

Mastergradoppgave i
kjemi

Polina S. Vatland

**Preparativ gel-
fraksjonering
av DNOM og
studier av Hg-DNOM
egenskaper**

Omfang: 60 studiepoeng

KJEMISK INSTITUTT
Det matematisk-
naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO 09/2006



Forord

Denne mastergradoppgaven i miljøkjemi er utført ved Kjemisk institutt, Universitetet i Oslo.

Jeg vil først og fremst takke mine veiledere, professor Rolf D. Vogt, professor Egil T. Gjessing og professor Jon Petter Omtvedt, for stor hjelp gjennom disse to årene jeg har holdt på med oppgaven. En stor takk rettes også til mine medstudenter på miljøkjemi for hyggelig samvær og god hjelp, en spesiell takk til Marianne Wiker for Hg-analyse av mine isolater.

Jeg vil også takke Hege Lynne og Hanne Røberg-Larsen ved Uorganisk kjemi for utlån av utstyr og opplæring i bruk av TOC, samt Eivind A. Olsen for produksjon av ^{197}Hg ved syklotronen på Fysisk institutt.

Til slutt vil jeg også rette en stor takk til mannen min, Ole Christian Vatland, for god støtte og hjelp med nyttige datakunnskaper.

Oslo, 21. september 2006

Polina S. Vatland

Innholdsfortegnelse

Forord	ii
Innholdsfortegnelse	iii
Ordliste og forkortelser	v
Sammendrag	vi
English summary	viii
DEL 1 INNLEDNING	1
1.1 Bakgrunn	2
1.2 Problemstilling i Norge	5
1.3 Helseeffekter av kvikksølv	7
1.4 Formålet med oppgaven	7
DEL 2 TEORETISK DEL	9
2.1 NOM.....	10
2.2 Kvikksølv	12
2.3 Forholdet mellom DNOM og Hg	15
2.4 Preparativ gel-kromatografi	16
2.5 UV- absorpsjonspektroskopi	17
2.6 Radiotracer og gamma-spektroskopi.....	19
DEL 3 MATERIALER OG METODER	21
3.1 Materialer	22
3.2 Fraksjonering av DNOM.....	24
3.3 UV-absorpsjonspektroskopi og løst organisk karbon analyse (DOC).....	27
3.4 Produksjon av radioaktivt Hg.....	28
3.5 Fordampning og utvasking av Hg.....	30
3.6 Tilsetting av Hg ²⁺ til DNOM-løsninger: Betingelser, tilsetningsmåter og konsentrasjoner.....	31
3.7 Bestemmelse av ¹⁹⁷ Hg ²⁺ -konsentrasjon	34

DEL 4 RESULTATER OG DISKUSJONER	39
4.1 Sephadex egenskaper	40
4.2 DNOM-fraksjonering.....	44
4.3 Hg-eksperiment.....	53
DEL 5 KONKLUSJON OG FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	61
5.1 Konklusjon.....	62
5.2 Forslag til videre arbeid	63
Referanser	64
APPENDIKS.....	73
Appendiks A Reproduserbarhet	74
Appendiks B Data for kurvene i del 4.1 Sephadex´ egenskaper	83
Appendiks C Data for kurvene i del 4.2 DNOM-fraksjonering	85
Appendiks D Data for kurvene i del 4.3 Hg-eksperiment.....	93
Appendiks E Produksjon av ¹⁹⁷ Hg på syklotronen.....	97
Appendiks F Abstrakt til International Humic Substances Society (IHSS) XIII	98

Ordliste og forkortelser

Bioakkumulering	- bioakkumulering refererer til oppsamling av et stoff i en organisme over tid, fra både biotiske (andre organismer dvs. gjennom føde) og abiotiske kilder (jord, luft og vann)
Hg	- betegner kvikksølv generelt
¹⁹⁷Hg	- betegner Hg-isotopen med massetall 197
NOM	- naturlig organisk materiale
DNOM	- løst naturlig organisk materiale
DOC	- løst organisk karbon
TOC	- total organisk karbon
NPOC-metoden	- denne metoden brukes for å analysere DOC
sUVa	- spesifikk UV-absorbans, dvs. $A_{254nm;1\text{ cm}} \text{ DOC}^{-1}$
Type 1- vann	- dobbelt ionebyttet og karbonfritt vann (Mili-Q vann)
R0	- omvendt osmose
Reproduserbarhet	- standardavvik mellom flere replikater av samme prøve, kjørt på forskjellige dager, over kort tid
Desintegrasjon	- henfall, betyr at atomkjerner går i stykker
Halveringstid	- halveringstid er den tiden det tar før halvparten av kjernene har henfalt og aktiviteten er redusert til det halve
Target	- er betegnelsen for det som bestråles med en partikkelstråle for å produsere radioaktivitet
Tracer	- et sporstoff
Radiotracer	- et sporstoff som inneholder en radioaktiv isotop (radioisotop).
R^o	- antall tellinger, en måte å angi radioaktiv aktivitet på
Dystrofe innsjøer	- er assosiert med myrområder og av den grunn har de høy konsentrasjon av DNOM, 20 til 50 mg C L ⁻¹
Eutrofe innsjøer	- næringsrike innsjøer; høyeste trofiske nivå og inneholder kun noen få algetyper, men i høye konsentrasjoner
Oligotrofe innsjøer	- næringsfattige innsjøer; DOC ligger mellom 1 og 3 mg C L ⁻¹

Sammendrag

I dette arbeidet skulle interaksjoner mellom den vannløselige delen av naturlig organisk materiale (DNOM) og kvikksølv (Hg^{2+}) studeres. Det ble brukt gel-kromatografi (Sephadex™-gel G-25 medium) for å fraksjonere fire forskjellige DNOM-prøver. Prøvematerialet med DNOM var allerede isolert fra vann ved hjelp av omvendt osmose. Planen for denne oppgaven var å tilsette radioaktivt kvikksølv som sporstoff til vann med DNOM og fraksjonere det organiske stoffet ved hjelp av gel-kromatografi og deretter analysere mengden Hg i de ulike fraksjonene. Hensikten med fraksjoneringen var å undersøke hvilken molekylfraksjon som i særlig grad var assosiert til Hg. Hg-analysene ble utført ved hjelp av gamma-spektroskopi. Destillert vann ble valgt som mobilfase i den kromatografiske fraksjoneringen.

Fraksjoneringsresultatene viste betydelige forskjeller mellom de fire ulike DNOM-isolatene. Basert på UV-absorpsjon ved $\lambda = 254 \text{ nm}$ og DOC-analyser, ga to av prøvene i hovedsak kun en topp, mens de to andre resulterte i tre godt separerte topper distinkte topper. Et slikt resultat var forventet ut fra hva vi allerede visste om prøvenes ulike egenskaper. Dermed ble det konkludert med at Sephadex™-gel G-25 medium, med vann som mobilfase, kan benyttes til preparativ fraksjonering og til å karakterisere DNOM med ulike egenskaper. Dette kan være et nyttig verktøy for økologene som ønsker å studere biologisk opptak av kvikksølv fra vann.

Det ble forøvrig funnet at separasjonsegenskapene til Sephadex™-gel G-25 medium endrer seg over tid hvis gel-materialet ikke konserveres. Årsaken til dette antas å være at mikroorganismer endrer gelens struktur.

^{197}Hg ($T_{1/2} = 64,1$ timer) ble valgt som radioaktiv Hg-isotop. ^{197}Hg ble produsert på syklotronen ved Fysisk institutt, Universitet i Oslo, ved å bestråle en gullfolie med høyenergetiske protoner. $^{197}\text{Hg}^0$ ble så ekstrahert ut av gullfolien og omdannet til $^{197}\text{Hg}^{2+}$ før den ble tilsatt DNOM-prøvene. Etersom $^{197}\text{Hg}^{2+}$ kun finnes i ultralav ($2 \cdot 10^{-12} \text{ M}$) konsentrasjon, ble inaktivt kvikksølv, i form av HgCl_2 , også tilsatt til løsningene med DNOM og radioaktivt kvikksølv. Dette ble gjort for å øke konsentrasjon av kvikksølv, slik at

forholdet mellom Hg og DNOM ble tilsvarende det man finner, globalt sett, i vannmiljøet.

Fraksjonering av både blandinger av DNOM og Hg samt blindprøver uten DNOM viste at kvikksølv alltid kommer ut av kolonnen der den høymolekylære fraksjonen av DNOM kommer. Dette var ikke forventet siden uorganisk Hg var formodet å være i en lavmolekylær form. Forsøket med kvikksølv, slik det ble utført i dette arbeidet, ga derfor ikke tilfredsstillende resultater. Årsaken til dette kan være at det aktive kvikksølv ikke foreligger i en slik form at det komplekseres med DNOM. Dette kan skyldes dannelse av kolloidalpartikler av Hg^{2+} i løsningene. I tillegg viser "blankeksperimenter" at uorganisk Hg adsorberes nesten fullstendig til kolonnen.

English summary

The aim of this study is to examine the interaction between the water-soluble part of dissolved natural organic material (DNOM), and mercury (Hg^{2+}). Gel-chromatography (Sephadex™-gel G-25 medium) was used to fractionate four different DNOM samples. Samples with DNOM were already isolated from the water with the aid of inverted osmosis. Radioactive mercury as a trace element was added to the water containing DNOM. The compounds were fractionated using gel-chromatography and the quantities of Hg in the different fractions were analyzed. The purpose with the fractionation was to investigate what fraction of the molecules that Hg in particular was associated with. The Hg analyses were done with gamma spectroscopy. Distilled water was used as mobile phase in the chromatographic fractionation.

The fractionation results showed considerably differences between the four DNOM isolates. UV adsorption at $\lambda = 254 \text{ nm}$ and DOC analysis in two of the samples showed only one peak while the other two showed three distinct peaks. This result was as expected according to what we already knew about the sample characteristics. From this it was concluded that the Sephadex™ gel G-25 medium, with water used as mobile phase, can be used to conduct preparative fractionations and characterize DNOM with different characteristics. This could be a useful tool for the ecologists that want to study the biological adoption of mercury from the water.

In addition it was found that the characteristics of Sephadex™ gel G-25 medium changes over time if the gel-material is not conserved. The reason for this is assumed to be that micro organisms change the structure of the gel.

^{197}Hg ($T_{1/2} = 64.1 \text{ hours}$) was chosen as the radioactive Hg isotope. ^{197}Hg was produced at the cyclotron at the institute of Physics, at the University of Oslo, by irradiating a foil of gold with high energetic protons. It was also used a series of procedures to get the ^{197}Hg out of the foil and convert it to $^{197}\text{Hg}^{2+}$ before adding it to the DNOM samples. Since $^{197}\text{Hg}^{2+}$ only exists in ultra low ($2 \cdot 10^{-12} \text{ M}$) concentrations, inactive mercury, in the form of HgCl_2 , was also added to the DNOM solutions with radioactive mercury. This was done to increase the

concentration of mercury so that the condition between Hg and DNOM corresponded to the levels that are assumed to exist globally in the natural water environment.

The fractionation of the solutions of DNOM and mercury as well as a “blank determination” showed that the mercury always is eluded out of the column where the high molecularly fraction of DNOM comes. This was not expected since inorganic Hg in the blank sample was assumed to be present in a low molecularly form. The experiment with mercury, the way it was conducted in this work, did therefore not give satisfactory results. The reason for this could be that the mercury does not exist in a form that it interacts with DNOM. This could be due to the fact that colloidal particles of Hg^{2+} - in the solvents are created. In addition the “blank determination” shows that inorganic Hg is almost completely adsorbed to the column.

DEL 1
INNLEDNING

1.1 Bakgrunn

Naturlig Organisk Materiale (NOM) er en heterogen polymerisert blanding av organiske forbindelser som stammer fra nedbrytning av biotisk materiale. NOM finnes i løst, kolloidal og partikulær form og er til stede i alt naturlig vann i konsentrasjoner fra $< 0,5$ til 40 mg C L^{-1} (Thurman, 1985). Det organiske materialet er en viktig energikilde for mikroorganismer og deltar dessuten i den globale karbonsyklusen.

Løst NOM (DNOM) er definert som en NOM-fraksjon i løsning som passerer gjennom en $0,45 \mu\text{m}$ membran filter (Perdue & Ritchie, 2004). Løst organisk karbon (dissolved organic carbon; DOC), angitt i mg karbon pr. L (mg C L^{-1}), er ofte benyttet som et kvantitativt mål for DNOM (Perdue & Ritchie, 2004). Selv om DOC parameteren ikke avspeiler egenskapene av DNOM, er den allikevel viktig i DNOM forskning. DOC brukes mye i overvåkingen og monitoning av naturlige variasjoner i vann (bl.a. råvannkilder for drikkevann). Ved studier av egenskapene til DNOM benyttes DOC mye for å tolke kvalitativt resultater fra andre kvantitative analysemetoder.

Interessen for DNOM har økt betydelig de siste 30 årene, bl.a. fordi man nå har innsett at DNOM spiller en rolle i alle hydroøkologiske prosesser. I tilknytning til drikkevann kan NOM i vann ha negativ effekt på vannkvaliteten av tre hovedgrunner:

- mobilisering av uorganiske og organiske mikroforurensninger
- dannelsen av potensielt karsinogene og mutagene klororganiske biprodukter ved klordesinfisering (Becher et al., 1992)
- estetiske årsaker siden DNOM i vann gir vann gulbrun farge

I Norge, Sverige og Finland er det i løpet av de siste 10 årene isolert DNOM fra en rekke forskjellige vannkilder (NOM-Typing* og NOMiNiC** -prosjektene). Deler av disse isolatene er distribuert til en rekke forskningsinstitusjoner både i Europa og Nord-Amerika der et stort antall forskjellige analytiske metoder er benyttet for å definere og beskrive de kollektive og kjemiske egenskapene til DNOM.

* NOM-Typing-prosjekt – Typing of Natural Organic Matter in water (Gjessing et al., 1999).

** NOMiNiC-prosjekt - The Natural Organic Matter in the Nordic countries (Vogt et al., 2001).

Selv om det foreligger et stort datamateriale (ca. 200 biofysiokjemiske parametere) som beskriver forskjeller og likheter mellom disse prøvene, står det fortsatt igjen en del spørsmål om på hvilken måte det organiske stoffet vekselvirker med omgivelsene. For eksempel er forholdet mellom DNOM og tungmetaller lite undersøkt.

Det er nå akseptert i forskningsmiljøer at DNOM opptrer som et "transportmiddel" for bl.a. tungmetaller, inkludert Hg, fra jordsmonnet til vann. Hg blir i vann omdannet til metylkvikksølv, som er blant de mest toksiske former av Hg (Isidorov, 1999). Opptak av Hg i fisk er i hovedsak basert på denne kvikksølvformen (CH_3Hg^+ , mer enn 95%) (Ravichandran, 2004). Metyleringen av Hg^{2+} til CH_3Hg^+ er derfor en viktig faktor for bioakkumuleringen av Hg i fisk. Produksjon av CH_3Hg^+ i det akvatiske miljø er ikke bare en enkelt funksjon av den totale Hg-konsentrasjonen i vann (Ravichandran, 2004). Dannelse av CH_3Hg^+ påvirkes av en rekke miljøfaktorer så som: bakterieaktivitet, pH, temperatur, red-oks-potensialet samt forekomst av uorganiske og organiske ligander. DNOM kan både fremme og hemme dannelse av CH_3Hg^+ (Ravichandran, 2004), men det er mest sannsynlig at den totalt sett virker fremmende på metylering av kvikksølv (Isidorov, 1999). Det er imidlertid fortsatt uklart på hvilken måte, hvilke mekanismer og hvilke forutsetninger som virker inn på disse prosessene. Flere rapporter viser at humusrike skogsinnsjøer med lav pH er spesielt utsatt for høye kvikksølvkonsentrasjoner, som igjen gir et tilsvarende høyt kvikksølvinnhold hos fisk (Meili et al., 1991; NIVA, 2003).

Det er i økende grad en erkjennelse i de forskningsmiljøene som studerer DNOM, at man i stedet for å studere de kollektive bulk-egenskapene til DNOM, er nødt til å splitte DNOM i flere fraksjoner for å kunne studere de enkelte fraksjonene av DNOM. Til dette trengs det en preparativ fraksjoneringsmetode som endrer egenskapene til materialet i minst mulig grad og som introduserer minst mulig nye kjemikalier til prøven.

Vanlig anvendte metoder for fraksjonering av DNOM, slik som væskechromatografi (for eksempel high pressure liquid chromatography, HPLC) og kapillær elektroforese (capillary electrophoresis, CE), anvender uorganiske saltløsninger som mobilfaser. Slike saltløsninger er kjent for å endre nettopp de DNOM-egenskapene som vi ønsker å studere (Baalousha et al., 2006). Dessuten er de mengdene som anvendes for små (opptil 1 mL)

til at videre studier av de ulike fraksjonene er mulig.

En annen brukt metode til fraksjonering og karakterisering av DNOM er såkalt "XAD-8-metoden" i tandem med andre kolonnematerialer (Leenheer, 1981). XAD-8 splitter DNOM materialet etter dets hydrofile/hydrofobe egenskaper. Problemene med denne metoden er mange. Den er operasjonelt definert, noe som ofte gjør den lite reproducerbar. Prøven må i tillegg surgjøres til pH 2 før fraksjonering noe som endrer egenskapene til DNOM.

Gel-kromatografi med Sephadex er en mulig metode for preparativ fraksjonering av DNOM (Shaw et al., 1994; O'Driscoll, 1998; De Nobili & Chen, 1999). Det organiske materialet lar seg fraksjonere i flere fraksjoner med denne gel-typen (Jackson et al., 1980; Shaw et al., 1994; Peuravuori et al., 2001). For å unngå å tilføre prøvematerialet "nye" stoffer ble det tenkt å bruke destillert vann som mobilfase i stedet for saltløsninger i dette arbeidet. Tidligere studier (Aho & Lehto, 1984) viste god separasjon av DNOM (3 godt separerte topper) på Sephadex G-100 med bruk av destillert vann som mobilfase.

En viktig grunn til å fraksjonere i "makroskala" og å anvende vann som mobilfase, er at dette derved kan være et nyttig verktøy for økologene som ønsker å studere biotilgjengelighet av Hg, assosiert med DNOM, i hver fraksjon.

Gel-kromatografiske metoder med Sephadex som kolonnemateriale er benyttet til å studere interaksjoner mellom organiske forbindelser og ulike metaller (Jackson et al., 1980; De Haan et al., 1990; O'Driscoll, 1998; O'Driscoll & Evans, 2000; Purenovic et al., 2000). Radiotracere har også tidligere vært brukt i slike undersøkelser (Jackson et al., 1980; Sedlacek et al., 1987; De Haan et al., 1990). Bruk av slike tracere gjør det mulig å fraksjonere og spesiere ved naturlige konsentrasjonsnivåer uten å få problemer med deteksjonsgrenser. Naganuma et al. (1985) oppnådde en fullstendig separasjon av metylkvikksølv fra uorganisk kvikksølv på en Sephadex-kolonne ved bruk av en kvikksølv radiotracer. Sedlacek et al. (1987) rapporterte tilsvarende om en god atskillelse av organisk og uorganisk former av jern ved hjelp av Sephadex. En $^{59}\text{Fe}^{3+}$ -tracer ble benyttet i dette arbeid.

Det er verdt å nevne at ultrafiltrering også ser ut til å være en brukbar metode for NOM-fraksjoneringen (Crum et al., 1996; Sheils et al., 2001; Itabashi et al., 2003; Kawahigashi et al., 2005). Denne metoden gir mulighet til å fraksjonere i "makroskala" og er forholdsvis lett å bruke. Et problem er imidlertid at ved bruk av ultrafiltrering kan NOM absorberes irreversibelt på filterne (Li & Chen, 2004; Kennedy et al., 2005).

Til tross for en omfattende bruk av Sephadex-materialet til fraksjonering av DNOM, er resultater av slike fraksjoneringer variable. Dette skyldes dels naturlig variasjon i selve DNOM, men også pga. ulike metodevariabler. Det er framfor alt bruken av forskjellige typer elueringsløsninger som gir denne variasjonen. Det bør kunne være en målsetning å lage en standardisert fraksjoneringsmetode. Vårt utgangspunkt for dette er at gel-filtrering med destillert vann vil være en metode som er lettest å standardisere.

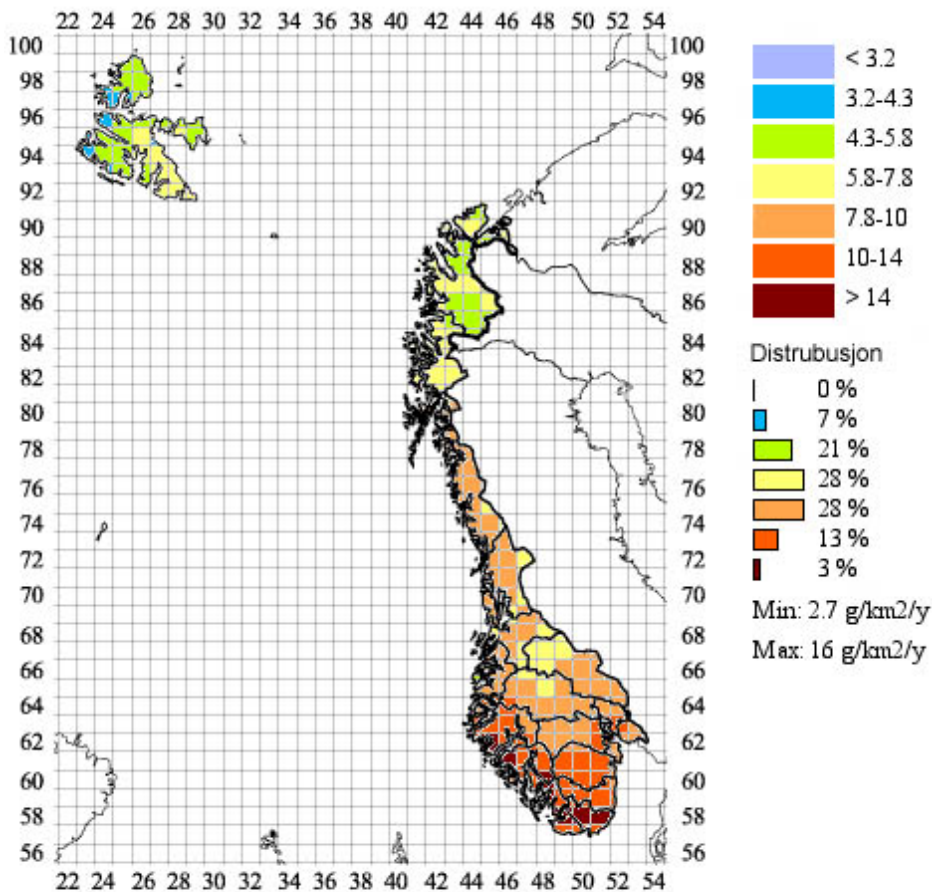
1.2 Problemstilling i Norge

Klimaet i Norge med kalde vintre og relativt fuktige somrer er gunstig for dannelse av DNOM (minusgrader om vinteren hindrer fullstendig dekomponering av DNOM). Sammensetningen av jordsmonnet i Norge med generelt lavt mineralinnhold (og dermed liten adsorpsjon av negativt ladde humusmolekyler), samt høy fuktighet som hindrer dannelse av høymolekylære humusmolekyler, legger forholdene til rette for å danne relativt små og mobile humusmolekyler (Gjessing, 1981). I tillegg fører mye nedbør til utvasking av DNOM fra jorda. Dette gjør at ferskvann i Norge er rikt på DNOM, 5 - 30 mg C L⁻¹ i forhold til verdensgjennomsnittet, 7 mg C L⁻¹ (Perdue & Gjessing, 1990, som sitert i Vogt et al., 2001).

