvist, O., Johansson, K., Bringmark, L., Timm, B., Aastrup, M., Andersson, A., Hovsenius, G., Håkanson, L., Iverfeldt, Å., Meili, M. (1991) Mercury in the Swedish environment- Recent research on causes, consequences and corrective methods. Water Air Soil Poll. Special Issue 55. xi-261.
- Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R., Amann, R. (1998) Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2691-2696.
- Llobet-Brossa, E., Rabus, R., Böttcher, M.E., Könneke, M., Finke, N., Schramm, A., Meyer, R.L., Grötzschel, S., Rossello-Mora, R., Amann, R. (2002) Community structure and activity of sulfate-reducing bacteria in an intertidal surface sediment: a multi-method approach. Aquat. Microb. Ecol. 29: 211-226.
- Logar, M., Horvat, M., Akagi, H., Pihlar, B. (2002) Simultaneous determination of inorganic mercury and methyl mercury compounds in natural waters. Anal. Bioanal. Chem. 374: 1015-1021.
- Longbottom, J.E., Dressman, R.C., Lichtenberg, J.J. (1973) Gas chromatographic determination of methyl mercury in fish, sediment, and water. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56: 1297-1303.

- Lordi, D.T., Lue-Hing, C., Whitebloom, S.W. (1978) Municipal wastewater plant problems with mercury and mercury effluent standards. 33<sup>rd</sup> Proc. Ind. Waste Conf. 33: 88-97.
- Lorey, P., Driscoll, C.T. (1999) Historical trends of mercury deposition in Adirondack Lakes. Environ. Sci. Technol. 33: 718-722.
- Ludwicki, J.K. (1989) Studies on the role of gastrointestinal tract contents in the methylation of inorganic mercury compounds. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 42: 283-288.
- Maddison, D.R. (2002) Dictyoptera. Version 01 January 2002 (temporary). <http://tolweb.org/Dictyoptera/8253/2002.01.01> in The Tree of life Web Project, <http://tolweb.org>.
- Madigan, M.T., Martinko, M., Parker, J. (Hrsg.) (2003) Brock Mikrobiologie. 10. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Marigomez, J.A., Angulo, E., Saez, V. (1986) Feeding and growth responses to copper, zinc, mercury and lead in the terrestrial gastropod *Arion ater* (Linne). J. Moll. Stud. 52: 68-78.
- Mart, L. (1979) Prevention of contamination and other accuracy risks in voltammetric trace metal analysis of natural waters, part I: Preparatory steps, filtration and storage of water samples. Fresenius J. Anal. Chem. 269: 350-357.
- Mason, R.P., Sullivan, K.A. (1997) Mercury in Lake Michigan. Environ. Sci. Technol. 31: 942-947.
- Mason, R.P., Benoit, J.M. (2003) Organomercury Compounds in the Environment. In: Craig, P.J. (Hrsg.) Organometallic Compounds in the Environment. John Wiley and Sons Ltd. 57-99.
- Mason, R.P., Rolffhus, K.R., Fitzgerald, W.F. (1995a) Methylated and elemental mercury in the surface and deep ocean waters of the North Atlantic. Water Air Soil Poll. 80: 665-677.
- Mason, R.P., Morel, F.M.M., Hemond, H.F. (1995b) The role of microorganisms in elemental mercury formation in natural waters. Water Air Soil Poll. 80: 775-787.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M. (1995c) Bioaccumulation of mercury and methylmercury. Water Air Soil Poll. 80: 915-921.

- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M. (1996) Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in coastal diatom. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1835-1845.
- Mason, R.P., Laporte, J.-M., Andres, S. (2000) Factors controlling the bioaccumulation of mercury, methylmercury, arsenic, selenium, and cadmium by freshwater invertebrates and fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 283-297.
- McCurry, J. (2006) Japan remembers Minamata. *Lancet* 367: 99-100.
- Morita, M., Tanaka, H., Shimomura, S. (1995) Atomic fluorescence spectrometry of mercury: principles and developments. *Spectrochim. Acta* 50B: 69-84.
- Mudrack, K., Kunst, S. (1994) *Biologie der Abwasserreinigung*. 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Nakahara, T., Tanaka, T., Musha, S. (1978) Flameless atomic fluorescence spectrometry of mercury by dispersive and nondispersive systems in combination with cold vapour technique. *Bull. Chem. Soc. Jap.* 51: 2020-2924.
- Nolde, N., Drobne, D., Horvat, M., Jereb, V. (2005) Reduction and methylation of mercury in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea) and its environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 1697-1704.
- of Cremona, G.; Steele, R. (1929) Practical chemistry in the twelfth century. *Rasis de aluminibus et salibus. Isis* 12: 10-46.
- Pak, K.-R., Bartha, R. (1998) Mercury methylation and demethylation in anoxic lake sediments and by strictly anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1013-1017.
- Petersen, G., Iverfeldt, Å., Munthe, J. (1995) Atmospheric mercury species over central and northern Europe. Model Calculations and comparison with observations from the Nordic air and precipitation network for 1987 and 1988. *Atmos. Environ.* 29: 47-67.
- Pierrone, N., Keeler, G.J., Nriagu, J.O. (1996) Regional differences in worldwide emissions of mercury to the atmosphere. *Atmos. Environ.* 30: 2981-2987.
- Pongratz, R., Heumann, K.G. (1998) Production of methylated mercury and lead by polar macroalgae – A significant natural source for atmospheric heavy metals in clear room compartments. *Chemosphere* 36: 1935-1946.
- Postgate, J.R. (1984) *The sulphate-reducing bacteria*. Cambridge University Press.

- Purdy, K.J., Embley, T.M., Nedwell, D.B. (2002) The distribution and activity of sulphate reducing bacteria in estuarine and coastal marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 181-187.
- Purdy, K.J., Nedwell, D.B., Embley, T.M., Takii, S. (2001) Use of 16s rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 165-168.
- Qian, J., Skyllberg, U., Tu, Q., Bleam, W.F. (2000) Efficiency of solvent extraction methods for the determination of methyl mercury in forest soils. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367: 467-473.
- Radek, R. (1999) Flagellates, bacteria, and fungi associated with termites: diversity and function in nutrition – a review. *Ecotropica* 5: 183-196.
- Ramamoorthy, S., Kushner, D.J. (1975): Binding of mercuric and other heavy metals ions by microbial growth media. *Microbiol. Ecol.* 2: 162-176.
- Rapsomanikis, S. (1994) Derivatization by ethylation with sodium tetraethylborate for the speciation of metals and organometallics in environmental samples. A review. *Analyst* 119: 1429-1439.
- Rethmeier, J., Rabenstein, A., Langer, M., Fischer, U. (1997) Detection of traces of oxidized and reduced sulphur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. *J. Chromatogr. A* 760: 295-302.
- Riisgård, H.U., Famme, P. (1986) Accumulation of inorganic and organic mercury in shrimp, *Crangon crangon*. *Mar. Pollut. Bull.* 17: 255-257.
- Robinson, J.B., Tuovinen, O.H. (1984) Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiol. Rev.* 48: 95-124.
- Römpp, H. (1995) *Römpp Chemie Lexikon*. Falbe, J., Regitz, M. (Hrsg.) Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Bd. 5, 3737-3744.
- Rowland, I.R., Davies, M.J., Grasso, P. (1975a) The methylation of mercury by the gastro-intestinal contents of the rat. *Biochem. Soc. Trans.* 3: 502-504.
- Rowland, I.R., Grasso, P., Davies, M.J. (1975b) The methylation of mercury chloride by human intestinal bacteria. *Experientia* 31: 1064-1065.