Kvikksølvforurensning i Norge skjer hovedsakelig gjennom avsetning av langtransportert luftforurensning (Steinnes et al., 2003). Den regionale fordelingen av forhøyede Hg konsentrasjoner tilsvarer derfor det en tidligere har sett for sur nedbør belastning. dvs. de høyeste konsentrasjonene i Sør- og Sør-Østlandet (figur 1.1).

Disse faktorene er ansvarlige for at kvikksølvforurensning i fisk representerer et betydelig problem i Norge. Mattilsynet har derfor innført kostholdsrestriksjoner for konsum av stor ferskvannsfisk slik som gjedde og ørret (Mattilsynet, 2004).

Transport av Hg fra jord til det akvatiske miljø skjer hovedsakelig ved transport med løst organisk materiale. Det er derfor en sammenheng mellom konsentrasjonen av løst organisk materiale på vannet og Hg konsentrasjoner i mange innsjøer. Derfor er det en bekymring knyttet til at konsentrasjonen av DNOM har økt betydelig i overflatevann som tidligere mottok mye sur nedbør, bl.a. i sørøst Norge (Skjelkvåle et al., 2000, som sitert i Vogt et al., 2001).



Figur 1.1: Hg avsettelse i Norge i g/km²/år i 2002 (MSC-E, 2006)

1.3 Helseeffekter av kvikksølv

Kvikksølv er først og fremst et miljøproblem for folkehelsen med opptak hovedsakelig gjennom maten. Fisk er en viktig del av dietten vår og pga. biomagnifisering av Hg kan dette føre til høye konsentrasjoner, spesielt i fet fisk.

For høye nivåer av Hg i kroppen kan føre til skader på nervesystemet, nyrer, hjerne (transporteres lett gjennom blodhjernebarrieren) og gi fosterskader. Skader i hjernen kan føre til tap av koordinasjon, forandring av oppførsel, redusert aktivitet, synsforstyrrelser og problemer med læring og hukommelse. Ved lave konsentrasjoner er skadene mer diffuse men kan for eksempel medføre konsentrasjonsvansker, problemer med språket, med læring og påvirke finmotorikken. I svært høye konsentrasjoner kan kvikksølv også være dødelig. I 1953 ble flere tusen mennesker utsatt for svært høye doser av kvikksølv gjennom fisk, i byen Minamata i Japan (Isidorov, 1999). Noe som førte til død og store handikap. Og i 1973 ble omlag seks og et halvt tusen mennesker i Irak innlagt på sykehus med kvikksølvforgiftning (Isidorov, 1999). Fem hundre av disse døde på grunn av dette. Grunnen var at såkorn som var bearbeidet med kvikksølvholdige fungicider ble brukt som menneskeføde.

1.4 Formålet med oppgaven

Hovedhensikten med oppgaven var å finne hvilke DNOM-fraksjoner som Hg^{2+} binder seg til. Det var forventet at Hg^{2+} ville ble gjenfunnet i minst én av de fraksjonene som ble eludert ut av Sephadex. For å studere bindingen av Hg^{2+} til DNOM var det nødvendig først å optimalisere og innarbeide en standard preparativ metode for molekylstørrelse-fraksjonering av DNOM basert på Sephadex.

Hensikten med å utføre en preparativ gel-fraksjonering er å oppnå store nok volumer av de ulike fraksjonene til at de kan karakteriseres ved supplerende analyser. Destillert vann ble valgt som mobilfase for å minimalisere påvirkningen på DNOM-materialet i forhold til det som saltløsninger gjør.

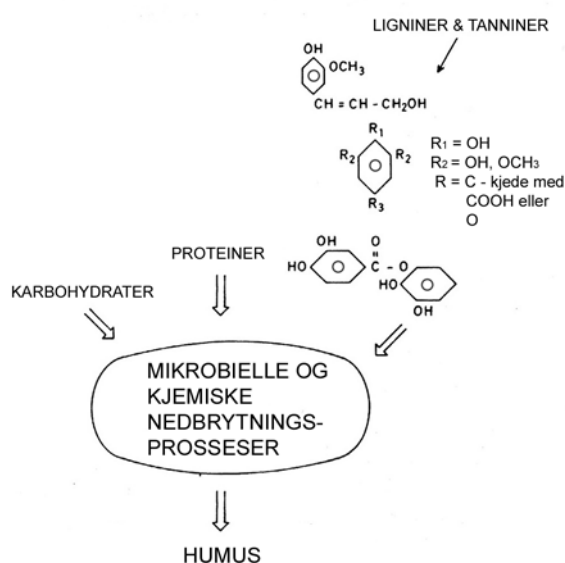
Radiokjemiske metoder ble valgt til å bestemme kvikksølvkonsentrasjonen i fraksjonene pga.:

- Lav deteksjonsgrense, slik at miljørelevante konsentrasjonsnivåer kunne studeres
- Kort analysetid (fraksjonene måles direkte med gammadetektoren uten opparbeiding)
- For å unngå tap av analytt under annen prøveoppbeidelse (Hg er kjent for å være spesielt vanskelig å analysere pga. tap ved adsorpsjon og fordampning av Hg⁰)

DEL 2
TEORETISK DEL

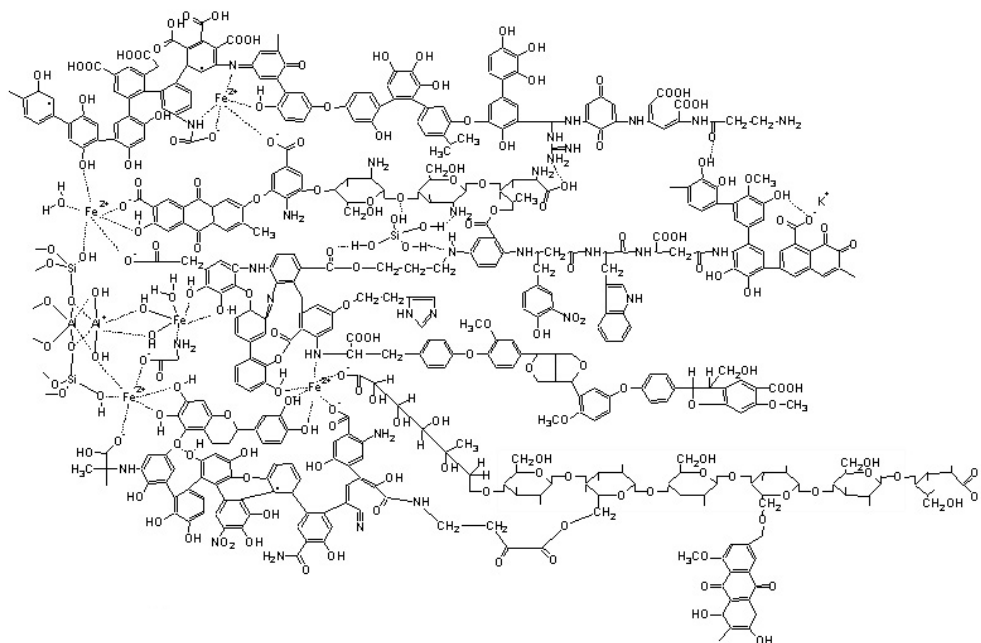
2.1 NOM

NOM er en samlebetegnelse på en rekke organiske forbindelser med en varierende molekylvekt. Utgangsmaterialet er hovedsakelig planterester, og som det framgår av figur 2.1 nedenfor, er karbohydrater, proteiner, ligniner og tanniner involvert. NOM består av nedbrytningsprodukter fra mikrobielle og kjemiske nedbrytningsprosesser og resultatet av en re-kondensasjon av disse til større molekyler. Materialet defineres derfor gjerne inn i to deler: en ikke-humusdel og en humusdel. Ikke-humusdelen av NOM er de organiske nedbrytningsforbindelsene som karbohydrater, proteiner, peptider, aminosyrer, fett og andre lavmolekylære organiske stoffer. Denne delen av NOM er ofte tilgjengelig for mikroorganismer og nedbrytes videre forholdsvis lett. Humusdelen utgjør den største delen av NOM og er en svært komplisert heterogen blanding av polymeriserte polyfunksjonelle makromolekyler. Disse makromolekylene regner man med har lang dannelsesetid og svært varierende struktur og størrelse, avhengig av syntesebetingelsene i jorden.



Figur 2.1: Humifiseringsprosess (humusdannelse) slik den antas å foregå i naturen. Humifiseringsprosessen er en funksjon av tid, temperatur, fuktighet og vegetasjon på dannelsesstedet. Lignin og tannin er biopolymerer som stammer fra planter og antas å være grunnlag for humus, pga. deres resistens mot nedbrytning.

Man kan ikke oppgi noen veldefinert kjemisk formel for humus siden NOM er en meget heterogen blanding av komplekse organiske forbindelser og siden sammensetningen varierer i rom og tid. Imidlertid kan man karakterisere materialet ut fra en del generelle særtrekk se figur 2.2. Det finnes fenol-, karboksylsyre-, amino-, alkohol- og sulfhydrylgrupper på et slikt «molekyl». NOM består av en relativt stabil kjerne av aromatiske og alifatiske bestanddeler bestående i hovedsak av karbon (C; 45-55%), oksygen (O; 30-45%), hydrogen (H; 4-6%) og nitrogen (N; 1-2%) (Essington, 2004).



Figur 2.2: Pseudostruktur av NOM (Essington, 2004).

Å angi molekylvekten til NOM er ikke enkelt. Imidlertid er den løselige delen av NOM mindre aromatisk, surere og har lavere molekylvekt enn den ikke-løselige delen (se bl.a. Thurman, 1985). Stadig flere mener at molekylvekten til DNOM ligger under 5.000 Da* (Perdue & Ritchie, 2004). Enkelte har den oppfatning at humusmolekyler foreligger som relativt store aggregater i vann (Baalousha et al., 2006). Noen forskere hevder at DNOM på grunn av sine surfaktantegenskaper lett danner aggregater i form av miceller (Langhals et al., 2000; Essington, 2004). Graden av micelldannelsen er en funksjon av konsentrasjonen av DNOM i vann, pH og saltinnhold. En rekke andre fysisk-kjemiske egenskaper til DNOM er også avhengige av disse parametrene (De Nobili et al., 1989,

* 1 Dalton er definert som 1/12 av massen til ^{12}C atomet.

med referanser; Baalousha et al., 2006). Hovedkilden til DNOM i ikke-eutrofe** vann kommer fra det terrestriske miljøet (s.k. alloktont materiale)(Thurman, 1985).

- **Rollen til DNOM**

DNOM er som nevnt ovenfor til stede i alle naturlige vannforekomster. Det organiske stoffet spiller en viktig rolle i den generelle vannkjemien på grunn av dets store anionladning, utpregede evne til å bufre pH og sterke metall-komplekseringskapasiteten (Thurman, 1985; Brown et al., 1999). I tillegg har DNOM høy sorbsjonskapasitet til hydrofobe organiske molekyler. DNOM spiller en spesielt viktig rolle i reguleringen av biotilgjengelighet og mobilitet av både organiske og uorganiske mikroforurensninger i det akvatiske miljøet (Gjessing & Gudmundson, 1982; Brown et al., 1999; Isidorov, 1999). Det organiske materialet deltar også i red-oks-prosesser (Ravichandran, 2004). Dessuten mener forskere at DNOM er en viktig energikilde for mikroorganismer i vann (Perdue & Ritchie, 2004).

2.2 Kvikksølv

Stoffet i dette kapittelet er i hovedsak hentet fra Global Mercury Assessment (UNEP, 2002) om ikke annet er angitt.

Kvikksølv (Hg) er et grunnstoff som opptrer i naturen:

- I grunntilstand som metall med smeltepunkt ved -38,9 °C
- Som en- og toverdige kationer i uorganiske salter
- I alle tre oksidasjonstrinn i organiske forbindelser

Den vanligste formen av Hg i miljøet er Hg^{2+} . Utslippene av kvikksølv til miljøet øker stadig. Når kvikksølv først er tilført naturen, vil den kontinuerlig bli mobilisert, avsatt og re-mobilisert inntil den blir bundet opp i kortere eller lengre perioder i innsjø- og havsedimenter. Det betyr at det kvikksølv som nå er i miljøet, vil forbli og sirkulere i

** Eutrofe innsjøer – høyeste trofiske nivå og inneholder kun noen få algetyper, men i høye konsentrasjoner (Thurmann, 1985).

miljøet og belaste det i lang tid framover.

Til tross for alle avtaler (LRTAP Convention, 1998; Helsinki Convention, 1998; OSPAR Convention, 2001) som er inngått om reduksjon av kvikksølvutslipp, vil utslippene av kvikksølv antagelig øke i årene som kommer. Dette skyldes bl.a. økningen i utslipp av Hg i Asia, som antakelig kommer til å bli hovedkilde for kvikksølv i miljøet.

- **Kilder til og former for kvikksølv i atmosfæren:**

Naturlige Hg kilder til luft er avgasser fra jordskorpen ved for eksempel vulkanutbrudd og re-emmisjon. Ved re-emmisjon blir tidligere avsatt Hg^{2+} omdannet til Hg^0 som igjen blir frigitt tilbake til atmosfæren. Det er vanskelig å anslå hvor mye kvikksølv som slippes ut globalt til atmosfæren. Ulike litteraturkilder opererer med forskjellige tall på dette, men man regner med at de antropogene utslipp er nesten det dobbelte av de naturlige utslipp. Ifølge tabell 2.1 er den viktigste antropogene Hg kilden til luft stasjonær forbrenning av fossilt brennstoff.

I atmosfæren forekommer kvikksølv hovedsakelig som elementært kvikksølv (Hg^0) i dampform. Denne formen har en oppholdstid i atmosfæren på opptil 3 år. Ettersom kvikksølv i grunntilstand har lang oppholdstid, kan kvikksølv bli transportert svært langt i atmosfæren før den blir avsatt. Derfor har kvikksølvutslipp globale konsekvenser (AMAP, 2002). Hg^0 i atmosfæren vil imidlertid etter hvert oksideres til Hg^{2+} (toverdig kvikksølv) som lett binder seg til partikler i luft. Dette fører til at det skjer en avsetning av Hg^{2+} allerede etter 1-2 uker (Isidorov, 1999).

Tabell 2.1: Evaluering av antropogene kvikksølvutslipp til atmosfæren, i tonn/år (UNEP, 2002).

Kontinent	Stasjonær forbrenning	Gruvedrift	Jern- og stålproduksjon	Sementproduksjon	Avfallsdeponering
Europa	186	15	10	26	12
Afrika	197	7,9	0,5	5,2	0
Asia	860	87	12	82	33
Nord-Amerika	105	25	4,6	13	66
Sør-Amerika	27	25	1,4	5,5	0
Australia og Oceania	100	4,4	0,3	0,8	0,1
Totalsum	1470	170	30	130	110

- **Kilder til og former for kvikksølv i jord:**

Jordsmonnet får hovedsaklig kvikksølv fra atmosfæren. I tillegg kan landbruksjord også bli forurenset direkte gjennom kvikksølvholdige pesticider som ble mye brukt i perioden fra 1940 til 1970. Akkumulering av kvikksølv i jordsmonnet skyldes i stor grad binding til humusmateriale i jord. Det betyr at kvikksølv-humus komplekset dominerer. Noe kvikksølv, i form av HgOHCl og $\text{Hg}(\text{OH})_2$, blir transportert vertikalt i profilet, gjennom det øverste humusrike laget og dypere ned i mineraljordprofilen der de binder seg til metalloksider (Halse, 2006).

- **Kilder til og former for kvikksølv i vann:**

En annen kilde for kvikksølvtilførsel til vann er utslipp fra industrien gjennom avløpsvann, direkte avsetning fra atmosfæren, samt avrenning fra det terrestriske miljø av tidligere atmosfærisk avsatt kvikksølv. DNOM er den viktigste transportmekanisme for Hg til overflatevann (se ovenfor og del 2.3). I vann kan kvikksølv forekomme som toverdige kvikksølv (Hg^{2+}) i form av f.eks., HgOH^+ , $\text{Hg}(\text{OH})_2$, $\text{Hg}(\text{OH})\text{Cl}$, HgCl_2 ; metylkvikksølv (CH_3Hg^+), dimetylkvikksølv ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) og assosiert med DNOM (se del 2.3). Dimetylkvikksølv dannes mye langsommere og er lang mindre løselig i vann enn metylkvikksølv. Det er derfor av liten betydning i ferskvann (Isidorov, 1999).

2.3 Forholdet mellom DNOM og Hg

Som nevnt ovenfor har DNOM en rekke svake syregrupper, noe som gir oligotrofe* og dystrofe** vann en sur karakter. Disse funksjonelle gruppene (fenol-, karboksylsyre-, amino-, alkohol- og sulfhydrylgrupper) fører også til at humusens egenskaper er sterkt pH-avhengige. Under naturlige forhold ($\text{pH} > 5$) har DNOM en netto negativ ladning og antagelig også en stor overflate. Dette gjør at DNOM lett binder til seg polyvalente kationer som $\text{Fe}^{2+/3+}$, Hg^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} osv. Schlüter (1997) studerte transporten av Hg^{2+} og CH_3Hg^+ gjennom en jern-humus podsol, og konkluderte med at utlekking av både Hg^{2+} og CH_3Hg^+ fra jordsmonnet til ferskvann skjer på grunn av kompleksdannelse med DNOM. Hydroksylkomplekser, slik som HgOH^+ , $\text{Hg}(\text{OH})_2$ og $\text{Hg}(\text{OH})\text{Cl}$, samt HgCl_2 er de viktigste former av Hg i vann uten DNOM. Er imidlertid DNOM til stede er disse uorganiske spesiene av mindre betydning (Isidorov, 1999; Ravichandran, 2004; Han & Gill, 2005) siden mer enn 80-90% av Hg er bundet til DNOM i humusvann (se bl.a. Han & Gill, 2005).

Ifølge hard og myk syre-og-base-prinsippet (HSAB concept) er spesielt kvikksølv og S^{2-} begge myke og danner derfor stabile kovalente bindinger med høy affinitet seg imellom (Essington, 2004). Av den grunn har metylkvikksølv og kvikksølv en spesielt sterk evne til å binde seg til reaktive SH-grupper, omtalt som sulfhydryl eller tiol-funksjonelle grupper. Disse funksjonelle gruppene finnes det en god del av i humus (Sheils et al., 2001; Amirbahman et al., 2002). Bare uorganiske ligander med sulfhydryl-grupper kan danne like sterke komplekser med metylkvikksølv og kvikksølv som DNOM, og på den måten konkurrere med DNOM (Hintelmann et al., 1997).

På grunn av de funksjonelle gruppernes svake syrekarakter vil kompleksdannelsen til DNOM påvirkes av pH i vann. Med økt pH øker humusens negative ladning og dermed også evnen til å kompleksbinde. For eksempel vil en økning av pH fra 4 til 6, nesten firedoble kompleksdannelsen (Isidorov, 1999). Økende pH i vann vil på den andre siden også øke hydrolyseringen. Under $\text{pH} = 4,5$ er det imidlertid ikke observert noen

* For oligotrofe innsjøer ligger DOC mellom 1 og 3 mg C L^{-1} (Thurman, 1985).

** Dystrofe innsjøer er assosiert med myrområder, og av den grunn har de høy konsentrasjon av DNOM, 20 til 50 mg C L^{-1} , (Thurman, 1985).

vekselvirkning med kvikksølv og DNOM (Wu et al., 2004). Grunnen til dette er sannsynligvis at alle syregruppene i dette materialet var protonisert. Wu og hans medarbeidere viste i 2004 at vekselvirkning mellom DNOM og Hg^{2+} også reduseres med økende konsentrasjoner av kloridioner i vann (Wu et al., 2004) på grunn av konkurranse om ligand plassen.

2.4 Preparativ gel-kromatografi

Gel-kromatografi (gel-filtrering) er en kromatografisk metode som separerer stoffer primært etter deres molekylstørrelse. Kolonnematerialet er svullede gelpartikler som man tenker seg har kjegleformede porer. Separeringsmekanismen fungerer ved at de minste molekyler vil trenge lengst inn i porene mens de store molekylene vil bli utelukket og derved elueres ut av kolonnen raskere enn de små. Jo mindre molekylene er, desto mer blir de altså retardert. Molekyler som ikke passerer inn i porene elueres ut ved det såkalte dødvolumet, V_0 . Molekyler som er så små at de kan penetrere helt inn i bunnen av de kjegleformede porene, føres ut ved det maksimale elueringsvolum, V_0+V_i . Mens molekyler med mellomliggende størrelser vil elueres ut ved et volum som ligger mellom V_0 og V_0+V_i (Greibrokk et al., 1994). I vårt arbeid valgte vi allikevel ikke å bruke disse parametrene. Siden det ikke var hensiktsmessig å identifisere de enkelte toppene i de forskjellige prøvene med disse verdiene.

I hvilken grad retensjon skjer, er derfor avhengig av størrelse og form på et gitt molekyl, samt porestørrelse i et gitt gel-materiale. Kjemisk sammensetning av analytten kan også ha en effekt dersom det finnes funksjonelle grupper på kolonnematerialet.

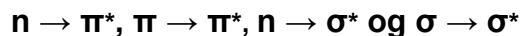
I dette arbeidet ble det brukt Sephadex-gel (Sephadex™ G-25 medium). Sephadex er et tredimensjonalt nettverk av polysakkaridkjeder. Den antas å være nøytral, og størrelsen på porene er avhengig av graden av kryssbindinger. På markedet finnes forskjellige typer, dvs. forskjeller mellom porestørrelsen.

Selv om gel-materialet skal være nøytralt, inneholder det ofte likevel små mengder med protolyserte karboksylsyrer, noe som kan medføre en spesifikk retensjon av stoffer med basiske egenskaper (Greibrokk et al., 1994). I tillegg kan de negative ladningene føre til at negativt ladde molekyler blir ekskludert pga. statisk repulsjon. Det kan også oppstå lipofil adsorpsjon av stoffer på gel-materialet. Slike interferenser bidrar til at elueringsvolumet kan være større eller mindre enn det aktuelle volumet til et gitt molekyl. De uønskede effektene kan minimaliseres ved endring av mobilfasen. For eksempel vil saltløsninger og bufferløsninger redusere statisk repulsjon (De Nobili et al., 1989, med referanser; Greibrokk et al., 1994). Bruk av vann som mobilfase, slik vi gjør i våre forsøk, kan fremme effekten av disse funksjonelle gruppene på kolonnematerialet (Perminova, 1999).

Preparativ gel-kromatografi anvendes ofte til bestemmelse av molekylvekt til syntetiske polymerer. Det er en lineær sammenheng mellom godt definerte molekyler, som proteiner eller dekstriner, og dets elueringsvolum. En må imidlertid bruke standarder som er så nære som mulig i struktur til de stoffene som skal karakteriseres for å kunne gi en kvantitativ bestemmelse av molekylvekt. På grunn av DNOMs inhomogenitet finnes det ikke standarder for å bestemme DNOMs molekylvekt. I tillegg påvirkes molekylvekten av flere faktorer. Selv om det ble brukt destillert vann som mobilfase, vil prøveopparbeiding kunne endre den absolutte molekylvekten. Dette vil kunne føre til at molekylvekten er større enn den er i naturen. Det er derfor mer relevant å bruke resultatene fra fraksjoneringen til å diskutere relative forskjeller og endringer av distribusjoner av DNOMs molekylvekt, enn å bestemme dens aktuelle molekylvekt.

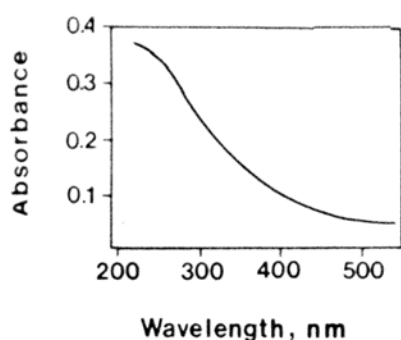
2.5 UV- absorpsjonspektroskopi

Absorpsjonen av lys i UV (200-400 nm) -delen av spekteret skjer på grunn av interaksjoner mellom strålingen og valenselektronene i molekylene. Valenselektronene i organiske forbindelser gjennomgår følgende overganger (Stevenson, 1994):



(De to første overgangene er mindre energetiske enn de to siste)

Økning i aromatisk karakter eller mengde av konjugerte dobbeltbindinger (-C=C-C= systemer) gir derfor økning i absorpsjon. Den delen i et organisk molekyl som absorberer lys, kalles kromofor (Stevenson, 1994). DNOM inneholder mange forskjellige kromoforer, noe som bidrar til at et typisk UV-VIS-spektrum av DNOM er en jevn linje som øker med avtagende bølgelengde, se figur 2.3 (Thurman, 1985).



Figur 2.3: Typisk UV-VIS-spekter av DNOM (Thurman, 1985).

DNOMs kromoforer består hovedsakelig av konjugerte C=C-systemer, aromatiske karboksyl- og funksjonelle fenolgrupper (Stevenson, 1994).

UV-VIS-spektre av DNOM er ikke brukbare for strukturanalyse av DNOM, på grunn av dårlig "opløsningsevne". Allikevel vil bruk av praktisk definerte parametere, slik som spesifikk UV-absorbans (sUVa; dvs. ekstinksjonskoeffisienten ($\epsilon = A_{254\text{nm};1 \text{ cm}} \text{ DOC}^{-1}$)) gi innsikt i strukturforskjeller i DNOM (Weishaar et al., 2003). sUVa er påvist til å øke med (Stevenson, 1994):

- økning i molekylvekt
- økning i karboninnhold (% w/w)
- økning i kondensering
- økning i aromatisitet

2.6 Radiotracer og gamma-spektroskopi

Radiotracere har i mange år blitt brukt som et diagnostisk redskap til å undersøke forskjellige prosesser, blant annet i industri-, kjemi-, samt medisin og miljøsammenhenger. Fordeler ved å bruke radiotracere er følgende (Bjørnstad et al., 2004):

- Høy deteksjonsfølsomhet, som gir mulighet for deteksjon ved svært lave konsentrasjoner (en radiotracer med halveringstid* på mer enn 100 dager kan bli detektert i mengder ned mot 10^{-17} g.)
- Bruk av slike små konsentrasjoner av radiotracere muliggjør studier av kjemiske prosesser uten at dynamikken til disse påvirkes
- Det er en ikke-destruktiv metode
- Metoden er rask og relativt enkel å bruke

En radiotracer kan være et molekyl, atom eller ion som inneholder en eller flere radionuklider. Radiotracerens egenskaper bør være identiske med det stoffet man vil studere. Dette gir en god mulighet til å identifisere, observere og studere ulike fysiske, kjemiske eller biologiske prosesser, slik som: Strøm, dispersjon, kinetikk og dynamikk, kjemiske reaksjoner, fysiologiske interaksjonen mm. (Bjørnstad et al., 2004).

Når man jobber med radiotracer i ultralave konsentrasjoner ($<10^{-7}$ M) kan uønskede effekter oppstå, slik som adsorpsjon på utstyrsveggene og forandringer i reaksjonshastigheten (Navrátil et al., 1992). Dette kan medføre feiltolkning av prosessene. For å unngå slike problemer anbefales det å tilsette en inaktiv tracer** til et system for å øke den totale konsentrasjonen (Navrátil et al., 1992).

I dette arbeidet ble interaksjoner mellom DNOM og kvikksølv i naturen studert ved å benytte isotopen ^{197}Hg . Den har en halveringstid på 64,1 timer, som gjør at den maksimale tiden nukliden kan benyttes etter produksjon er ca. 8 dager (etter 3 halveringstider er det kun 1/8-del igjen av aktiviteten, det er for lite til å at man kan detektere nukliden og

* Halveringstiden er den tiden det tar før halvparten av kjernene har henfalt og aktiviteten er redusert til det halve.

** En inaktiv tracer bør helst være identisk med radiotracer med unntak av at den inneholder en inaktiv isotop av den radionukliden som benyttes (Bjørnstad et al., 2004).

samtidig ikke måtte arbeide med alt for kraftige preparater rett etter produksjon). ^{197}Hg sender ut gammastråling når den desintegrerer og kan enkelt detekteres ved hjelp av gamma-spektroskopi.

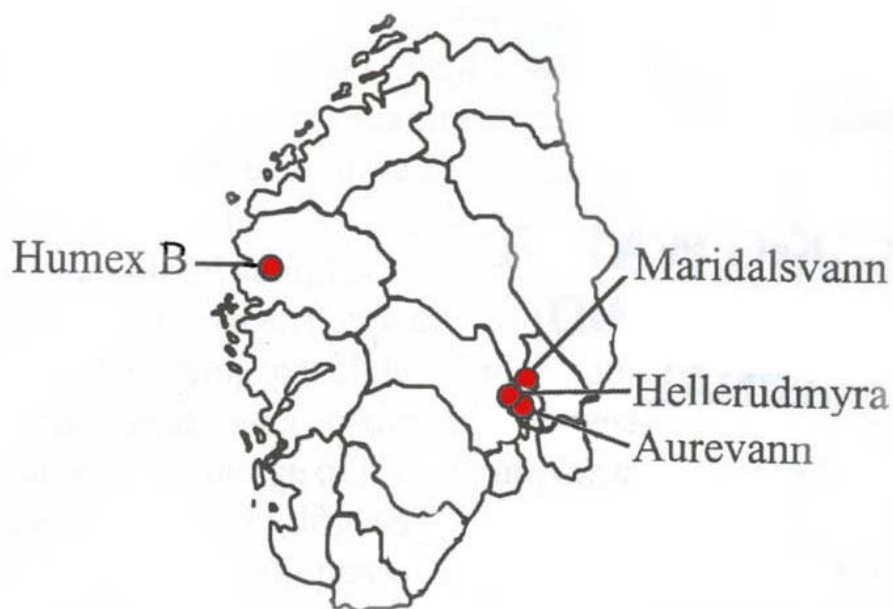
For deteksjon av gammastrålingen ble det benyttet Germaniumdetektorer (Ge-detektor), som er en såkalt halvleder-detektor (den bygger på de samme elektriske prinsipper som transistorer og dioder). Den strålingsfølsomme delen av en Ge-detektor består av et høyrent germaniumkrystall. Man velger Ge som halvleder fordi det er et tungt grunnstoff som har mange elektroner rundt kjernen. Det vil derfor være effektivt for deteksjon av γ -stråling, siden det er tilsvarende høy sannsynlighet for vekselvirkning mellom γ -strålen og elektronene rundt Ge-atomene. Slike detektorer, såkalte "High-purity" Ge-detektorer (på grunn av halvlederkravet om svært rent germanium) gir en svært god energioppløsning (0,2 til 0,5 keV av energier fra ca. 10 til 100 keV). Strømpulsene er proporsjonale med energien som er avsatt i detektoren. På den måten kan γ -strålingens energi måles (Lieser, 2001).

DEL 3

**MATERIALER OG
METODER**

3.1 Materialer

Dette arbeidet er basert på fire isolater fra NOM-typing-prosjektet (Gjessing et al., 1999). Prøvematerialet som er fra lokaliteter i den sørlige delen av Norge, er følgende: Hellerudmyra (HEM) er utløpet fra et myrområde i Bærum kommune, prøven ble tatt i mai. Aurevann (AUR) og Maridalsvann (MAR), er drikkevannskilder for henholdsvis Bærum og Oslo kommune. Humex B (HUM) er utløpet fra kontrollhalvdelen av innsjøen Skjervatjern (HUMEX prosjektet^{*}). Kart over prøvetakingsstedene er presentert i figur 3.1.



Figur 3.1: Kart over prøvetakingstedene for DNOM materialet (modifisert etter Gjessing et al., 1999).

Lokalitetene har forskjellige typer nedbørsfelt med store forskjeller i bl.a. størrelse, vegetasjon og klima. Dette bidrar til at DNOM fra disse stedene har forskjellige fysiske og kjemiske egenskaper.

^{*} HUMEX prosjekt – The Humic Lake Acidification Experiment (HUMEX) (Lydersen et al., 1996).

DNOM prøvene som ble benyttet i denne oppgaven forelå i form av frysetørret RO materiale. DNOM fra 600 – 1000 L vann ble i sin tid oppkonsentrert til 25 L ved hjelp av omvendt osmose (RO-isolasjon): Kapasiteten til utstyret er på ca. 200 L/t. Vann fra hvert av prøvetakingstedene ble pumpet gjennom et filter til et reservoar. Fra dette reservoaret ble vannet pumpet gjennom en kationbytter som bytter alle kationer med Na⁺ for å hindre utfelling. Deretter passerte vannet gjennom RO-membraner. Inne i RO-membranene ble vannet separert fra DNOM. Deretter ble konsentratet frysetørket (Gjessing et al., 1999).

Fra NOM-typing-prosjektet foreligger det et stort og omfattende datasett som beskriver de biologiske, fysiske og kjemiske egenskapene til disse isolatene. Utvalgte data for våre isolater er presentert i tabellene 3.1 og 3.2.

Tabell 3.1: Utvalgte fysiske og kjemiske egenskaper, samt sammensetning, til de utvalgte RO-isolatene. For å måle DOC, pH og ledningsevne ble isolatene oppløst i ultrarent karbonfritt vann (Gjessing et al., 1999). Isolatene ble løst opp i vannet i slike mengder som ga et tilsvarende karboninnhold som opprinnelig var i råvannet.

Isolat	DOC mg C L ⁻¹	pH	Lednings- evne mS/m	Tetthet g/mL	C %	H %	H/C [*] %	Org. S µgS/ mgC	Aske %	Org. %	M _w ^{**} Da
HEM	17,7	5,17	2,49	0,06	50,3	5,3	0,11	3,46	32,9	67,1	3900
AUR	4,8	6,38	2,20	0,31	45,8	5,9	0,13	0,82	56,0	44,0	2400
MAR	2,7	5,81	2,31	0,13	43,9	5,3	0,12	6,88	68,4	31,6	2900
HUM	7,4	5,18	1,79	0,67	52,7	5,4	0,10	3,03	36,7	63,3	3600

* H/C-forhold som indikerer graden av aromatisitet og umettede karbonbånd. Relativt lite H/C indikerer at DNOM har høy grad av aromatisitet (Stevenson, 1994).

** M_w er molekylær vekt, basert på fluorescens korrelasjon spektroskopi (Lead et al., 1999).

Tabell 3.2: Det totale innhold av hovedkationer og -anioner i en løsning av RO-isolatene i ultrarent karbonfritt vann (Gjessing et al., 1999).

Isolat	Cl ⁻ mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	NO ₃ ⁻ µg/L	Cu ²⁺ µg/L	Fe ^{2+/3+} µg/L	Mn ²⁺ µg/L	Mg ²⁺ mg/L	Na ⁺ mg/L	K ⁺ mg/L	SiO ₂ mg/L
HEM	1,0	3,4	8	4,2	316	19	0,44	2,44	0,33	2,00
AUR	1,2	3,4	117	2,1	91	7	0,11	3,88	0,28	0,40
MAR	1,9	4,3	210	4,0	41	2	0,06	3,98	0,19	0,16
HUM	2,6	1,0	1	1,8	99	1	0,03	2,90	0,09	0,53

Det finnes ingen data på kvikksølvinnholdet i isolatene fra NOM-typing-prosjektet. Derfor ble det gjennomført en ICP-MS-analyse (Wiker, 2006), og følgende konsentrasjoner av Hg ble funnet (tabell 3.3).

Tabell 3.3: Hg-innhold i Hellerudmyra (HEM), Aurevann (AUR), Maridalsvann (MAR), Humex B (HUM)-isolatene, basert på ICP-MS-analyse (Wiker, 2006).

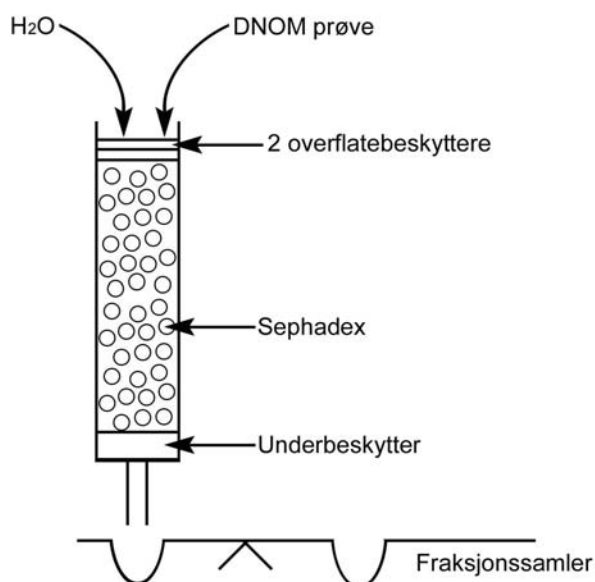
Isolat	Hg µg/kg	Standardavvik ± σ
HEM	89	± 4,87
AUR	112	± 7,39
MAR	45	± 4,95
HUM	131	± 6,16

3.2 Fraksjonering av DNOM

Det ble laget løsninger av de fire isolatene på følgende måte: Hvert av isolatene ble løst opp i dobbelt ionebyttet og karbonfritt vann (Milli-Q vann, også kalt Type 1 vann) og filtrert gjennom et 0,45 µm cellulosefilter, slik at de hadde en tilnærmet lik konsentrasjon av karbon (~0,35 g C L⁻¹). Filtringen gjennom 0,45 µm cellulosefilter gir oss den oppløste fraksjonen av NOM (DNOM) (Perdue & Ritchie, 2004).

Ufiltrerte løsninger ble oppbevart i et kjøleskap. Filtrerte løsninger ble fraksjonert på kolonnen umiddelbart. Volumet på prøver som ble introdusert på toppen av kolonnen, var 3 mL.

På toppen av gel-materialet (på kolonnen) ble det lagt to overflatebeskyttere for å sørge for jevn fordeling av prøven. Overflatebeskytterne består av to runde plastgittere. I enden av kolonnen ble det i tillegg lagt en underbeskytter (laget av porøst materiale) slik at gel-materialet ikke rant ut av kolonnen. En skisse av kolonnen er vist i figur 3.3. Det ble foretatt en rekke metodiske eksperimenter for å finne den optimale kolonnedimensjonen, prøvevolum og elueringshastighet.

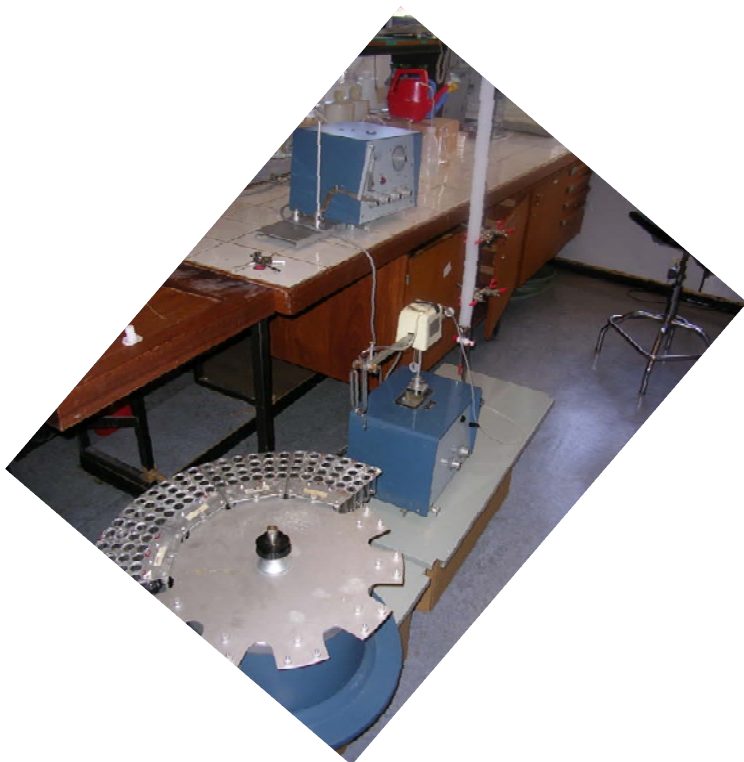


Figur 3.3: Prinsippskisse av kolonnen med Sephadex™ G-25 medium som kolonnemateriale.

Følgende optimale kolonneparametre ble funnet: kolonnelengde – 98 cm, diameter – 2,9 cm og volum – 646,9 mL. Som kolonnemateriale ble Sephadex™ G-25 medium valgt. Den har et fraksjoneringsområde basert på molekylvekt (M_w) mellom 100-5000 Da (Biosciences AB, Sverige). Ifølge klassisk litteratur har denne typen av Sephadex god evne til å størrelsesseparere DNOM (Gjessing, 1976). Sephadex må i hht. læreboken ligge i vann i minst 3 timer for å svulle ferdig før bruk (Greibrokk et al., 1994). Sephadex er

imidlertid utsatt for mikrobiell og bakteriell nedbrytning (Greibrokk et al., 1994; Wang et al., 2004) og bør derfor konserveres ved langvarig lagring. Dette ble gjort ved å pumpe igjennom kolonnen destillert vann tilsatt 4-5 dråper kloroform per 1 L. Avkonserveringen (utvasking av kloroform av kolonnen med store mengder vann i 3-4 timer) ble utført før fraksjonering. Det ble gjennom studiet brukt 3 like kolonner. Den første ble laget våren 2005, den andre høsten 2005 og den tredje våren 2006.

Type 1-vann ble benyttet som mobilfase, og elueringshastigheten var på 10 mL pr. min. Eluatet ble samlet i en serie delprøver ved hjelp av en automatisk fraksjonssamler ved enden av kolonnen. Til karakteriseringen av DNOM-materialet ble det samlet 5 mL i hver delprøve, mens det ved kvikksølvforsøket ble samlet 10 mL i hver delprøve. Kolonnen og prøvesamleren er vist i figur 3.4.



Figur 3.4: Gel-kolonnen med fraksjonssamleren

Cirka 60 fraksjoner ble samlet ved hver fraksjonering. Absorbansen ved $\lambda = 254$ nm og DOC ble målt i hver av disse delprøvene (se nedenfor). Hver prøve ble fraksjonert minst 3 ganger under de samme betingelser.

3.3 UV-absorpsjonspektroskopi og løst organisk karbon analyse (DOC)

Målinger av UV-absorbans ble utført med en UV-1201 UV-VIS enkeltstrålende spektrofotometer (Single beam spectrophotometer UV-1200 UV-VIS series, Shimadzu, Kyoto, Japan), ved en bølgelengde på 254 nm. Det er vist at humus absorberer kraftig i 200–300 nm-området (se fig. 2.3 og bl.a. Thurman, 1985), og bølgelengden 254 nm brukes mye i DNOM-forskning (Aho & Lehto, 1984; Sedlacek et al., 1987; De Haan et al., 1990; Weishaar et al., 2003). Type 1-vann ble brukt som blindprøve. Jevnlige kontroller mot Type 1-vann under målingene viste at det ikke var noen drift i instrumentet. Ifølge instrumentmanualen (Shimadzu, 1992) har spektrofotometeret en nøyaktighet på $\pm 0,005$ absorbansenheter og reproduserbarhet på $\pm 0,002$ absorbansenheter (ved en absorbans på 1.000). Det ble benyttet kvartskvyetter med en celledengde på 1 cm ved alle målingene. Kyvettene ble skylt grundig med Type 1-vann mellom hver måling.

Løst organisk karbon (DOC) i de oppsamlede fraksjonene ble bestemt ved hjelp av et TOC-5000A-instrument, Shimadzu. (Gadmar et al., 2002) påviste flere fordeler ved å bruke denne type instrument for å bestemme DOC-konsentrasjoner i ferskvann. Metoden går ut på at organisk karbon forbrennes (oksideres) til CO_2 ved høy temperatur (680 °C) med katalysator (aluminiumskuler dekket med platina) til stede i en reaktor. Mengden CO_2 som blir dannet, måles ved hjelp av en infrarød (IR) detektor. Instrumentet, slik det er satt opp, har en deteksjonsgrense på ca. 1 ppm (Shimadzu, 2000). Presisjon av DOC-analysen ligger på 0,2-0,5 mg C L⁻¹.

Metodeoppsettet for NPOC (Non-purgeable organic carbon) på TOC-5000A-instrumentet ble valgt for DOC-analysene. Uorganisk karbon (hovedsakelig bikarbonat) i prøven ble fjernet ved at 40 µL av 1M HCl ble tilsatt prøvene for å framskaffe en pH på ca 2, før NPOC-metoden kjøres. All uorganisk karbon blåses da ut av prøven i form av CO_2 når luft blåses igjennom prøven. Dette gjøres før injisering av prøven i reaktor kammeret.

Kaliumhydrogenftalat ble brukt som standard referansemateriale til DOC-analysen. Materialet anbefales brukt som standard i henhold til ISOs retningslinjer (ISO, 1999, som sitert i Gadmar et al. 2002)

3.4 Produksjon av radioaktivt Hg

Fraksjonering av de fire ulike isolatene og karakterisering ved hjelp av UV-absorpsjon og DOC-analyse, var den første delen av oppgaven.

Den andre delen av oppgaven besto i å studere til hvilken DNOM-fraksjon kvikksølv (Hg^{2+}) assosierer seg. Dette ble gjort ved å tilsette en radioaktiv isotop av kvikksølv til isolatene, fraksjonere dem (etter 24 timer reageringstid mellom DNOM og Hg^{2+}), og måle aktiviteten i hver av de oppsamlede fraksjonene.

For dette formålet ble isotopen ^{197}Hg ($T_{1/2} = 64,1$ timer) valgt. Isotopen ^{197}Hg ble valgt fordi den vanlige ^{203}Hg ($T_{1/2}$ på 46,6 dager) var vanskelig tilgjengelig. Vanligvis produseres ^{203}Hg i en kjernereaktor, men "produsenten" på Kjeller tillater ikke bestråling av Hg, på grunn av faren for lekkasjer og påfølgende amalgamdannelse. En ytterligere fordel med ^{197}Hg var at på grunn av dennes korte halveringstid dannes det ikke langlivet, radioaktivt avfall. Avfallsløsninger kan lagres i ca. en måned og deretter kastes som vanlig kjemisk avfall (etter kontrollmåling).

Produksjon av ^{197}Hg ble utført ved å bestråle en gullfolie med høyenergetiske protoner (Schwerer, 2006):

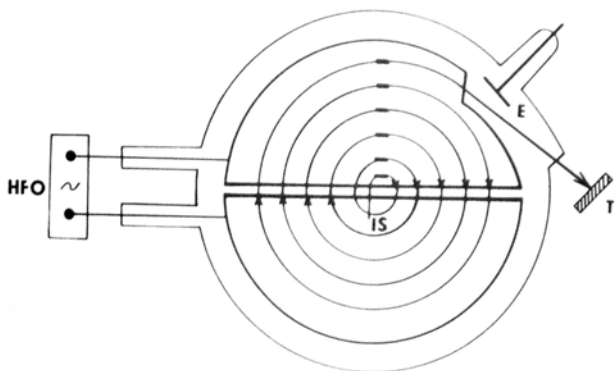


^{197}Hg ble laget på syklotronen ved Fysisk institutt, Universitet i Oslo (Syklotron MC-35 syklotron, fra 1979, figur 3.6)

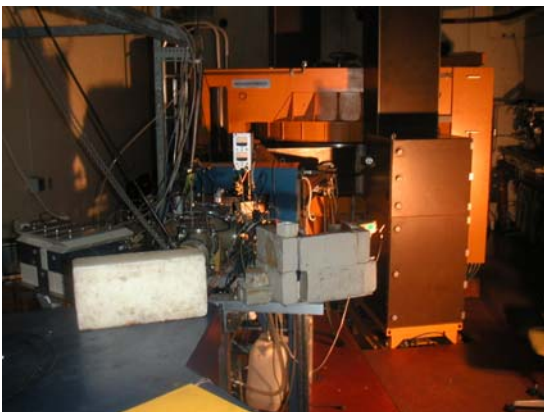
En syklotron er en type partikkelakselerator som er et viktig verktøy for radionuklideproduksjon. Den kan akselerere ladede partikler, slik som protoner, deutroner, alfapartikler og tyngre ioner. For å gi partiklene fart brukes et elektrisk felt. For å nå høye nok energier må partiklene akselereres gjentatte ganger i feltet. Dette oppnås ved å tvinge dem til å gå i

* Elektronvolt er en måleenhet for energi. En elektronvolt er den energien et elektron får når den akselereres gjennom et spenningsgap på 1 volt.

en sirkelbane ved hjelp av et magnetfelt. Etter hvert som partiklene får større hastighet, vil sirkelbanen få større og større radius, inntil partiklene går ut av akseleratoren (figur 3.5). Ved syklotronen i Oslo (figur 3.6) kan partiklene få en hastighet på opptil en tredel av lysets hastighet. For protoner tilsvarer dette 35 MeV bevegelsesenergi.