- Rudd, J.W.M., Furutani, A., Turner, M.A. (1980) Mercury methylation by fish intestinal contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 777-782.
- Sass, H., Berchtold, M., Branke, J., König, H., Cypionka, H., Babenzien, H.D. (1998) Psychrotolerant sulfate-reducing bacteria from an oxic freshwater sediment, description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov.. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 212-219.
- Schedlbauer, O.F. (1998) Methylierte Schwermetallverbindungen im Atlantischen Ozean und der marinen Atmosphäre, Untersuchungen zum globalen biogeochemischen Schwermetallkreislauf. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Scheffknecht, C. (2002) Umweltanalytik. Einfluss der Klärschlamm-Düngung auf den Schadstoffgehalt von Energiewald-Bäumen. Untersuchungen im Rahmen eines Forschungsprojektes der Kläranlage Dornbirn. Kurzbericht. Umweltinstitut des Landes Vorarlberg.
- Schuster, P.F., Krabbenhoft, D.P., Naftz, D.L., Cecil, L.D., Olson, M.L., Dewild, J.F., Susong, D.D., Green, J.R., Abbott, M.L. (2002) Atmospheric mercury deposition during the last 270 years: a glacial ice core record of natural and anthropogenic sources. *Environ. Sci. Technol.* 36: 2303-2310.
- Simpson, R.B. (1961) Association constants of methylmercury with sulfhydryl and other bases. *J. Am. Chem. Soc.* 83: 4711-4717.
- Skylberg, U., Xia, K., Bloom, P.R., Nater, E.A., Bleam, W.F. (2000) Binding of mercury(II) to reduced sulfur in soil organic matter along upland peat soil transects. *J. Environ. Qual.* 29: 855-865.
- Slemr, F., Langer, E. (1992) Increase in global atmospheric concentrations of mercury inferred from measurements over the Atlantic Ocean. *Nature* 355: 434-437.
- Spry, D.J., Wiener, J.G. (1991) Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: A critical review. *Environ. Pollut.* 71: 243-304.
- Streit, B. (1991) Lexikon der Ökotoxikologie. VCH-Verlag, Weinheim, 659-663.
- Stresemann, E. (1989) Exkursionsfauna 2.1 Wirbellose Insekten. Volk und Wissen Volkseigener Verlag, Berlin, 97-98.

- Tanzer, D., Heumann, K.G. (1992) Gas chromatographic trace-level determination of volatile organic sulfides and selenides and of methyl iodide in Atlantic surface water. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 48: 17-31.
- Tremblay, A., Cloutier, L., Lucotte, M. (1998) Total and methylmercury fluxes via emerging insects in recently flooded hydroelectric reservoirs and a natural lake. Sci. Total Environ. 219: 209-221.
- Trinkerl, M., Breunig, A., Schauder, R., König, H. (1990) *Desulfovibrio termitides* sp. nov., a carbohydrate-degrading sulfate-reducing bacterium from the hindgut of a termite. System. Appl. Microbiol. 13: 372-377.
- Tschöpel, P., Tölg, G. (1982) Comments on the accuracy on analytical results in ng- and pg-trace analysis of the elements. J. Trace Microprobe Tech. 1: 1-77.
- Tseng, C.M., De Diego, A., Martin, F.M., Amouroux, D., Donard, O.F.X. (1997) Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion. J. Anal. At. Spectrom. 12: 743-750.
- Watras, C.J., Bloom, N.S. (1992) Mercury and methylmercury in individual zooplankton: implications for bioaccumulation. Limnol. Oceanogr. 37: 1313-1318.
- Watras, C.J., Back, R.C., Halvorsen, S., Hudson, R.J.M., Morrison, K.A., Wentz, S.P. (1998) Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. Sci. Tot. Environ. 219: 183-208.
- Weber, J.H. (1993) Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment. Chemosphere 26: 2063-2077.
- Westöö, G. (1966) Determination of methylmercury compounds in foodstuffs I. Methylmercury compounds in fish, identification and determination. Acta Chem. Scand. 20: 2131-2127.
- Westöö, G. (1967) Determination of methylmercury compounds in foodstuffs II. Determination of methylmercury in fish, egg, meat and liver. Acta Chem. Scand. 21: 1790-1800.
- Westöö, G. (1968) Determination of methylmercury salts in various kinds of biological materials. Acta Chem. Scand. 22: 2277-2280.

- Widdel, F., Bak, F. (1992) Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria. In: Balows, A., Trüper, H.P., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. *The Prokaryotes*. 2 ed. Springer Verlag. New York. 3, 3352-3378.
- Wieringa, E.B.A., Overmann, J., Cypionka, H. (2000) Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environ. Microbiol.* 2: 417-427.
- Wood, J.M. (1984) Alkylation of metals and the activity of metal alkyls: *Toxicol. Environ. Chem* 7: 229-240.
- Wood, J.M., Wang, H.K. (1983) Microbial resistance to heavy metals. *Environ. Sci. Technol.* 17: 582-590.
- Yang, L., Colombini, V., Maxwell, P., Mester, Z., Sturgeon, R.E. (2003) Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1011: 135-142.
- Zimmermann, P.R., Greenberg, J.P, Wandiga, S.O, Crutzen, P.J. (1982) Termites: a potentially large source of atmospheric methane, carbon dioxide, and molecular hydrogen. *Science* 218: 563-565.