Figur 3.5: Skisse av Syklotron. HFO (Høy-frekvens-oscillator), T (Target), IS (Ionekilde) og E (Ekstraksjons elektrode).

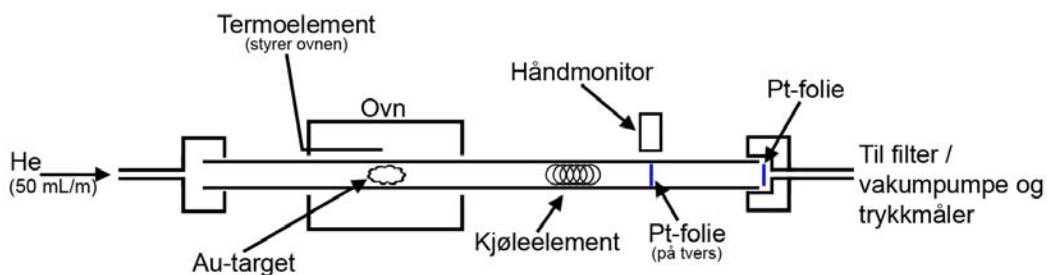


Figur 3.6: Syklotron MC-35, fra 1979, ved Universitetet i Oslo.

En Au-folie (0,0025 mm Au) montert i en Al-holder ble bestrålt med 12 MeV-protoner med en stråleintensitet på ca $3.8 \cdot 10^{12}$ p/(s cm²) i syklotronen. Strålingstiden var på 4 til 5 timer (mer detaljerte opplysninger er oppgitt i Appendiks E: Produksjon av ¹⁹⁷Hg).

3.5 Fordampning og utvasking av Hg

Figur 3.7 viser fordampningsutstyret som ble brukt for å ekstrahere Hg^0 fra "target" (Au-folien kalles target). Au-targetet (figur 3.8) ble plassert i et glassrør (figur 3.9) som ble varmet opp til $850\text{ }^\circ\text{C}$. Glassrøret hadde en diameter er på 1,5 cm og lengde lik 55 cm. Au-targetet ble plassert 25-30 cm inn i glassrøret. På enden av røret ble det satt opp to kalde (dvs. $20\text{-}40\text{ }^\circ\text{C}$) Pt-folier. De har som funksjon å fange opp Hg^0 ved at Hg^0 (i gassform) kondenseres på Pt-overflaten. Alt dette foregår ved et undertrykk på ca. 0,15 atm. mens en svak strøm av He (50 mL/m) går gjennom systemet for å drive Hg^0 mot Pt-foliene (se figur 3.7). Det ble også påmontert et kjølesystem utenpå enden av røret før oppfangingsfoliene, for å forbedre avsetningen av Hg^0 ved å senke Pt-temperaturen.



Figur 3.7 Skisse av fordampningsutstyr. Parametrene til glassrøret er følgende: diameteren er på 1,5 cm; lengden er på 55 cm, og Au-targetet ble plassert 25-30 cm inn i glassrøret fra enden.

Prosedyre for å vaske Hg^0 ut fra Pt-folien:

Etter at Hg^0 var avsatt på Pt-foliene, ble disse tatt ut av røret og behandlet med 0,5 mL HNO_3 (14,6 M) i 20 til 30 min. HNO_3 løser ut kvikksølv fra overflaten av Pt-foliene og oksiderer det til Hg^{2+} ($3\text{Hg} + 2\text{NO}_3^- + 8\text{H}^+ = 3\text{Hg}^{2+} + 2\text{NO} + 4\text{H}_2\text{O}$, $E_{\text{red/ox}} = + 0,1$). Denne løsningen, som bestod av $^{197}\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ i 0,5 mL HNO_3 , hadde en pH på 0 og høy ionestyrke.



Figur 3.8 Au-Target.



Figur 3.9 Fordampningsrør med target.

3.6 Tilsetning av Hg^{2+} til DNOM-løsninger: Betingelser, tilsetningsmåter og konsentrasjoner

Både DNOMs struktur og egenskaper påvirkes av vannkvaliteten. Spesielt vil DNOMs egenskaper påvirkes av pH og ionestyrke (Aho & Lehto, 1984; Baalousha et al., 2006). Tilsetning av Hg^{2+} løsningen, med pH 0 og høy ionestyrke, til DNOM løsninger vil derfor representere et problem.

Før den produserte $^{197}\text{Hg}^{2+}$ kunne tilsettes DNOM-prøvene, måtte derfor pH og ionestyrke til Hg^{2+} -løsningen endres. Dette ble gjort ved å tilsette 0,5 mL NaOH (14,6 M) til løsningen (0,5 mL HNO_3 , 14,6 M, med $^{197}\text{Hg}^{2+}$ i) for å nøytralisere løsningen. Denne 1 mL pH nøytrale $^{197}\text{Hg}^{2+}$ -løsningen hadde imidlertid en meget høy ionestyrke (pga store mengder av Na^+ og NO_3^- ioner). Disse ionene ble i stor grad fjernet fra løsningen ved dialyse.

- **Dialyse ble gjennomført på følgende måte:**

Dialysering er en osmotisk prosess hvor ioner beveger seg fra et medium med høyt saltinnhold til et medium med lavere saltinnhold, gjennom en semipermeabel membran. En dialysepølse ble laget av en dialysemembran* og den nøytraliserte løsningen på 1 mL ble helt inn i pølsen. Deretter ble den hengt inne i et stort glass (på 1 L) med Type1 vann i

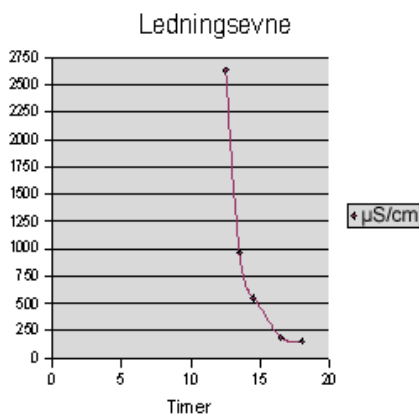
* Molecularporous regenerated cellulose dialysis membrane, MWCO:12-14,000; Spektra/Por 4 Membrane, USA)

18 timer (se figur 3.10). Et magnetisk røreverk ble brukt for å sikre en jevn blanding av vannet.



Figur 3.10: Illustrasjon av dialysepølse med den nøytraliserte løsningen.

Det ble gjennomført en rekke eksperimenter for å lage en kurve som viser reduksjon i ledningsevnen som funksjon av dialysetiden. Dette for å fastslå den optimale dialysetiden siden det også skjedde et tap av $^{197}\text{Hg}^{2+}$ gjennom membranen. Seks dialysepølser ble fylt med 10 mL av en NaNO_3 (2,5 M)-løsning. Pølsene ble hengt opp i et stort begerglass (1 L) fylt med Type 1 vann som vist på figur 3.10. I løpet av en periode på 20 timer ble disse dialysepølsene fjernet, en etter en, og ledningsevnen bestemt vha. (EcoScan CON 5, Singapore) ledningsevнемåler. Ledningskurven er vist på figuren 3.11. Etter 20 timers dialyseringen er ledningsevnen i løsningen på ca. $150 \mu\text{S cm}^{-1}$, som tilsvarer 15mS m^{-1} . Det er mer enn det som finnes i selve isolatene (se tabell 3.1), men var nok til å få tilbake de vanlige mønstrene på DNOM-fraksjoneringskurvene (se del 4.2 og del 4.3). Dessuten er lengre dialysetid uønsket på grunn av stadig tap av Hg^{2+} , både ved utlekking gjennom membranen og gjennom desintegrasjon (se del 3.7).



Figur 3.11: Ledningsevnen som funksjon av dialysetiden.

En dialysert løsning på 1 mL har lav (15mS m^{-1}) ionestyrke, pH mellom 6 og 7 og inneholder $^{197}\text{Hg}^{2+}$ i ultralav konsentrasjon ($2 \cdot 10^{-12}$ M). Til den dialyserte løsningen ble det tilsatt 1 mL inaktiv Hg^{2+} i form av HgCl_2 løsning ($600 \mu\text{g L}^{-1}$). Dette ble gjort for å øke konsentrasjonen av kvikksølv ($600 \mu\text{g L}^{-1}$), slik at forholdet mellom Hg^{2+} og DNOM ble mer tilsvarende det man globalt sett finner i vannmiljøet.

Til 2 mL av løsningen med kvikksølv ble det tilsatt 1 mL konsentrert DNOM-løsningen slik at den endelige DOC-konsentrasjonen ble $0,350 \text{ g C L}^{-1}$; se del 3.2. Til sammen ble det 3 mL som skulle fraksjoneres.

Løsningen med Hg^{2+} og DNOM ble lagret i 24 timer for at likevekt skulle innstilles og deretter fraksjonert. 40 fraksjoner, hver på 10 mL, ble samlet opp i 20 mL telleglass og $^{197}\text{Hg}^{2+}$ ble målt ved hjelp av gamma-spektroskopi. Grunnen til at det ble samlet fraksjoner på 10 mL i stedet for 5 mL forklares i del 3.7.

- **”Blankeksperiment”:**

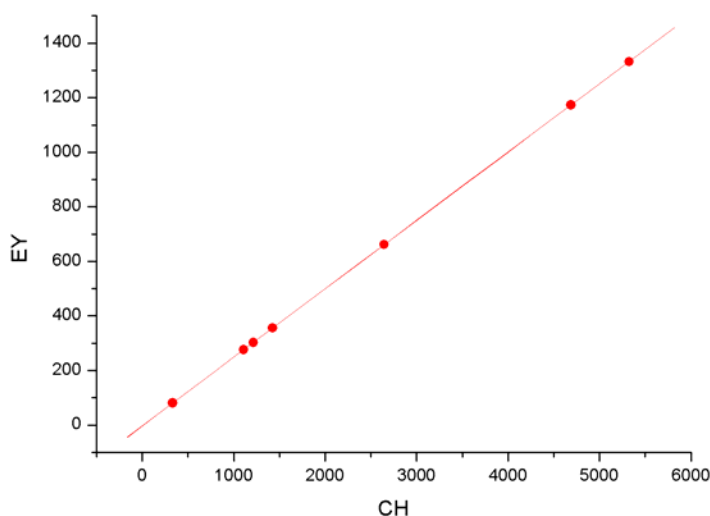
Det ble kjørt en blindprøve, som bestod av bare Hg^{2+} -løsningen, gjennom kolonnen for å se hvor Hg^{2+} kommer ut av kolonnen uten å være bundet opp av DNOM i prøven. En dialysert prøve som inneholdt ultralav konsentrasjon av $^{197}\text{Hg}^{2+}$ ble tilsatt 2 mL HgCl_2 (70 mg L^{-1}). Det er hvert å merke seg at blindprøven inneholdt mer inaktiv Hg enn DNOM-løsningene. Denne prøven var også på omtrent på 3 mL.

3.7 Bestemmelse av $^{197}\text{Hg}^{2+}$ -konsentrasjon

Hver fraksjon (på 10 mL) ble målt i en time på en high purity 20% germaniumdetektor (HPGe-detektor), koblet til en automatisk prøveskifter. En times måling er nødvendig for å få et tilfredsstillende antall tellinger. Ettersom aktiviteten (desintegrasjoner per sekund) er fordelt på såpass mange fraksjoner, er det relativt lav aktivitet igjen i hver fraksjon. For å redusere måletiden, men uten at usikkerheten i målingene skulle bli for store, ble det derfor besluttet å samle fraksjoner på 10 mL isteden for 5 mL ved fraksjonering.

- **Kalibreringen av detektoren**

Dette gjøres ved hjelp av standarder (bestående av ^{133}Ba , ^{137}Cs og ^{60}Co) med kjente γ -linjer. Kalibreringskurven lages som en funksjon av gammaenergi og kanalnummer til detektoren, CH (figur 3.12).



Figur 3.12: Kalibreringskurve for 20% HPGe-detektor, hvor CH er kanalnummer og E γ er gammaenergi til standardene.

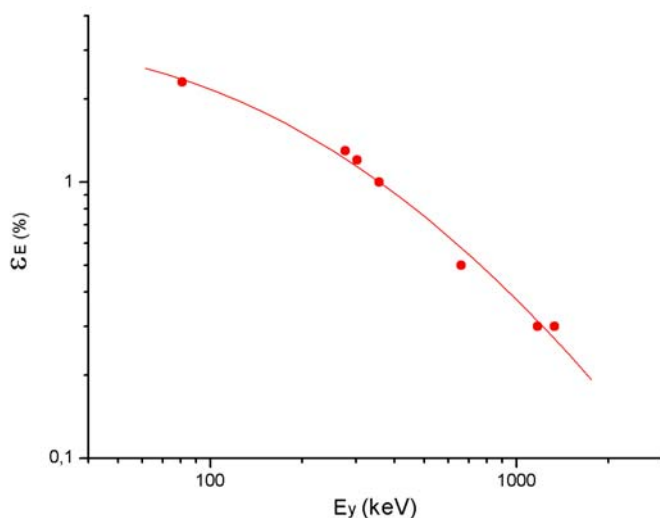
- **Effektivitetskurve**

For å kunne sammenlikne forskjellige detektorer angir derfor de fleste produsenter detektoreffektiviteten i forhold til en standarddetektor, som er en 3 x 3 tommeres NaI(Tl) scintillasjonsdetektor ved måling på 1332 keV γ -linjen fra en ^{60}Co punktformet

standardkilde i 25 cm avstand til detektoren. Det vil si at "20% " Ge-detektor kun detekterer 1/5 av γ -kvantene fra ^{60}Co som standard NaI-detektoren gjør (Knoll, 1999). Imidlertid så er effektiviteten til en HPGe detektor mer sammensatt en denne enkle angivelsen av detektoreffektivitet gir inntrykk av: Geometrisk form, volum, avstand til prøven, osv. spiller alle avgjørende roller. I tillegg er absorpsjon av gammakvanter sterkt avhengig av gammakvantenes energi. Det er derfor nødvendig å gjøre en detaljert bestemmelse av en detektors effektivitet som funksjon av energi for en gitt prøveposisjon. Effektivitetskurven til detektoren benyttet i denne oppgaven er vist på figur 3.13. Effektiviteten (ϵ_E) til punktene på kurven er beregnet på grunnlag av målte standardkilder og regnet ut fra formelen:

$$\epsilon_E = \frac{R}{A \cdot I_\gamma}$$

Der A er kjent aktivitet fra standard, I_γ er gammaintensitet og R er antall tellinger som detektoren registrerer.

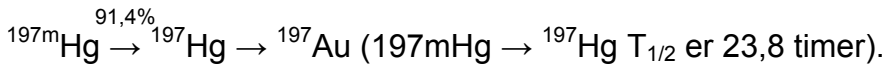


Figur 3.13: Effektivitetskurve for 20% HPGe-detektor

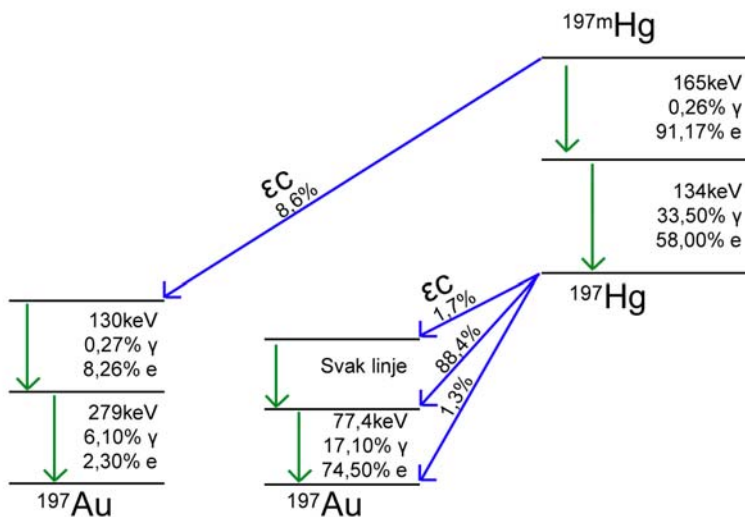
- **Beregninger av aktiviteten i hver fraksjon**

Når Au-targetet bestråles, vil ^{197}Hg produseres både i metastabil tilstand (^{197m}Hg) og grunntilstanden ^{197g}Hg (som vanligvis bare skrives ^{197}Hg). Når den metastabile tilstanden deeksiterer dannes stort sett ^{197g}Hg . Det genetiske forhold mellom tilstandene og datteren

^{197}Au (som dannes når grunntilstanden desintegrerer) er som følger:



Som angitt desintegrerer $^{197\text{m}}\text{Hg}$ til ^{197}Hg i 91,4% av tilfellene til ^{197}Hg og det er desintegrasjon av ^{197}Hg som registreres i Ge-detektoren. Denne isotopen kan henfalle på flere forskjellige måter (figur 3.14), men den sterkeste linjen er observert ved $E_{\gamma} = 77,4 \text{ keV}$ ($I_{\gamma} = 17,1\%$, bare denne energien ble målt). Siden $^{197\text{m}}\text{Hg}$ -isotopen har så kort halveringstid (24 timer), vil mengden ^{197}Hg ikke avta eksponentielt som funksjon av tiden, siden den produseres kontinuerlig fra henfall av $^{197\text{m}}\text{Hg}$ så lenge det er noe igjen av den metastabile Hg-isotopen. Dette må tas i betraktning når antall tellinger for ^{197}Hg i hver fraksjon skal bestemmes. Et typisk spekter for ^{197}Hg er presentert i figur 3.15.



Figur 3.14: Henfallsskjema for ^{197}Hg hvor ϵc er elektroninnfangning og e er konversjonselektroner (Firestone & Shirley, 1996).

Antall tellinger, R, og dermed aktiviteten (desintegrasjoner pr. sekund), er funksjon av tiden:

$$A = A_0 e^{-\lambda t} = \lambda N$$

Hvor A_0 er aktiviteten ved start, A er aktivitet ved angitt tid (t), t er tid, N antall atomer og λ er $\ln 2 / T_{1/2}$, hvor $T_{1/2}$ er halveringstid. Denne formelen gjelder ikke hvis nukliden også produseres fra desintegrasjon av en annen nuklide, slik som i tilfellet med ^{197}Hg . Da må den mer avanserte formelen nedenfor benyttes. Denne formelen ble brukt for å korrigere for at mengden ^{197}Hg varierer med tiden.

Følgende formler ble brukt (Lieser, 2001):

- **Formel a:**

$$N_2(t) = \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} N_1^0 (e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t}) + N_2^0 e^{-\lambda_2 t}$$

Hvor $N_2(t)$ er antall ^{197}Hg atomer ved en gitt tid (t), N_1^0 er antall $^{197\text{m}}\text{Hg}$ atomer ved $t = 0$, N_2^0 er antall ^{197}Hg atomer ved $t = 0$. N_1^0 og N_2^0 regnes ut ved hjelp av **formel b og c**.

- **Formel b og c:**

$$N_1^0 = \frac{R_1^0}{I_{\gamma(134)} \epsilon_{(134)}}$$

$$N_2^0 = \frac{R_2^0}{I_{\gamma(77)} \epsilon_{(77)}}$$

Hvor R_1^0 er antall tellinger ved $t=0$ for $^{197\text{m}}\text{Hg}$ og R_2^0 er antall tellinger ved $t=0$ for ^{197}Hg før fraksjoneringen og måling. I_{γ} er gammaintensitet, ϵ_{77} og ϵ_{134} er effektivitet til E_{77} og E_{134} .

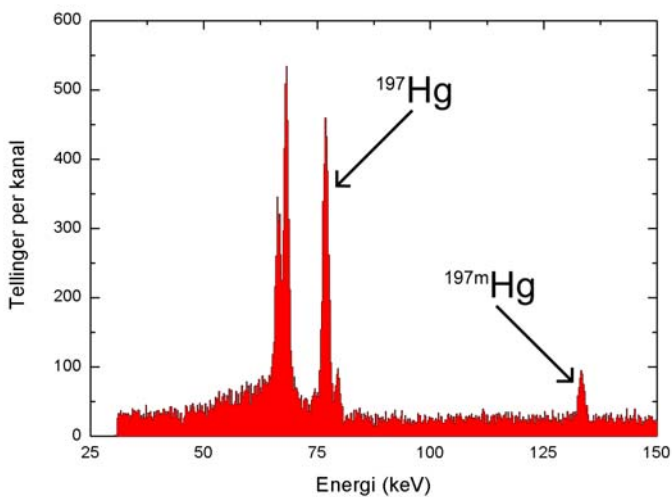
- **Formel d:**

$$\frac{N_2^0}{R_{2,n}^0} = \frac{N_2(t)}{R_2(t)}$$

Hvor $R_{2,n}^0$ er antall tellinger for fraksjon n ved $t=0$ og $R_2(t)$ er antall tellinger for fraksjon n ved en gitt tid (t). Ut fra **formel d** regner en antall tellinger, $R_{2,n}^0$, som er blitt korrigert for desintegrasjon (**formel e**).

- **Formel e:**

$$R_{2,n}^0 = R_2(t) \frac{N_2^0}{N_2(t)}$$



Figur 3.15: Typisk spekter for ¹⁹⁷Hg.

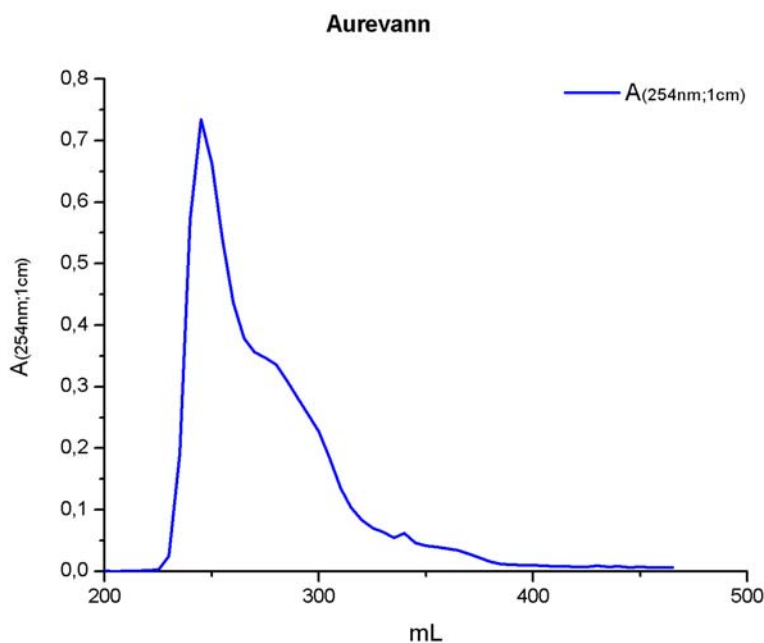
DEL 4

**RESULTATER OG
DISKUSJONER**

4.1 Sephadex egenskaper

- **Svelling**

Det er som nevnt ovenfor foreskrevet en svellingstid for Sephadex-geler på fra 3 til 72 timer, avhengig av type (Greibrokk et al., 1994). Med svellingstid på 72 timer i vann ga dette generelt et dårlig resultat som det er vist eksempel av i figur 4.1 med Sephadex G-25 (data finnes i appendiks B). Vi ser at fraksjoneringen resulterte i dårlig separasjon med så å si bare en topp, mellom 220 mL og 400 mL. Mønstrer på toppen kan imidlertid antyde at toppen ikke er helt «ren». Materialet inneholder muligens flere fraksjoner enn en.



Figur 4.1: Kromatogram av Aurevann-isolatet, kjørt på Sephadex G-25, etter kun 72 timers svellingstid. Den blå kurven representerer UV-abs.

- **Tap**

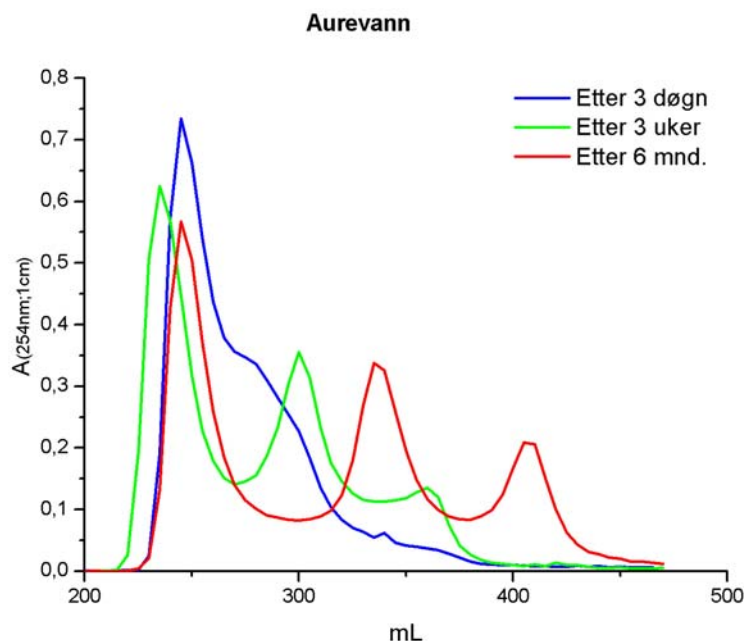
Det er dokumentert i litteraturen at Sephadex adsorberer humus (De Nobili et al., 1989, med referanser). Adsorpsjon er observert under forskjellige eksperimentelle betingelser, men i hvor stor grad humusforbindelser blir adsorbent og om adsorpsjonen er reversibel eller ikke, varierer fra kilde til kilde (De Nobili et al., 1989, med referanser). Grad av adsorpsjon synes å være avhengig av egenskapene til DNOM, type Sephadex og mobilfase. Det ble derfor utført et eksperiment for å finne graden av irreversibel

adsorpsjon. 3 mL av Aurevann-løsning ($0,350 \text{ g C L}^{-1}$) ble fraksjonert på kolonnen og etterpå ble alle fraksjonene som hadde en absorbans ved 254 nm slått sammen. Dette resulterte i en løsning på 300 mL. En tilsvarende løsning ble deretter laget ved å fortynne 3 mL Aurevann-løsning ($0,350 \text{ g C L}^{-1}$) til 300 mL. Så ble DOC målt i de to løsningene. Resultatene fra disse målingene ble følgende: $2,54 \text{ mg C L}^{-1}$ og $2,83 \text{ mg C L}^{-1}$ i hhv. fraksjonert og direkte fortynnet løsning. Siden instrumentet for TOC-analyser har en usikkerhet på $\pm 0,5 \text{ mg C L}^{-1}$ (se del 3.3) er det ikke grunnlag for å påstå at det er en signifikant forskjell mellom disse tallene. Det betyr at det ikke kan påvises tap av Aurevann- isolatet på vår kolonne.

Man kan imidlertid ikke se bort fra at adsorpsjon av de andre isolatene kan finne sted. For eksempel er Humex B og Hellerudmyra-isolatene mer aromatiske enn Aurevann-isolatet (Gjessing et al., 1999) og kan av den grunn i større grad adsorberes på kolonnen (se del 2.4) enn resultatet fra dette eksperimentet viser.

- **Endringer av egenskapene med øket brukstid**

Det ble observert en betydelig endring i separasjonsmønsteret jo lengre tid materialet fikk stå i svullet tilstand. Etter hvert som kolonne-materialet fikk stå lagret i vann uten konserveringsmiddel over et halvt år utviklet fraksjoneringssevnen til materialet seg slik at en oppnådde en fraksjonering i tre vel atskilte topper av Aurevann-materialet (figur 4.2, data finnes i appendiks B).



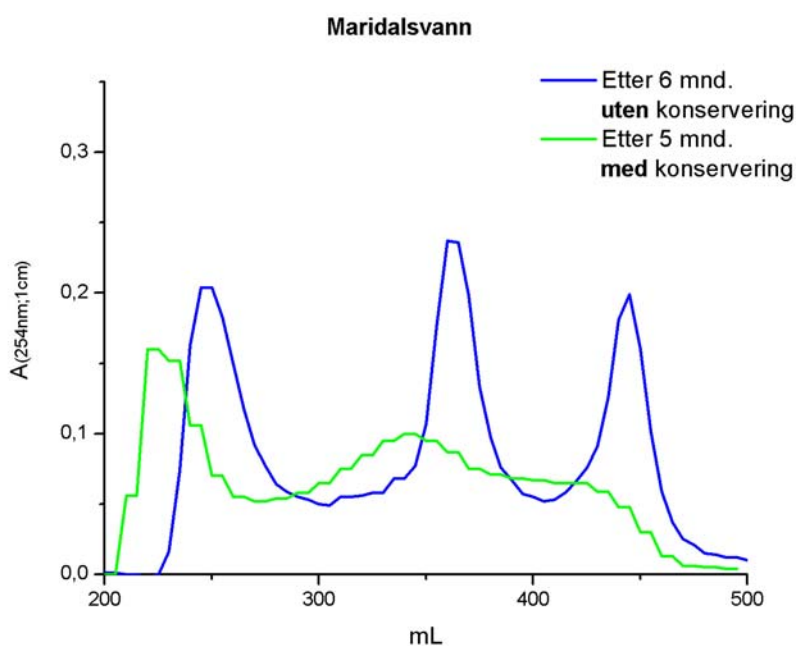
Figur 4.2: Kromatogrammer av Aurevann-isolatet, som viser utvikling i separasjon over lang tid, kjørt på Sephadex G-25. Kurvene representerer UV-abs. Blå kurve representerer isolatet etter at Sephadex har stått i vann i 3 døgn, grønn kurve viser utviklingen etter 3 uker og rød kurve viser fraksjoneringen etter 6 måneders bruk.

Resultater fra figur 4.2 viser en betraktelig endring i separasjonen over tid, fra nesten ingen separasjon (blå kurve) til en fraksjonering med tre topper som er svært godt atskilt (rød kurve). Figur 4.2 viser også at de to siste toppene stammer fra den første toppen siden den første toppen minker og de to siste øker med tiden. Den røde kurven ligger mellom 220 mL og 470 mL, mens den blå befinner seg mellom 220 mL og 400 mL. I tabell 4.1, se nedenfor, er de totale arealene (A_{real}) under hver kurve presentert. Siden standard avvik (σ) er relativt lite (se tabell 4.1) kan ikke noen signifikant kvantitativ forskjell i det totale arealet mellom kurvene påvises.

Tabell 4.1: Det totale areal (A_{real}) under hver kurve, gjennomsnittsareal og standard avvik (σ). A_{real} ble regnet ved hjelp av statistikk programmet Origin (Versjon 7SRI. OriginLab Corporation).

Aurevann	A_{real}	Gjennomsnittsareal $\pm \sigma$
Fraksjonering etter 3 døgn	37,8	38,8 \pm 0,9
Fraksjonering etter 3 uker	39,6	
Fraksjonering etter 6 mnd.	39,1	

Årsaken til disse endringene kan være at mikroorganismer i systemet (Wang et al., 2004) endrer gelens struktur eller funksjonalitet, slik at den er i stand til gjøre en bedre separasjon. For å sjekke denne teorien ble Sephadex konserverert med kloroform etter 72 timers svellingstid. Kloroform er kjent for sine desinfiserende egenskaper. Resultat av dette er vist for Maridalsvann-isolatet (figur 4.3, data finnes i appendiks B).



Figur 4.3: Kromatogrammer av Maridalsvann-isolatet, som viser betydningen av konserveringen med kloroform, kjørt på Sephadex G-25. Kurvene representerer UV-abs. Blå kurve representerer fraksjonering på "ferdigutviklet Sephadex G-25" etter 6 måneders bruk uten konservering. Grønn kurve viser fraksjonering av isolatet etter 5 måneder når konservering ble benyttet.

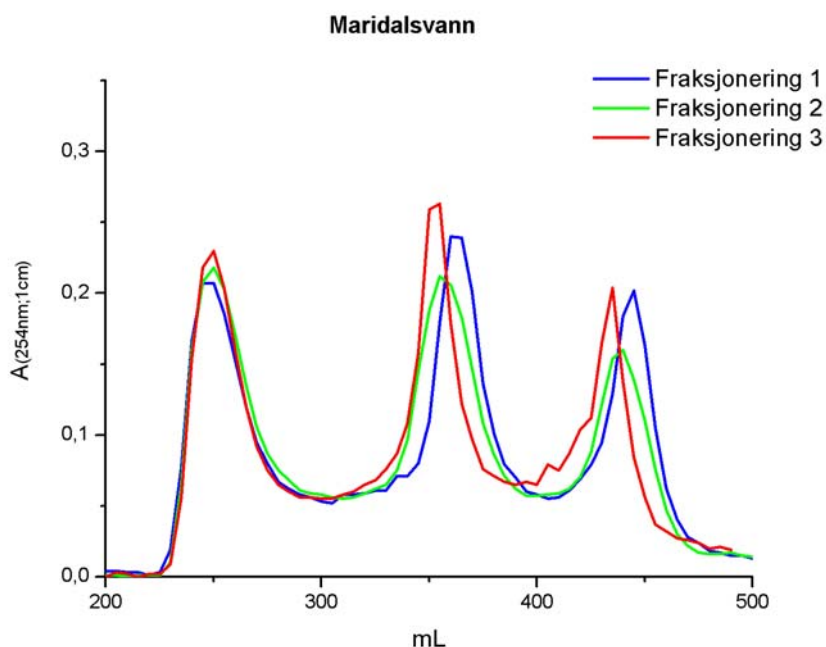
Som det framgår av figur 4.3, hemmer konservering utviklingen i separasjonen i betydelig grad. At utviklingsprosessen ikke helt ble stoppet, kan skyldes at kloroformdosen som ble brukt, kan ha vært for liten (se del 3.2). Resultater fra dette eksperimentet tyder på at effekten av mikrobiell nedbrytning av kolonnematerialet spiller en rolle for å få fraksjonert DNOM på en tilfredsstillende måte.

Til tross for at Sephadex anvendes mye til fraksjonering av blandinger av løst organisk materiale, deriblant også i stor grad humus, er dette ikke tidligere beskrevet i litteraturen.

4.2 DNOM-fraksjonering

• Reproduserbarhet

Hvert isolat ble fraksjonert minst to ganger, over kort tid, på Sephadex G-25-materialet. Materialet har ligget i vann uten konserveringsmiddel i 6 måneder. Et eksempel på reproduserbarheten er vist i figur 4.4 (data finnes i appendiks C). Data for resten av prøvene finnes i appendiks A.



Figur 4.4: Kromatogrammer av Maridalsvann-isolatet, som viser reproduserbarhet, kjørt på Sephadex G-25. Kurvene representerer UV-abs.

Arealet, A_{real} , under hver topp for hver av fraksjoningene for fire isolater, er vist i tabell 4.2. Reproduserbarheten er angitt som standard avvik (σ) mellom flere replikater av samme prøve, kjørt på forskjellige dager, over kort tid (se tabell 4.2). Resultatene som er presentert i tabell 4.2 viser et relativt høyt standard avvik, delvis kan dette forklares med at Sephadex G-25 er i stadig utvikling (se del 4.1).

Topp 1 er definert som en ekskludert fraksjon, topp 2 er middels fraksjon og topp 3 er benevnt som retardert fraksjon.

Tabell 4.2: A_{real} under hver topp; gjennomsnittsareal og standard avvik, σ , basert på tre målinger. DOC representerer gjennomsnittsverdien av DOC for hver topp i fraksjonen, for hvert isolat, basert på en måling. Arealene ble beregnet ved hjelp av programmet Origin.

Maridalsvann	Fraksjone- ring 1	Fraksjone- ring 2	Fraksjone- ring 3	Gjennomsnitts- areal $\pm \sigma$	DOC mg C L ⁻¹
A_{real} for topp 1	5,6	6,9	5,9	6,1 \pm 0,7	2,5
A_{real} for topp 2	6,8	8,9	7,1	7,6 \pm 1,1	2,9
A_{real} for topp 3	4,6	5,1	5,3	5,0 \pm 0,4	3,7

Aurevann	Fraksjone- ring 1	Fraksjone- ring 2	Fraksjone- ring 3	Gjennomsnitts- areal $\pm \sigma$	DOC mg C L ⁻¹
A_{real} for topp 1	12,6	14,2	11,3	12,7 \pm 1,5	4,1
A_{real} for topp 2	14,4	15,4	19,1	16,3 \pm 2,4	3,6
A_{real} for topp 3	5,5	5,0	4,7	5,1 \pm 0,4	1,6

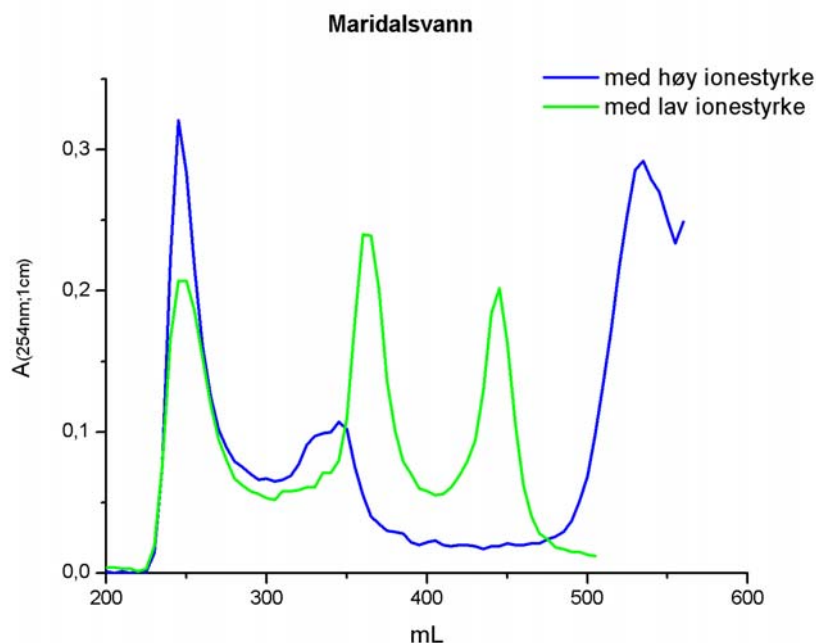
Humex B	Fraksjone- ring 1	Fraksjone- ring 2	Fraksjone- ring 3	Gjennomsnitts- areal $\pm \sigma$	DOC mg C L ⁻¹
A_{real} for topp 1	10,2	8,1	-	9,2 \pm 1,1	6,5
A_{real} for topp 2	13,5	11,4	-	12,5 \pm 1,1	2,1
A_{real} for topp 3	7,1	7,3	-	7,2 \pm 0,1	2,3

Hellerudmyra	Fraksjone- ring 1	Fraksjone- ring 2	Fraksjone- ring 3	Gjennomsnitts- areal $\pm \sigma$	DOC mg C L ⁻¹
A_{real} for topp 1	15,0	13,5	14,9	14,5 \pm 0,8	8,0
A_{real} for topp 2	14,7	15,4	13,6	14,6 \pm 0,9	5,4
A_{real} for topp 3	2,1	5,2	2,1	3,1 \pm 1,8	3,3

- **Faktorer som påvirker fraksjoneringen**

Parametere som ionestyrke, pH og konsentrasjon av DNOM i prøven påvirker fraksjoneringen (se bl.a. Baalousha, 2006). For å kunne sammenligne DNOM fra ulike steder er det derfor viktig at disse parametrene er så like som mulig i prøvene når de fraksjoneres. For eksempel vil økning i humuskonsentrasjonen gi økning i retardert fraksjon (De Nobili et al., 1989, med referanser).

Det ble utført et eksperiment som hadde til hensikt å vise i hvilken grad ionestyrken påvirker fraksjoneringsmønsteret. En prøve av Maridalsvann-isolatet justert til høy ionestyrke med NaNO_3 (1,8 M) ble kjørt på kolonnen. Kurven i figur 4.5 (data finnes i appendiks C) viser helt entydig at et høyt saltinnhold i prøven endrer fraksjoneringsmønsteret totalt. Nitrat absorberer også stråling ved λ 254 nm. Ved høy konsentrasjoner av NO_3^- ($> 6,5 \cdot 10^{-4}$ M) er denne absorpsjonen signifikant (Weishaar et al., 2003). Siden nitrat må betraktes som et lavmolekylært molekyl vil den holdes tilbake i kolonnen og elueres ut sammen med eller etter retardert fraksjon. Det vil si at den store toppen etter 500 mL på den blå kurven er sannsynligvis NO_3^- topp.



Figur 4.5: Kromatogrammer av Maridalsvann-isolatet kjørt på Sephadex G-25. Kurvene representerer UV-abs. Kurvene viser fraksjoneringsmønstre for isolatet, med høy ionestyrke ($> 19,99$ mS/m justert med NaNO_3 , blå kurve) og lav (grønn kurve).

Det er tidligere påvist at fraksjoneringsmønsteret til DNOM-prøver på Sephadex G-25 i mindre grad er avhengig av pH hvis pH ligger mellom 4 og 7 (Gjessing, 1971). Løsningene som ble valgt i dette arbeidet ligger i dette pH-området, og alle prøvene har omtrent samme ionestyrke. Derfor skulle det være mulig å sammenligne disse fraksjoneringsmønstrene for å påvise relative ulikheter mellom isolatene. Imidlertid bør det her nevnes at det for tiden foregår en diskusjon på forskningsfronten om i hvilken grad små forskjeller i bl.a. silikainnhold og borat i prøven kan endre egenskapene til DNOM ved oppkonsentrering og spesielt frysetørring, slik det ble gjort ved tillagning av RO (Vogt, 2006).

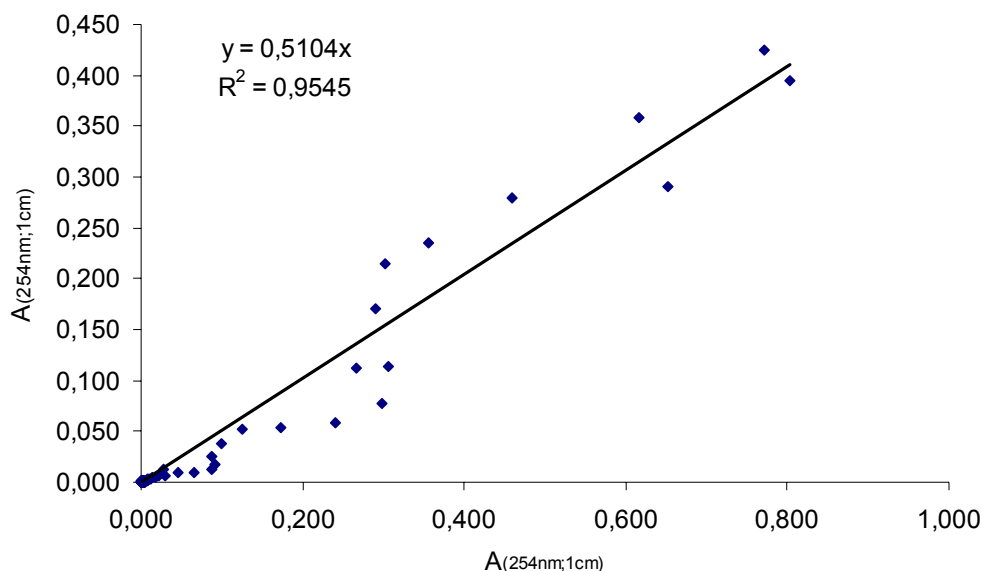
- **Konsentrasjonseffekt**

I dette arbeidet ble det anvendt mer konsentrerte løsninger av DNOM ($0,350 \text{ g C L}^{-1}$) enn det som forekommer naturlig. Dystrofe innsjøer som har den høyeste konsentrasjonen av DNOM, kan ha en DOC på 50 mg C L^{-1} , mens gjennomsnittskonsentrasjonen ligger på 3-5 mg C L^{-1} i de fleste innsjøer. Den høye konsentrasjonen brukt i våre forsøk, vil påvirke fysiske og kjemiske egenskaper til DNOM (Christiansen, 2004). Aggregering og utfelling av spesielt den høymolekylære hydrofobe fraksjonen kan finne sted under slike forhold. I tillegg kan filtrerte løsninger inneholde en større grad av hydrofile molekyler enn ufiltrerte løsninger (Christiansen, 2004). Dette resulterer i at materialet muligens fremstår som mer lavmolekylært enn det opprinnelige materialet.

Grunnen til at vi allikevel valgte å bruke så sterkt konsentrerte løsninger, var først og fremst for å sørge for at konsentrasjonene av DOC i delprøvene var over deteksjonsgrensen for TOC-instrumentet slik at en kunne registrere vesentlige endringer i DOC-målingene og dessuten for å kunne regne ut sUVA (spesifikk UV absorpsjon, $A_{254\text{nm};1 \text{ cm DOC}^{-1}}$).

Det ble utført et eksperiment som gikk ut på at prøven med Hellerudmyra-isolatet ble fortynnet, slik at konsentrasjonen ble redusert til det halve. Denne prøven, som inneholdt $0,175 \text{ g C L}^{-1}$, ble fraksjonert på Sephadex G-25-kolonnen. Forholdet mellom fraksjoneringsmønstrene av denne fortynnende prøven og en vanlig prøve av Hellerudmyra-isolatet ($0,350 \text{ g C L}^{-1}$) ble undersøkt ved hjelp av lineær regresjonsanalyse.

Dette ble gjort for å undersøke om konsentrasjonen av DNOM i Hellerudmyra-isolatet hadde noen innflytelse på separasjonsmønsteret. Som det framgår av figur 4.6 (data finnes i appendiks C) er den lineære regresjonskoeffisienten (R^2) 0,9545.



Figur 4.6: Lineær regresjonskurve av UV-abs for fortynnet prøve ($0,175 \text{ g C L}^{-1}$) mot UV-abs for vanlig prøve ($0,350 \text{ g C L}^{-1}$) av Aurevann-isolatet.

Resultatet fra figur 4.6 viser at fraksjoneringsdataene fra de to prøvene ligger i et lineært område (selv om punktene er noe spredt rundt den lineære linjen). Det betyr at ingen konsentrasjonseffekter på fraksjoneringsmønsteret av Hellerudmyra-isolatet kan påvises. Dette kan igjen enten tyde på at DNOM-materialet ikke i vesentlig grad ble påvirket av konsentrasjonen, eller at konsentrasjonseffekten på DNOM-materialet ikke ble borte med fortynningen.

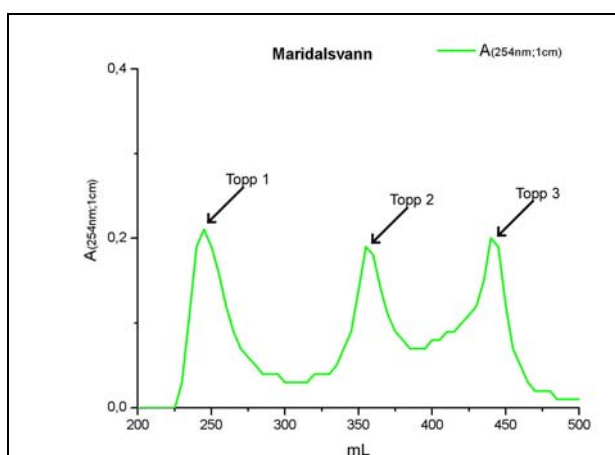
Andre studier av konsentrasjonseffekter på humus-fraksjoneringsmønstre på Sephadex-gel G-100 (Aho & Lehto, 1984) konkluderer imidlertid med at konsentrasjonsfaktoren påvirker humussammensetningen. Resultater fra disse studiene viste forskjellige fraksjoneringsmønstre for oppkonsentrerte humusprøver og ikke-oppkonsentrerte humusprøver. Etter å ha fortynnet oppkonsentrerte prøver tilbake til opprinnelig konsentrasjon, ble det derimot ikke observert noen forskjell i fraksjoneringsmønstre av de fortynnende og de ikke-oppkonsentrerte prøvene. Dette konkluderte med at

konsentrasjonseffekten på humusmaterialet ble borte med fortyningen.

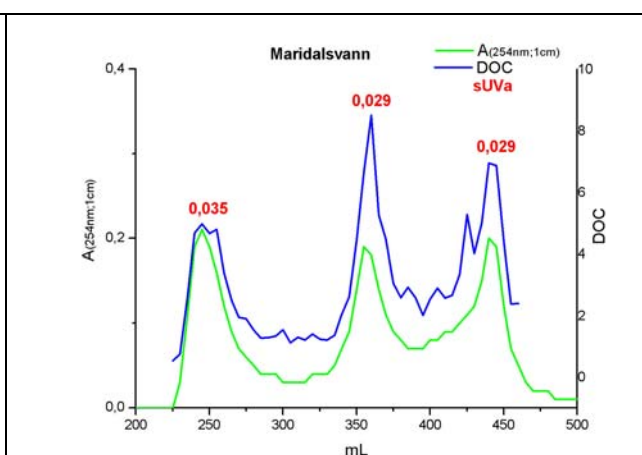
Siden det ble brukt enda mer konsentrerte løsninger i dette arbeidet enn i Aho og Lehto sitt, gjør dette det vanskelig å trekke konklusjoner om hvordan og i hvor stor grad konsentrasjonseffekter påvirker humusfraksjoneringsmønstret.

- **Forskjeller og likheter mellom de ulike DNOM isolatene**

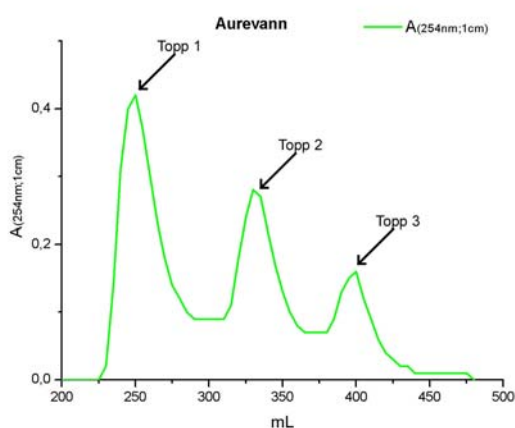
Resultatene fra fraksjonering av fire isolater på Sephadex G-25, som er lagret i vann i 6-7 måneder, og eluert med destillert vann som mobilfase, er presentert i figurene 4.7 (a, b), 4.8 (a, b), 4.9 (a, b) og 4.10 (a, b), data finnes i appendiks C, og i tabellene 4.2 og 4.3 Både UV-abs ($A_{254\text{nm};1\text{ cm}}$) og DOC ble målt. sUVa ble så regnet ut for hver topp i fraksjoneringen.



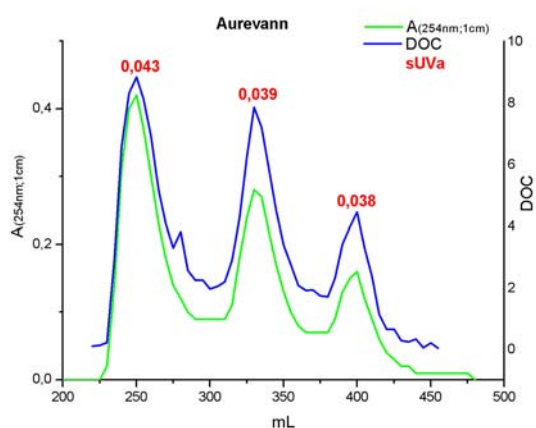
Figur 4.7(a): Kromatogram av Maridalsvann-isolatet, kjørt på Sephadex G-25. Kurven representerer UV-abs. Topp 1 representerer ekskludert fraksjon, topp 2 er middels- molekylær fraksjon og topp 3 retardert fraksjon.



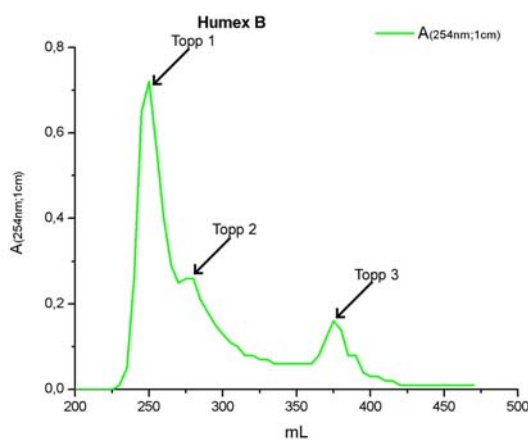
Figur 4.7(b): Kromatogrammer av Maridalsvann-isolatet. Kurvene viser $A_{254\text{nm};1\text{ cm}}$ og DOC. sUVa som er angitt over hvert topp er $A_{254\text{nm};1\text{ cm}}/\text{DOC}$



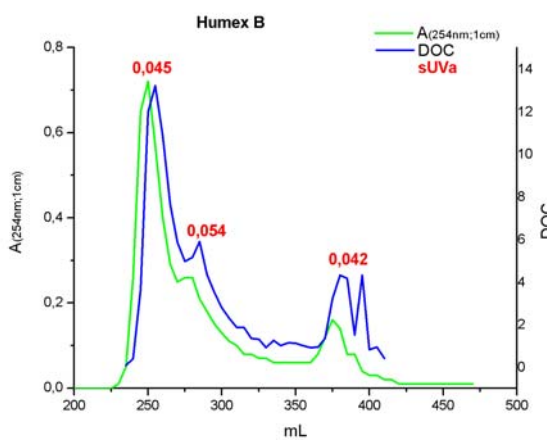
Figur 4.8(a): Kromatogram av Aurevann-isolatet, kjørt på Sephadex G-25. Kurven representerer UV-abs. Topp 1 representerer ekskludert fraksjon, topp 2 er middels- molekylær fraksjon og topp 3 retardert fraksjon.



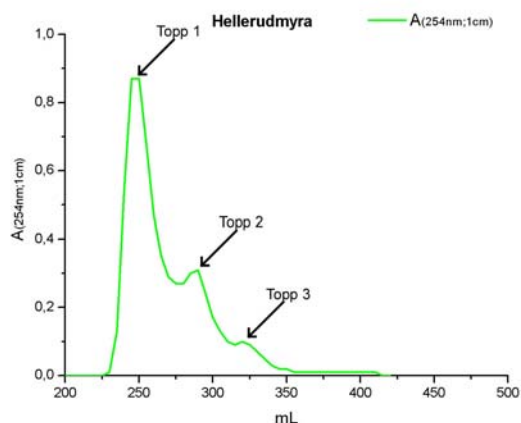
Figur 4.8(b): Kromatogrammer av Aurevann-isolatet. Kurvene viser $A_{254nm;1cm}$ og DOC. $sUVa$ som er angitt over hvert topp er $A_{254nm;1cm}/DOC$



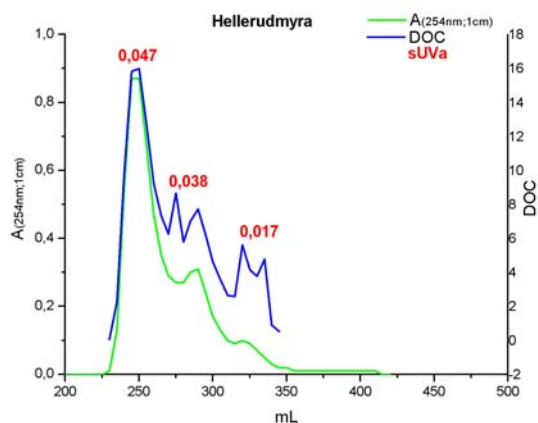
Figur 4.9(a): Kromatogram av Humex B-isolatet, kjørt på Sephadex G-25. Kurven representerer UV-abs. Topp 1 representerer ekskludert fraksjon, topp 2 er middels- molekylær fraksjon og topp 3 retardert fraksjon.



Figur 4.9(b): Kromatogrammer av Humex B-isolatet. Kurvene viser $A_{254nm;1cm}$ og DOC. $sUVa$ som er angitt over hvert topp er $A_{254nm;1cm}/DOC$



Figur 4.10(a): Kromatogram av Hellerudmyra-isolatet, kjørt på Sephadex G-25. Kurven representerer UV-abs. Topp 1 representerer ekskludert fraksjon, topp 2 er middels- molekylær fraksjon og topp 3 retardert fraksjon.



Figur 4.10(b): Kromatogrammer av Hellerudmyra-isolatet. Kurvene viser $A_{254nm;1\text{ cm}}$ og DOC. sUVA som er angitt over hvert topp er $A_{254nm;1\text{ cm}}/DOC$

Som det fremgår av figurene 4.7 og 4.8 ble Maridalsvann- og Aurevann-isolatene fraksjonert i tre godt separerte fraksjoner. I følge gel-kromatografiteorien må ekskludert fraksjon (topp 1) være mer høymolekylær enn middels fraksjon (topp 2), og middels fraksjon igjen mer høymolekylær enn retardert fraksjon (topp 3). Siden vi her bruker rent vann som mobilfase, er det mulig at ladningen på Sephadex, som kan skyldes karboksylgrupper, kan føre til at separasjonen også i stor grad skyldes ladningsekklusjon (Perminova, 1999). Da vil DNOM i den første toppen ha større ladningstetthet enn de påfølgende toppene.

Det faktum at Humex B og Hellerudmyra i hovedsak resulterte i en markert ekskludert topp stemmer godt overens med teorien om at fraksjoneringen skyldes forskjeller i molekylstørrelse. Disse isolatene er mer aromatiske og har høyere molekylærstørrelser enn DNOM fra Maridalsvann og Aurevann, se tabell 3.1. Dette stemmer også bra med sUVA, som ble beregnet for hvert isolat. sUVA, som bl.a. er et estimat på grad av aromatisitet, er høyere i disse materialene enn i materialene fra Maridalsvann og Aurevann (se tabell 4.3 og figurer 4.7(b)- 4.10 (b)). DNOM fra Humex B- og Hellerudmyra-isolatene er ferskere enn DNOM fra Aurevann- og Maridalsvann-isolatene [dvs. har hatt

kortere oppholdstid i vannfasen] (Gjessing et al., 1999). Fersk DNOM er vanligvis mer høymolekylær og mer aromatisk (se bl.a. Thurman, 1985). Mikrobiell nedbrytning, lys (photobleaching), adsorpsjon på partikler og sedimentasjon medfører reduksjon spesielt i den høymolekylære fraksjonen av DNOM.

Saltinnholds sammensetningen varierer også noe mellom isolatene (se tabellene 3.1 og 3.2 i del 3.1), selv om de har omtrent samme ionestyrke. Dette er noe som også kan bidra til at det framkommer ulike fraksjoneringsmønstre, selv om det organiske materialet skulle være likt. Som nevnt ovenfor er det spesielt bekymring for mulige effekter av forskjeller i innholdet av silikater og borater.

Det ser ut som om DOC-kurven (den blå kurven) i figurene 4.7 (b) til 4.10 (b) følger med UV-abs-kurven (den grønne kurven) på alle isolatene. Imidlertid er forholdet mellom UV-abs og DOC ikke konstant. Den UV-spesifikke absorbansen, sUVa, synes å være noe avtagende for de fleste prøvene (unntaket er Humex B-isolatet) gjennom fraksjoneringen (se tabell 4.3 og figurer 4.7(b)- 4.10 (b)). Dette er i overensstemmelse med teorien om at sUVa blant annet øker med økning i aromatisitet og økning i molekylvekt (se del 2.2, UV-absorpsjon).

Forhold som også er viktig å nevne, er at effekten av karboksylsyregrupper i Sephadex-materialet kommer tydelig fram når destillert vann brukes som mobilfase. Disse gruppene kan bidra til at fraksjoneringen av DNOM ikke bare skjer etter molekylstørrelse, men også etter ladningsforhold (Perminova, 1999). Det er nettopp for å minimalisere slike effekter at salt- og bufferløsninger ofte brukes som mobilfase (Jackson et al., 1980; Town & Powell, 1992; O'Driscoll & Evans, 2000). Sammenheng mellom den oppnådde fraksjoneringen med Sephadex G-25 og ladningstettheten er imidlertid mindre klar. Ifølge data i Gjessing et al. varierer ladningstettheten i RO-isolatene med følgende sekvens: HEM<HUM~AUR<<MAR (upubliserte data, NOM-Typing-prosjekt). Det at sUVa ble observert avtagende i dette arbeidet, styrker imidlertid teorien om at DNOM-fraksjoneringen i større grad skjer etter molekylstørrelse enn etter ladningsforhold. Det er derfor rimelig å anta at fraksjoneringen som foregår i kolonnen er mer et resultat av forskjeller i molekylstørrelse enn en ladningseffekt.

I tabell 4.3, se nedenfor, er sUVa presentert som gjennomsnittsverdien av sUVa for hver topp i fraksjoneringen for fire isolater, basert på en måling. Som det framgår av tabell 4.3 er sUVa avtagende gjennom fraksjoneringen for de tre isolatene, unntatt Humex B-isolatet.

Tabell 4.3: sUVa ($A_{254\text{nm};1\text{ cm}}/\text{DOC}$) i tabellene representerer gjennomsnittsverdien av sUVa for hver topp i fraksjoneringen, basert på en måling.

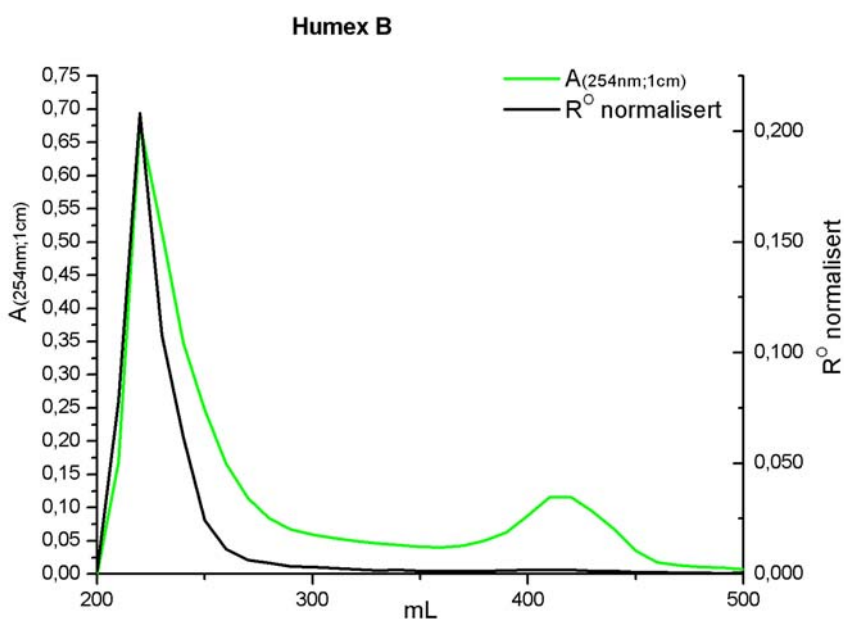
Maridalsvann	sUVa ($\text{Acm}^{-1} \text{mgC}^{-1}$)	Humex B	sUVa ($\text{Acm}^{-1} \text{mgC}^{-1}$)
Topp 1	0,035	Topp 1	0,045
Topp 2	0,029	Topp 2	0,054
Topp 3	0,029	Topp 3	0,042

Aurevann	sUVa ($\text{Acm}^{-1} \text{mgC}^{-1}$)	Hellerudmyra	sUVa ($\text{Acm}^{-1} \text{mgC}^{-1}$)
Topp 1	0,043	Topp 1	0,047
Topp 2	0,039	Topp 2	0,038
Topp 3	0,038	Topp 3	0,017

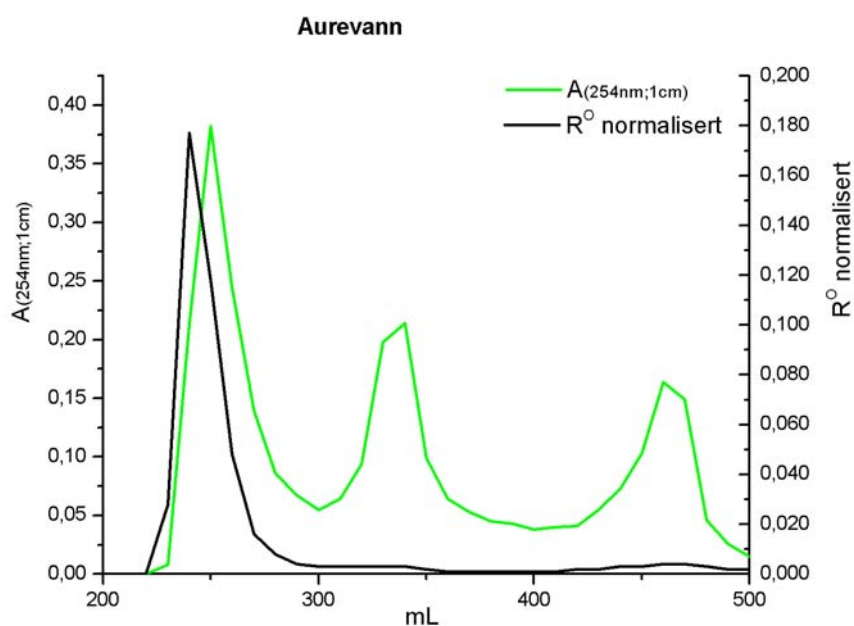
4.3 Hg-eksperiment

DNOM fra Humex B, Aurevann og Maridalsvann (løsningene ble laget som beskrevet i del 3.6) ble tilsatt Hg og fraksjonert på kolonnen. Figurene 4.11, 4.12 og 4.13 (data i appendiks D) viser kromatogrammene av fraksjonering fra hhv. Humex -, Aurevann og Maridalsvann. Hellerudmyra-isolatet er ikke presentert her. I den perioden disse forsøkene med Hg ble foretatt, hadde kolonnematerialet (Sephadex™ G-25 medium) stått i vann i ca. 12 måneder. UV-absorpsjon ($A_{254\text{nm};1\text{ cm}}$) ble målt i hver fraksjon. Aktiviteten i prøven før fraksjonering ($R^0_{i\text{ prøve}}$) og i hver fraksjon ble målt ($R^0_{i\text{ fraksjon}}$). "R⁰ normalisert", presentert i figurene, er forholdet mellom aktiviteten i hver fraksjon og aktiviteten i prøven før fraksjonering ($R^0_{i\text{ fraksjon}}/R^0_{i\text{ prøve}}$). Maridalsvann-isolatet (figur 4.13) ble kjørt på "konservert Sephadex G-25" (dvs. gel som var konservert med kloroform). Siden gel-materialet ikke fikk utviklet seg videre, pga. konserveringen, er dette fraksjoneringsmønstrer for dette isolatet en del annerledes sammenlignet med det i figur 4.7. Fraksjonering av Humex B-

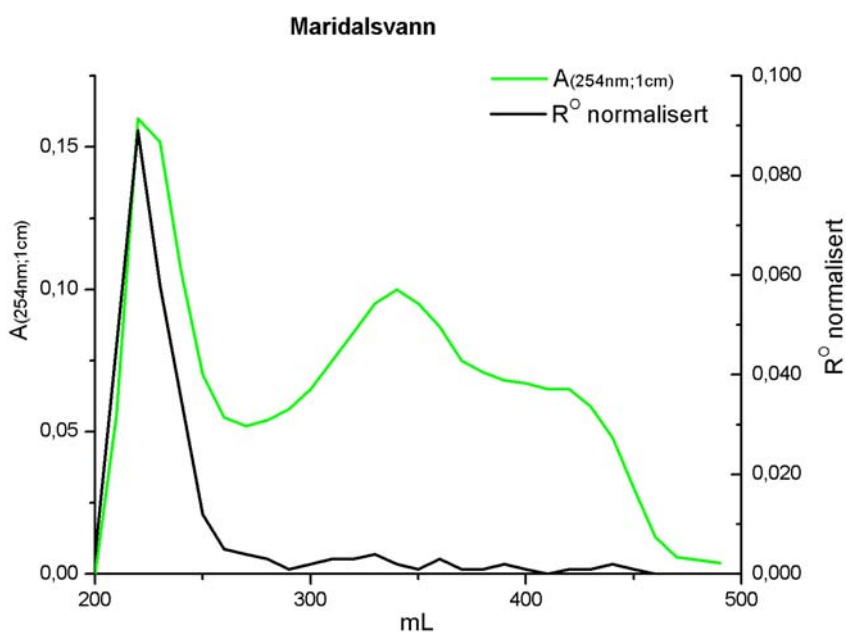
isolatet med Hg (se figur 4.11) resulterte i noe dårligere separasjon sammenlignet med den i figur 4.9. Selv om Sephadex-materialet hadde stått i vann i en lengre periode (12 måneder sammenlignet med 6 måneder, se del 4.2) hadde ikke dette resultert i noen bedre separasjon av Humex B-isolatet. Årsaken til dette er ukjent. En "blindprøve", dvs. prøve med Hg uten DNOM, ble også kjørt gjennom kolonnen (beskrevet i del 3.6) og resultatet av "blankeksperimentet" er framstilt på figur 4.14 (data i appendiks D).



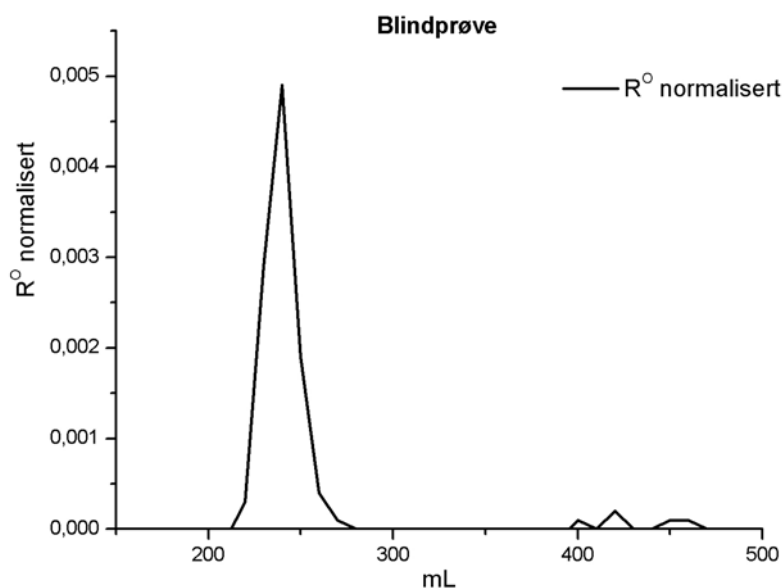
Figur 4.11: Kromatogram av Humex B-isolatet tilsatt Hg. Den svarte linjen representerer normalisert aktivitet ($R^0_{i \text{ fraksjon}} / R^0_{i \text{ prøve}}$) i hver fraksjon. Grønn kurve representerer UV-abs. Prøven som ble kjørt gjennom kolonnen var på 3 mL og inneholdt: DNOM ($0,35 \text{ g C L}^{-1}$); $^{197}\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$; 1 mL HgCl_2 ($600 \mu\text{g L}^{-1}$) ved $\text{pH} = 6 - 7$.



Figur 4.12: Kromatogram av Aurevann-isolatet tilsatt Hg. Den svarte linjen representerer normalisert aktivitet ($R^0_{i \text{ fraksjon}} / R^0_{i \text{ prøve}}$) i hver fraksjon. Grønn kurve representerer UV-abs. Prøven som ble kjørt gjennom kolonnen var på 3 mL og inneholdt: DNOM ($0,35 \text{ g C L}^{-1}$); $^{197}\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$; 1 mL HgCl_2 ($600 \mu\text{g L}^{-1}$) ved $\text{pH} = 6 - 7$.

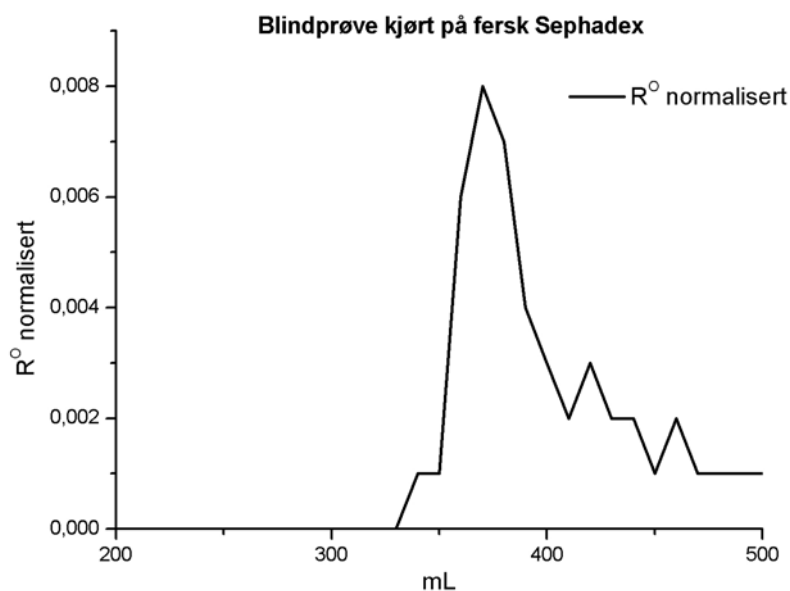


Figur 4.13: Kromatogram av Maridalsvann-isolatet tilsatt Hg. Den svarte linjen representerer normalisert aktivitet ($R^{\circ}_{i \text{ fraksjon}} / R^{\circ}_{i \text{ prøve}}$) i hver fraksjon. Grønn kurve representerer UV-abs. Prøven som ble kjørt gjennom kolonnen var på 3 mL og inneholdt: DNOM ($0,35 \text{ g C L}^{-1}$); $^{197}\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$; 1 mL HgCl_2 ($600 \mu\text{g L}^{-1}$) ved $\text{pH} = 6$



Figur 4.14: Kromatogram av blindprøve. Den svarte linjen representerer normalisert aktivitet ($R^{\circ}_{i \text{ fraksjon}} / R^{\circ}_{i \text{ prøve}}$) i hver fraksjon. Prøven som ble kjørt gjennom kolonnen var på 3 mL og inneholdt: $^{197}\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$; 2 mL HgCl_2 (70 mg L^{-1}); $\text{pH} = 6 - 7$.

Resultatene illustrert på figurene 4.11 til 4.13 viser at ^{197}Hg (R^0 -linje) kommer ut av kolonnen sammen med ekskludert fraksjon (topp 1) og at ^{197}Hg i "blankekspérimentet" (figur 4.14) kommer ut av kolonnen på samme sted hvor ekskludert fraksjon pleier å komme. Dette var et uventet resultat. Med et slikt utfall er det vanskelig å diskutere om Hg er blitt assosiert med DNOM eller ikke. Resultatet strider mot grunnleggende teorier innen gel-kromatografi, at små molekyler kommer ut av kolonnen sist. Derfor ble fraksjoneringen av "blindprøven" gjentatt på en helt fersk Sephadex G-25. (dvs. en Sephadex-kolonne som bare har svullet i vann 3 døgn) Resultatet er vist i figur 4.15.



Figur 4.15: Kromatogram av blindprøve på en "helt fersk Sephadex-gel G-25. Den svarte linjen representerer normalisert aktivitet ($R^0_{i\text{ fraksjon}}/R^0_{i\text{ prøve}}$) i hver fraksjon. Prøven som ble kjørt gjennom kolonnen var på 3 mL og inneholdt: $^{197}\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$; 2 mL HgCl_2 (70 mg L^{-1}); $\text{pH} = 6 - 7$.

Fraksjoneringen på ferskt gel-materiale ga et kromatogram som var mer som forventet. ^{197}Hg ble retardert av kolonnematerialet og ble eluert ut av kolonnen senere enn i forrige forsøket. Likevel er også dette for tidlig. ^{197}Hg skulle normalt kommet ut av kolonnen rundt 500 mL, dvs. etter prøven.

Ettersom Hg lett adsorberes til overflater (Krata & Bulska, 2005) var tap av ^{197}Hg i kolonnen et potensielt problem. Adsorpsjon av ^{197}Hg på kolonnen ble derfor beregnet ved at aktiviteten i hver prøve rett før fraksjonering ble sammenlignet med summen av aktivitetene i dens fraksjoner. Forskjellen vil derved være mengden av ^{197}Hg som ble adsorbent (usikkerheten i beregningene av adsorpsjonen var mindre enn 2%). Resultater fra disse utregningene (data i appendiks D) viste at ^{197}Hg ble adsorbent i vesentlig større grad på kolonnen når det ble kjørt uten DNOM. Adsorpsjon av ^{197}Hg var hele 99% for blindprøve (se figur 4.14) og 95% for blind prøve kjørt på fersk Sephadex (se figur 4.15). Med andre ord ^{197}Hg uten DNOM ble praktisk talt fullstendig adsorbent på kolonnen. Det er uklart hvorfor adsorpsjon ble noe redusert på "fersk Sephadex".

Adsorpsjon av ^{197}Hg til Sephadex var for Humex B-, Aurevann- og Maridalsvann-isolatene var henholdsvis 46%, 54% og 73%. Denne betraktelig reduksjon i adsorpsjon av ^{197}Hg når det er DNOM i løsningen illustrerer DNOMs rolle som transportør av Hg i miljøet. Variasjoner i adsorpsjonen av ^{197}Hg til kolonnen burde reflektere variasjoner i isolatenes evne til å binde ^{197}Hg . Det er derfor noe uventet at den største forskjellen i adsorpsjon av ^{197}Hg til kolonnen var for Aurevann- og Maridalsvann-isolatene (54% og 73%). Disse isolatene er mer like seg imellom enn Humex B-isolatet (se del 4.2).

Hg, som ikke er bundet til organisk materiale, opptrer ikke bare som frie aqvo-ioner av Hg^{2+} (ønsket form), men også i form av HgOH^+ , $\text{Hg}(\text{OH})_2$, HgOHCl og HgCl_2 (Powell et al., 2004). Ifølge likevektsberegninger er $\text{Hg}(\text{OH})_2$ den dominerende uorganiske formen av Hg i våre løsninger ved gjeldende pH (6-7) og konsentrasjon av andre ligander (spesielt Cl^-). Det er derfor mulig at $\text{Hg}(\text{OH})_2$ danner hydroksokolloider i løsningene. Disse kan danne svært store molekyler som kan være langt større enn DNOM-molekylene. Dette kan være noe av forklaringen på at 1% og 5% av ^{197}Hg i "blankekperimentet" (for henholdsvis gammel og fersk Sephadex) forelå i hydroksokolloider og på den måten kom tidlig ut av kolonnen.

- **Hg-binding til DNOM:**

Det er vanskelig å diskutere resultatene fra DNOM-Hg-fraksjonering for de tre isolatene på grunn av resultatene fra "blankekperimentene". Det er også vanskelig å trekke noen

konklusjon om hvilken fraksjon av DNOM som Hg er blitt assosiert til. Observert reduksjon i adsorpsjon av ^{197}Hg på kolonnen i DNOM-Hg-prøvene trenger ikke nødvendigvis bare skyldes vekselvirkninger med DNOM.

Vi har sannsynligvis en blanding av både DNOM-assosiert Hg og uorganisk Hg i våre målte fraksjoner. Gamma-spektroskopi kan imidlertid ikke påvise dette. I utgangspunktet ble det forventet at Hg skulle bli fullstendig bundet til det organiske materialet. Det kan være flere forklaringer på at Hg ikke ble fullstendig assosiert med DNOM:

- Ett døgn reageringstid kan være for lite.
- I mer konsentrerte DNOM-løsninger kan DNOM-materialet ha blitt modifisert, slik at færre bindingssettere er tilgjengelige for Hg^{2+} . For eksempel observerte Linnik (2003) at da DNOM-konsentrasjonen i elva «Dnieper» var på det høyeste, var bindingen av Cu^{2+} til DNOM minimal (Linnik, 2003).
- Forholdet mellom Hg^{2+} og DNOM er lavt i våre prøver. Ved lav metallkonsentrasjon i forhold til DNOM-konsentrasjon, skjer interaksjonen mellom DNOM og metall langsomt og øker med en økning i metallkonsentrasjonen (Linnik, 2003).
- Dannelse av kolloidalpartikler i Hg-løsningene. Denne synes å være den mest sannsynlige forklaringen på hvorfor Hg oppførte seg som en høymolekylær fraksjon gjennom kolonnen. Jacksons (1980) observerte også at en topp av ^{203}Hg kom ut av kolonnen i det høymolekylære området (fraksjoneringen ble utført på Sephadex G-25) og forklarte dette nettopp med dannelse av kolloidalpartikler i løsningene. De Haan og hans medarbeidere (1990) fraksjonerte $^{55}\text{Fe}^{3+}$ -”spiked” DNOM på Sephadex G-100, og rapporterte at $^{55}\text{Fe}^{3+}$ oppførte seg som en høymolekylær fraksjon gjennom kolonnen når ikke DNOM ble tilsatt. De konkluderte også dette med dannelse av kolloidalpartikler i $^{55}\text{Fe}^{3+}$ -løsningen.

DEL 5

**KONKLUSJON OG
FORSLAG TIL
VIDERE ARBEID**

5.1 Konklusjon

- Gel-kromatografi med *Sephadex™ G-25 medium* kolonnemateriale og vann som mobilfase har vist seg å kunne fraksjonere DNOM i flere klare fraksjoner. Derfor egner metoden seg godt for bruk til preparativ fraksjonering av DNOM. Metoden påviste forskjeller mellom isolatene som reflekterer forskjeller i molekylstørrelse, bestemt med andre metoder. Metoden gir dermed også mulighet for størrelseskarakterisering av DNOM fra ulike steder. Det er imidlertid viktig med mer forskning på dette området, siden fraksjoneringsmønsteret til DNOM forandrer seg over tid. Årsaken til slike endringer kan være mikrobiell nedbrytning av gel-materialet. Det må her tilføyes at disse endringene i fraksjoneringsegenskaper ikke er påvist tidligere og at dette kan tyde på at fabrikasjonen av Sephadex G-25 er endret i løpet av de siste 10 - 15 årene.
- Hg-eksperimentet slik det ble utført i dette arbeidet, ga ikke forventet resultat. Fraksjonering av en blanding av DNOM og kvikksølvløsning viste at kvikksølvspesiene kom ut av kolonnen sammen med den ekskluderte fraksjonen. Imidlertid resulterte en fraksjonering av en løsning med kun kvikksølv i det samme elueringsmønsteret. Det kan tenkes at vi har en blanding av både assosiert og organiske kvikksølvspesier i ekskluderte (eller mer den høymolekylære) fraksjonen. Men gamma-spektroskopi kan ikke påvise dette. Det kan være følgende årsaker til at kvikksølvet ikke ble assosiert med DNOM:
 - Ett døgnreageringstid kan være for lite pga. lav Hg^{2+} -konsentrasjon. Ved lave metallkonsentrasjoner skjer interaksjon mellom DNOM og metall antagelig langsommere.
 - Dannelse av kolloidalpartikler av $\text{Hg}_x(\text{OH})_{2x}$ i løsningene. Denne siste forklaringen synes å være den mest sannsynlige. Kvikksølv i løsningen oppførte seg i disse forsøkene som en høymolekylær fraksjon ved eluering gjennom kolonnen.

5.2 Forslag til videre arbeid

Det er ingen tvil om at bruk av Sephadex virker lovende for å fraksjonere DNOM inn i klare fraksjoner. Videre forskning er imidlertid nødvendig på dette feltet. Framfor alt må egenskapene til kolonnematerialet undersøkes grundigere (andre typer av Sephadex bør også inkluderes i undersøkelsen), bl.a.:

- Hva som skjer med materialet over tid (en henvendelse til "gammel" (Pharmacia) og "ny" produsent om mulige årsaker, ville kunne være formålstjenlig).
- Hva slags effekt endringer i Sephadex-materialet har på selve separasjonen av DNOM.

For å undersøke muligheten av at endringene i fraksjoneringssevne skyldes reduksjon i antallet karboksylgrupper på materialet over tid, vil dette enkelt kunne påvises ved å alkalinitetstitrere ferskt og lagret materiale.

Endringer i graden av tverrbindinger vil kunne studeres ved å fraksjonere et sett med uladete forbindelser med kjent og vel definert romlig størrelse over tid.

I den sammenheng kunne det være nyttig å gjennomføre mer detaljerte studier av de ulike DNOM-fraksjonene. For eksempel å kombinere flere analysemetoder for å skaffe mer informasjon om strukturelle forskjeller mellom fraksjonene.

I studier av assosiasjonsforholdet mellom Hg^{2+} og DNOM anbefales det å bruke en radioaktiv isotop av kvikksølv med lengre halveringstid enn det ble brukt her. For å unngå problemer med mulig sorpsjon til kolonnematerialet, kan en eventuelt i stedet tilsette Hg^{2+} direkte til fraksjonene etter at de har blitt separert av kolonnen. En kan så måle hvor gode de forskjellige fraksjonene er til å kompleksbinde Hg^{2+} ved å fjerne uorganisk Hg^{2+} vha. et kationbytte. Eventuelt kan en også evaluere biotilgjengelighet av DNOM- Hg^{2+} -komplekser i hver fraksjon.

Referanser

Aho, J. og Lehto, O., (1984) Effect of ionic strength on elution of aquatic humus in gel filtration chromatography. Arch. Hydrobiol. 101, 21-38.

AMAP, (2002) Arctic Pollution 2002 (Persistent Organic Pollutants, Heavy Metals, Radioactivity, Human Health, Changing Pathways). Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo. Tilgjengelig fra: <http://www.amap.no>, lest 12.05.2006

Amirbahman, A., Reid, A. L., Haines, T. A., Kahl, J. S. og Arnold, C., (2002) Association of Methylmercury with Dissolved Humic Acids. Environ. Sci. Technol. 36, 690-695.

Becher, G., Ovrum, N. M. og Christman, R. F., (1992) Novel chlorination by-products of aquatic humic substances. Sci. Total Environ. 117/118, 509-520.

Bjørnstad, T., Hills, A. E., Palige, J., Khan, I. H. og Joon-Ha, J., (2004) Radiotracers and Labelled Compounds for Applications in Industry and Environment. IAEA Report, Department of Nuclear Science and Applications (IAEA). Institute for Energy Technology (IFE), Postboks 40 N-2027, Kjeller.

Brown, G. K., MacCarthy, P. og Leenheer, J. A., (1999) Simultaneous determination of Ca, Cu, Ni, Zn and Cd binding strengths with fulvic acid fractions by Schubert's method. Anal. Chim. Acta 402, 169-181.

Baalousha, M., Motelica-Heino, M. og Le Coustumer, P., (2006) Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. Colloids Surf. A: 272, 48-55.

Christiansen, M., (2004) The effect of dissolved organic carbon (DOC) concentration and storage on the physio-chemical properties of dissolved natural organic matter (DNOM). Universitetet i Oslo

- Crum, R. H., Murphy, E. M. og Keller, C. K., (1996) A non-adsorptive method for the isolation and fractionation of natural dissolved organic carbon. *Water Res.* 30, 1304-1311.
- De Haan, H., Jones, R. I. og Salonen, K., (1990) Abiotic transformations of iron and phosphate in humic lake water revealed by double-isotope labeling and gel filtration. *Limnol. Oceanogr.* 35, 491-497.
- De Nobili, M. og Chen, Y., (1999) Size exclusion chromatography of humic substances: limits, perspectives and prospectives. *Soil Sci.* 164, 825-833.
- De Nobili, M., Gjessing, E. og Sequi, P., (1989) Sizes and shapes of Humic substances by gel chromatography. I: Hayes., M. H., MacCathry, P., Malcolm, R. L. and Swift, R. S. (eds). *Humic substances II. In search of structure.* Wiley, New York.
- Essington, M. E., (2004) *Soil and Water Chemistry: An integrative Approach.* CRC Press LLC, New York.
- Firestone, R. B. og Shirley, V. S. (eds), (1996) *Table of isotopes.* Wiley, New York.
- Gadmar, T. C., Vogt, R. D. og Østerhus, B., (2002) The merits of the high-temperature combustion method for determining the amount of natural organic carbon in surface freshwater samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82, 451-461.
- Gjessing, E. T., Egeberg, P. K. og Hakedal, J., (1999) Natural organic matter in drinking water. The NOM-typing project. Background and basic characteristics of original water samples and NOM isolates. *Environ. Int.* 25, 145-159.
- Gjessing, E. T. og Gudmundson, R. Å. K. , (1982) Solubility of metallic mercury in water containing humus. *Vatten* 38, 406-408.

- Gjessing, E. T., (1981) Water treatment considerations - aquatic humus. Des. Water Wastewater Serv. Cold Clim. Communities, Proc. Post-Conf. Semin., 95-101.
- Gjessing, E. T., (1976) Physical and Chemical Characteristics of Aquatic Humus. Ann Arbor Science Publishers Inc., Michigan.
- Gjessing, E. T., (1971) Effect of pH on the Filtration of Aquatic Humus using Gels and Membranes. Schweiz. Z. Hydrol. 33, 592-600.
- Greibrokk, T., Lundanes, E. og Rasmussen, K. E., (1994) Kromatografi. Universitetsforlaget, Oslo.
- Halse, A. K., (2006) Analyse og evaluering av kvikksølvinnhold i jord i nedbørfelt i skogområder. Masteroppgave ved Kjemisk institut. Universitetet i Oslo
- Han, S. og Gill, G. A., (2005) Determination of mercury complexation in coastal and estuarine waters using competitive ligand exchange method. Environ. Sci. Technol. 39, 6607-6615.
- Hintelmann, H., Welbourn, P. M. og Evans, R. D., (1997) Measurement of Complexation of Methylmercury(II) Compounds by Freshwater Humic Substances Using Equilibrium Dialysis. Environ. Sci. Technol. 31, 489-495.
- Isidorov, V. A., (1999) Introduksjon i kjemisk økotoksikologi (på Russisk). Kjemiforlaget, St. Petersburg.
- ISO, (1999) Water Quality - Guidelines for the Determination of Total Organic Carbon (TOC) and Dissolved Organic Carbon (DOC). International Organisation for Standardization (ISO), ISO 8245.

- Itabashi, H., Kamata, Y., Kawaguchi, D. og Kawamoto, H., (2003) Evaluation of the copper(II) complexing ability of ultrafiltered humic acid by the solvent extraction method. *Anal. Sci.* 19, 1277-1280.
- Jackson, T. A., Kipphut, G., Hesslein, R. H. og Schindler, D. W., (1980) Experimental study of trace metal chemistry in soft-water lakes at different pH levels. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 387-402.
- Kawahigashi, M., Sumida, H. og Yamamoto, K., (2005) Size and shape of soil humic acids estimated by viscosity and molecular weight. *J. Colloid Interface Sci.* 284, 463-469.
- Kennedy, M. D., Chun, H. K., Yangali, V. A. Q., Heijman, B. G. J. og Schippers, J. C., (2005) Natural organic matter (NOM) fouling of ultrafiltration membranes: Fractionation of NOM in surface water and characterization by LC-OCD. *Desalination* 178, 73-83.
- Knoll, G. F., (1999) *Radiation Detection and Measurement*. Wiley, New York.
- Krata, A og Bulska, E, (2005) Critical evaluation of analytical performance of atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry for mercury determination. *Spectrochim. Acta* 60, 345-350.
- Langhals, H., Abbt-Braun, G. og Frimmel, F. H., (2000) Association of humic substances: Verification of Lambert-Beer Law. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 28, 329-332.
- Lead, J. R., Balnois, E., Hosse, M., Menghetti, R. og Wilkinson, K. J., (1999) Characterization of Norwegian natural organic matter. Size, diffusion coefficients and electrophoretic mobilities. *Environ. Int.* 25, 245-258.
- Leenheer, J. A., (1981) *Comprehensive Approach to Preparative Isolation and Fractionation of Dissolved Organic Carbon from Natural Waters and Wastewaters*. *Environ. Sci. Technol.* 15, 578-587.

- Li, C. W. og Chen, Y. S., (2004) Fouling of UF membrane by humic substance: Effects of molecular weight and powder-activated carbon (PAC) pre-treatment. *Desalination* 170, 59-67.
- Lieser, K. H., (2001) *Nuclear and Radiochemistry: Fundamentals and Applications*. WILEY-VCH, Weinheim.
- Linnik, P. N., (2003) Complexation as the most important factor in the fate and transport of heavy metals in the Dnieper water bodies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 405-412.
- Lydersen, E., Fjeld, E. og Gjessing, E. T., (1996) The Humic Lake Acidification Experiment (HUMEX): Main physicochemical results after five years of artificial acidification. *Environ. Int.* 22, 591-604.
- Mattilsynet, (2004). Tilgjengelig fra: <http://www.mattilsynet.no>, lest 03.08.2006
- Meili, M., Iverfeldt, A. og Haakanson, L., (1991) Mercury in the surface water of Swedish forest lakes - concentrations, speciation and controlling factors. *Water, Air Soil Pollut.* 56, 439-453.
- MSC-E, (2006) Tilgjengelig fra: <http://www.msceast.org/countries/Norway/index.html#hmdep>, lest 12.09.2006
- Naganuma, A., Oda, N. og Imura, N., (1985) Rapid method for removal of inorganic mercury contained in methylmercury preparation using CM-Sephadex minicolumn. *Ind. Health* 23, 71-73.
- Navrátil, O., Hála, J., Kopunec, R, Macášek, F., Mikulaj, V. og Lešetický, L., (1992) *Nuclear Chemistry*. Ellis Horwood Limited, Chichester.

- NIVA, (2003) Kvikksølv i ferskvannsfisk fra Sør-Norge i 1998 - 2002, nivåer og tidsmessig utvikling. Rapport 893/03, Norsk institutt for vannforskning (NIVA), Oslo. Tilgjengelig fra: <http://www.sft.no/publikasjoner/overvaking/2000/ta2000.pdf>, lest 04.03.2006
- O'Driscoll, N. J. og Evans, R. D., (2000) Analysis of Methyl Mercury Binding to Freshwater Humic and Fulvic Acids by Gel Permeation Chromatography/Hydride Generation ICP-MS. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4039-4043.
- O'Driscoll, N. J., (1998) Analysis of methyl mercury bound to size fractions of fulvic acids by sephadex gel permeation chromatography-total mercury hydride/ICP-MS. *EnviroAnalysis, Proceedings of the Biennial International Conference on Chemical Measurement and Monitoring of the Environment*, Ottawa, 627-632.
- Perdue, E. M. og Ritchie, J. D., (2004) Dissolved organic matter in freshwaters. I: Drever, J. I. (eds). *Surface and ground water, weathering and soils*. Elsevier, Amsterdam.
- Perdue, M. og Gjessing, E. T., (1990) Organic acids in aquatic ecosystems: Report of the Dahlem workshop on Organic Acids in Aquatic Ecosystems. Wiley, Berlin.
- Perminova, I. V., (1999) Size exclusion chromatography of humic substances: Complexities of data interpretation attributable to non-size exclusion effect. *Soil Sci.* 164, 834-840.
- Peuravuori, J., Pihlaja, K., Trubetskaya, O. og Trubetskoj, O., (2001) The effects of a strong disaggregating agent on SEC-PAGE of aquatic and soil humic matter. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 79, 217-228.
- Powell, K. J., Brown, P. L., Byrne, R. H., Gajda, T., Hefter, G., Sjoeborg, S. og Wanner, H., (2004) Chemical speciation of Hg(II) with environmental inorganic ligands. *Aust. J. Chem.* 57, 993-1000.

- Purenovic, M., Andelkovic, T., Andelkovic, D., Perovic, J., Ilic, Lj og Ursic-Jankovic, J., (2000) The study of interaction between soil humic acid and cadmium by gel permeable chromatography. Physical Chemistry 2000, Proceedings of the International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Beograd, 602-604.
- Ravichandran, M., (2004) Interactions between mercury and dissolved organic matter - a review. Chemosphere 55, 319-331.
- Schlüter, K., (1997) Sorption of inorganic mercury and monomethyl mercury in an iron-humus podzol soil of southern Norway studied by batch experiments. Environ. Geol. 30, 266-279.
- Schwerer, O., (2006) Experimental Nuclear Reaction Data (EXFOR/CSISRS) National Nuclear Data Center (NNDC). Tilgjengelig fra: <http://www3.nndc.bnl.gov>, lest 10.05.2006
- Sedlacek, J., Gjessing, E. og Rambaek, J. P., (1987) Isotope exchange between inorganic iron and iron naturally complexed by aquatic humus. Sci. Total Environ. 62, 275-279.
- Shaw, P. J., De Haan, H. og Jones, R. I., (1994) Applicability and reliability of gel filtration to study aquatic humic substances revisited; the effects of pH on molecular size distributions. Environ. Technol., 15, 753-764.
- Sheils, M. A., Acevedo, J., Cai, Y., Jaffe, R., Lu, X. og Jones, R. D., (2001) Interactions of mercury species with dissolved organic carbon and sulfur in surface waters of the Florida Everglades. Abstracts of Papers, 221st ACS National Meeting, San Diego.
- Shimadzu, (2000) Instruction manual TOC-5000A total organic carbon analyser model. Shimadzu corporation, Tokyo

- Shimadzu, (1992) Instruction manual UV-1201 spectrophotometer. Shimadzu corporation, Tokyo
- Skjelkvåle, B. L., Andersen, T., Halvorsen, G. A., Raddum, G. G., Heegaard, E., Stoddard, J. og Wright, R., (2000) The 12-yers report: Acidification of Surface waters in Europe and North America; trends biological recovery and heavy metals. ICP-Waters report 52/2000.
- Steinnes, E., Berg, T. og Sjobakk, T. E., (2003) Temporal and spatial trends in Hg deposition monitored by moss analysis. Sci. Total Environ. 304, 215-219.
- Stevenson, F., (1994) Humus chemistry: genesis, composition, reactions. Wiley, New York.
- Thurman, E. M., (1985) Organic Geochemistry of Natural Waters. Martinius Nijhoff/Dr. W. Junk, Dordrecht.
- Town, R. M. og Powell, H. K. J., (1992) Elimination of adsorption effects in gel permeation chromatography of humic substances. Anal. Chim. Acta 256, 81-86.
- UNEP, (2002) Global Mercury Assessment. United Nations Environment Programme, Geneve. Tilgjengelig fra: <http://www.unep.org>, lest 01.03.2006
- Vogt, R. D.; (2006) Personlig kommunikasjon. Universitet i Oslo, Postboks1033 Blindern, Oslo
- Vogt, R. D., Andersen, D. O., Bishop, K., Clarke, N., Gadmar, T., Gjessing, E., Lundstrøm, U. og Starr, M., (2001) Natural organic matter in the Nordic Countries (NOMiNiC): 1. TOC intercalibration 2. Physico-chemical characteristics of DOM. Report 479. NordTest, Espo. Tilgjengelig fra: <http://www.nordicinnovation.net/nordtestfiler/tec479>, lest 13.09.2006

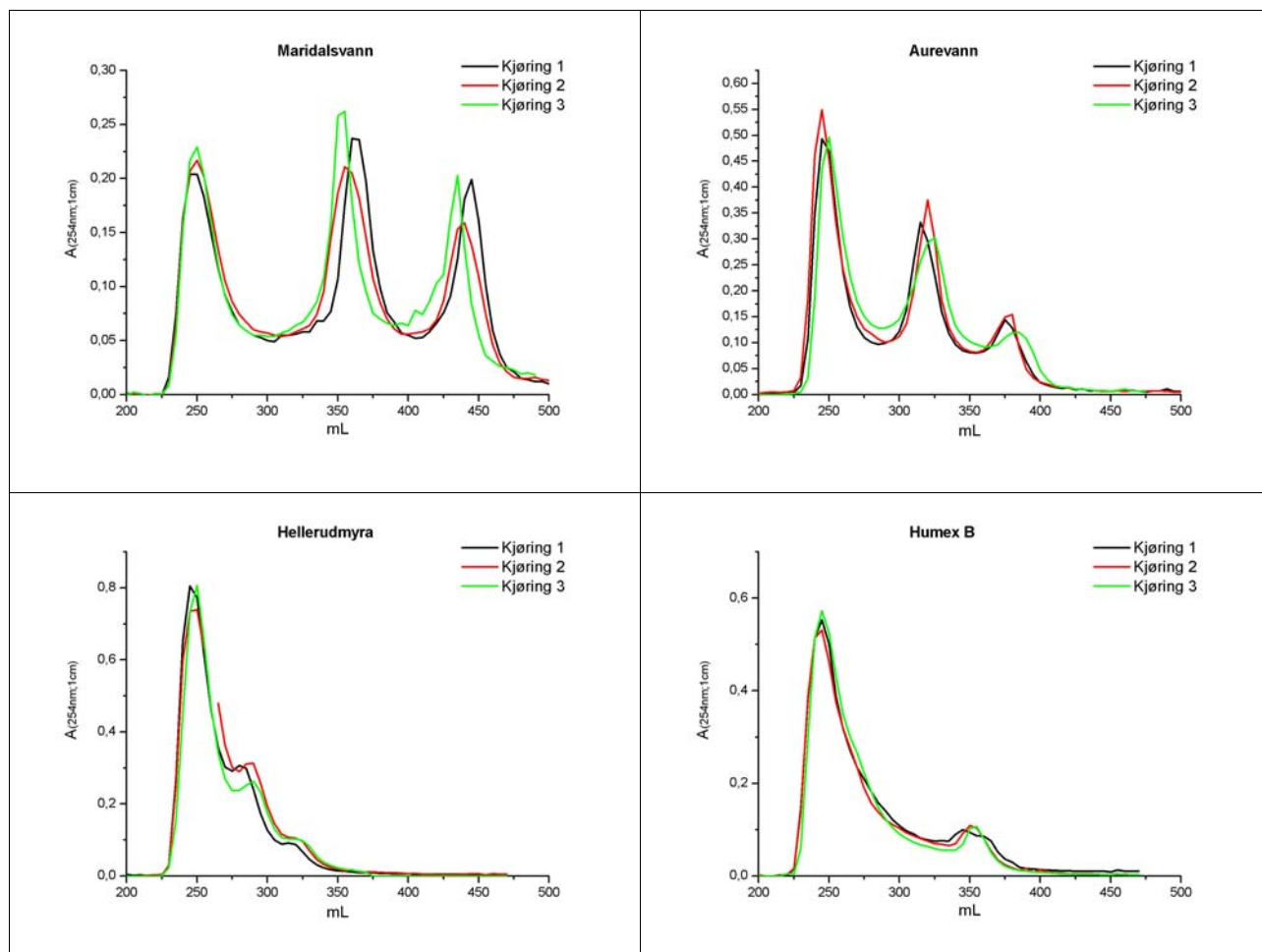
- Wang, Y., Suzuki, A., Tanaka, T., Kumura, H. og Shimazaki, K., (2004) Partial characterization of dextran-degrading enzyme obtained from blue cheese. *Journal of Dairy Science* 87, 1627-1633.
- Weishaar, J. L., Aiken, G. R., Bergamaschi, B. A., Fram, M. S., Fujii, R. og Mopper, K., (2003) Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4702-4708.
- Wiker, M., (2006) Analyse og evaluering av kvikksølvinnhold i biomasse i nedbørfelt i skogsområder. Masteroppgave ved Kjemisk institutt. Universitetet i Oslo
- Wu, F., Cai, Y., Evans, D. og Dillon, P., (2004) Complexation between Hg(II) and dissolved organic matter in stream waters: an application of fluorescence spectroscopy. *Biogeochemistry* 71, 339-351.

APPENDIKS

Appendiks A Reproduserbarhet	74
<i>Tabell A: Data for UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$) målingene, gjennomsnittsverdi for hver måling og standard avvik, σ.....</i>	<i>75</i>
Appendiks B Data for kurvene i del 4.1 Sephadex´ egenskaper	83
<i>Tabell B: Data for UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$) til figurene 4.1, 4.2 og 4.3.....</i>	<i>83</i>
Appendiks C Data for kurvene i del 4.2 DNOM-fraksjonering	85
<i>Tabell C: Data for UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$), til figurene 4.4, 4.5, 4.6 og UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$), DOC og sUVa til figurene 4.7, 4.8, 4.9, 4.10.....</i>	<i>85</i>
Appendiks D Data for kurvene i del 4.3 Hg eksperiment	93
<i>Tabell D-1: Data for UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$), R^0 og R^0 normalisert til figurene 4.11, 4.12, 4.13 og R^0, R^0 normalisert til figurene 4.14 og 4.15</i>	<i>93</i>
<i>Tabell D-2: Hg adsorpsjon gjennom kolonnen med og uten DNOM-løsninger</i>	<i>96</i>
Appendiks E Produksjon av ^{197}Hg på syklotronen.....	97
Appendiks F Abstrakt til International Humic Substances Society (IHSS) XIII.....	98

Appendiks A

Reproduserbarhet



Figur A: Reproduserbarhet for alle isolatene. Kurvene representerer UV-abs. Dataene til Maridalsvann-, Aurevann- og Hellerudmyra-isolatene er hentet fra kjøring (over kort tid) på 6 mnd. "gammel Sephadex", mens Humex B-isolatet er hentet fra kjøring (over kort tid) på 3 mnd. "gammel Sephadex". Alle prøvene ble kjørt på ukonservert kolonne. Kolonneparametre: 98 cm lang, indre diameter er 2,9 cm, 646,9 ml volum, mobil fase – Type 1-vann.

Tabell A: Data for UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$)-målingene, gjennomsnittsverdi for hver måling og standard avvik, σ .

Maridalsvann-isolat					
mL	Kjøring 1	Kjøring 2	Kjøring 3	Gjennomsnittsverdi	$\pm\sigma$
125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
135	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
140	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
145	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
155	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
160	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
165	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
170	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
175	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
185	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
190	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
195	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
205	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
210	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
215	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
220	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
225	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
230	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00
235	0,07	0,06	0,06	0,06	0,01
240	0,16	0,16	0,15	0,16	0,01
245	0,20	0,21	0,22	0,21	0,01
250	0,20	0,22	0,23	0,22	0,01
255	0,18	0,20	0,20	0,20	0,01
260	0,15	0,17	0,16	0,16	0,01
265	0,12	0,13	0,12	0,12	0,01
270	0,09	0,11	0,09	0,10	0,01
275	0,08	0,09	0,07	0,08	0,01
280	0,06	0,07	0,06	0,07	0,01
285	0,06	0,07	0,06	0,06	0,00
290	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00
295	0,05	0,06	0,06	0,06	0,00
300	0,05	0,06	0,05	0,05	0,00
305	0,05	0,06	0,05	0,05	0,00
310	0,06	0,05	0,06	0,06	0,00
315	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00
320	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00
325	0,06	0,06	0,07	0,06	0,00
330	0,06	0,06	0,08	0,07	0,01
335	0,07	0,07	0,09	0,08	0,01
340	0,07	0,10	0,11	0,09	0,02
345	0,08	0,14	0,16	0,13	0,04
350	0,11	0,19	0,26	0,18	0,08
355	0,18	0,21	0,26	0,22	0,04
360	0,24	0,21	0,18	0,21	0,03

Maridalsvann-isolat forts.					
mL	Kjøring 1	Kjøring 2	Kjøring 3	Gjennomsnittsverdi	$\pm\sigma$
365	0,24	0,18	0,12	0,18	0,06
370	0,20	0,15	0,10	0,15	0,05
375	0,13	0,11	0,08	0,11	0,03
380	0,10	0,09	0,07	0,08	0,01
385	0,08	0,07	0,07	0,07	0,01
390	0,07	0,06	0,06	0,06	0,00
395	0,06	0,06	0,07	0,06	0,01
400	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00
405	0,05	0,06	0,08	0,06	0,01
410	0,05	0,06	0,07	0,06	0,01
415	0,06	0,06	0,09	0,07	0,02
420	0,07	0,07	0,10	0,08	0,02
425	0,08	0,09	0,11	0,09	0,02
430	0,09	0,12	0,16	0,12	0,04
435	0,13	0,15	0,20	0,16	0,04
440	0,18	0,16	0,14	0,16	0,02
445	0,20	0,14	0,08	0,14	0,06
450	0,16	0,11	0,06	0,11	0,05
455	0,10	0,08	0,04	0,07	0,03
460	0,06	0,05	0,03	0,05	0,01
465	0,04	0,03	0,03	0,03	0,01
470	0,03	0,02	0,03	0,02	0,00
475	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
480	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
485	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00
490	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00
495	0,01	0,01	-	0,01	0,00
500	0,01	0,01	-	0,01	0,00
505	0,01	0,01	-	0,01	0,00

Aurevann-isolat					
mL	Kjøring 1	Kjøring 2	Kjøring 3	Gjennomsnittsverdi	$\pm\sigma$
125	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
135	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
140	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
145	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
155	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
160	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
165	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
170	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
175	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
185	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
190	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
195	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
205	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
210	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
215	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
220	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
225	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
230	0,02	0,03	0,01	0,02	0,01
235	0,11	0,19	0,03	0,11	0,08
240	0,35	0,46	0,19	0,33	0,14
245	0,49	0,55	0,44	0,49	0,06
250	0,47	0,45	0,50	0,47	0,02
255	0,35	0,33	0,41	0,36	0,04
260	0,24	0,24	0,30	0,26	0,04
265	0,17	0,19	0,23	0,19	0,03
270	0,13	0,15	0,18	0,15	0,02
275	0,11	0,13	0,15	0,13	0,02
280	0,10	0,12	0,14	0,12	0,02
285	0,10	0,11	0,13	0,11	0,02
290	0,10	0,10	0,13	0,11	0,02
295	0,11	0,10	0,13	0,11	0,02
300	0,12	0,11	0,15	0,13	0,02
305	0,16	0,14	0,17	0,16	0,02
310	0,26	0,20	0,21	0,22	0,03
315	0,33	0,29	0,26	0,29	0,04
320	0,30	0,38	0,29	0,32	0,05
325	0,23	0,30	0,30	0,28	0,04
330	0,16	0,18	0,24	0,20	0,04
335	0,12	0,13	0,17	0,14	0,03
340	0,10	0,10	0,13	0,11	0,02
345	0,09	0,09	0,11	0,10	0,01
350	0,08	0,08	0,10	0,09	0,01
355	0,08	0,08	0,10	0,09	0,01
360	0,08	0,09	0,09	0,09	0,00
365	0,09	0,10	0,09	0,10	0,01
370	0,12	0,13	0,10	0,11	0,02
375	0,14	0,15	0,11	0,13	0,02
380	0,13	0,15	0,12	0,13	0,02

Aurevann isolat-forts.					
mL	Kjøring 1	Kjøring 2	Kjøring 3	Gjennomsnittsverdi	$\pm\sigma$
385	0,10	0,09	0,12	0,10	0,02
390	0,06	0,05	0,11	0,07	0,03
395	0,04	0,03	0,08	0,05	0,03
400	0,02	0,02	0,05	0,03	0,01
405	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01
410	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00
415	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
420	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
425	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
430	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
435	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
440	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
445	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
450	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
455	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
460	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
465	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
470	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
475	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
480	0,01	0,01	-	0,01	0,00
485	0,01	0,01	-	0,01	0,00
490	0,01	0,01	-	0,01	0,00
495	0,01	0,01	-	0,01	0,00
500	0,01	0,01	-	0,01	0,00
505	0,01	0,01	-	0,01	0,00

Hellerudmyra-isolat					
mL	Kjøring 1	Kjøring 2	Kjøring 3	Gjennomsnittsverdi	$\pm\sigma$
125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
135	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
140	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
145	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
155	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
160	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
165	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
170	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
175	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
185	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
190	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
195	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
205	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
210	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
215	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
220	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
225	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
230	0,03	0,03	0,02	0,03	0,00
235	0,27	0,25	0,15	0,22	0,06
240	0,65	0,60	0,45	0,57	0,11
245	0,81	0,74	0,73	0,76	0,04
250	0,77	0,74	0,81	0,77	0,03
255	0,62	0,63	0,66	0,63	0,02
260	0,46	-	0,47	0,47	0,47
265	0,36	0,48	0,34	0,39	0,08
270	0,30	0,36	0,27	0,31	0,05
275	0,29	0,30	0,24	0,28	0,03
280	0,31	0,29	0,24	0,28	0,04
285	0,30	0,31	0,25	0,29	0,03
290	0,24	0,31	0,26	0,27	0,04
295	0,17	0,26	0,23	0,22	0,04
300	0,13	0,19	0,18	0,17	0,03
305	0,10	0,15	0,13	0,13	0,02
310	0,09	0,12	0,11	0,10	0,01
315	0,09	0,11	0,10	0,10	0,01
320	0,09	0,11	0,10	0,10	0,01
325	0,07	0,10	0,10	0,09	0,02
330	0,05	0,07	0,08	0,07	0,02
335	0,03	0,05	0,05	0,04	0,01
340	0,02	0,03	0,04	0,03	0,01
345	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01
350	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00
355	0,01	0,01	0,02	0,02	0,00
360	0,01	0,02	0,02	0,01	0,00
365	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
370	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
375	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
380	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01

Hellerudmyra-isolat forts.					
mL	Kjøring 1	Kjøring 2	Kjøring 3	Gjennomsnittsverdi	$\pm\sigma$
385	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
390	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
395	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
400	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
405	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
410	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
415	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
420	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
425	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
430	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
435	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
440	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
445	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
450	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
455	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
460	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
465	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
470	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00

Humex B-isolat					
mL	Kjøring 1	Kjøring 2	Kjøring 3	Gjennomsnittsverdi	$\pm\sigma$
125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
135	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
140	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
145	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
155	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
160	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
165	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
170	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
175	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
185	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
190	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
195	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
205	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
210	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
215	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
220	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
225	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
230	0,15	0,14	0,06	0,11	0,05
235	0,38	0,39	0,30	0,36	0,05
240	0,51	0,51	0,51	0,51	0,00
245	0,55	0,53	0,57	0,55	0,02
250	0,50	0,46	0,53	0,50	0,03
255	0,39	0,38	0,43	0,40	0,03
260	0,32	0,32	0,35	0,33	0,02
265	0,27	0,28	0,30	0,28	0,02
270	0,24	0,24	0,27	0,25	0,02
275	0,21	0,19	0,22	0,21	0,02
280	0,18	0,16	0,18	0,17	0,01
285	0,16	0,14	0,15	0,15	0,01
290	0,14	0,12	0,12	0,13	0,01
295	0,12	0,11	0,11	0,11	0,01
300	0,11	0,10	0,09	0,10	0,01
305	0,10	0,09	0,08	0,09	0,01
310	0,09	0,09	0,07	0,08	0,01
315	0,08	0,08	0,07	0,08	0,01
320	0,08	0,08	0,06	0,07	0,01
325	0,08	0,07	0,06	0,07	0,01
330	0,08	0,07	0,06	0,07	0,01
335	0,08	0,07	0,06	0,07	0,01
340	0,09	0,07	0,06	0,07	0,02
345	0,10	0,09	0,07	0,09	0,02
350	0,09	0,11	0,10	0,10	0,01
355	0,09	0,10	0,11	0,10	0,01
360	0,09	0,08	0,08	0,08	0,00
365	0,08	0,05	0,05	0,06	0,01
370	0,05	0,04	0,03	0,04	0,01
375	0,04	0,02	0,02	0,03	0,01
380	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01

Humex B-isolat forts.					
mL	Kjøring 1	Kjøring 2	Kjøring 3	Gjennomsnittsverdi	$\pm\sigma$
385	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00
390	0,02	0,02	0,01	0,01	0,00
395	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00
400	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
405	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
410	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
415	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
420	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
425	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
430	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
435	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
440	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
445	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
450	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
455	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
460	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
465	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
470	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00

Appendiks B

Data for kurvene i del 4.1 Sephadex´ egenskaper

Tabell B: Data for UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$) til figurene 4.1, 4.2 og 4.3

Aurevann-isolat (figur 4.1)	
mL	UV-abs
125	-
130	0,00
135	0,00
140	0,00
145	0,00
150	0,00
155	0,00
160	0,00
165	0,00
170	0,00
175	0,00
180	0,00
185	0,00
190	0,00
195	0,00
200	0,00
205	0,00
210	0,00
215	0,00
220	0,00
225	0,00
230	0,03
235	0,19
240	0,57
245	0,73
250	0,66
255	0,54
260	0,44
265	0,38
270	0,36
275	0,35
280	0,34
285	0,31
290	0,28
295	0,25
300	0,23
305	0,18
310	0,14
315	0,10
320	0,08
325	0,07
330	0,06
335	0,06

Aurevann-isolat (figur 4.2)			
mL	Etter 3 døgn	Etter 3 uker	Etter 6 mnd.
125	0,00	0,00	0,00
130	0,00	0,00	0,00
135	0,00	0,00	0,00
140	0,00	0,00	0,00
145	0,00	0,00	0,00
150	0,00	0,00	0,00
155	0,00	0,00	0,00
160	0,00	0,00	0,00
165	0,00	0,00	0,00
170	0,00	0,00	0,00
175	0,00	0,00	0,00
180	0,00	0,00	0,00
185	0,00	0,00	0,00
190	0,00	0,00	0,00
195	0,00	0,00	0,00
200	0,00	0,00	0,00
205	0,00	0,00	0,00
210	0,00	0,00	0,00
215	0,00	0,00	0,00
220	0,00	0,03	0,00
225	0,00	0,20	0,00
230	0,03	0,51	0,02
235	0,19	0,63	0,13
240	0,57	0,57	0,43
245	0,73	0,45	0,57
250	0,66	0,32	0,51
255	0,54	0,23	0,37
260	0,44	0,18	0,26
265	0,38	0,15	0,19
270	0,36	0,14	0,14
275	0,35	0,15	0,12
280	0,34	0,16	0,10
285	0,31	0,19	0,09
290	0,28	0,23	0,09
295	0,25	0,30	0,08
300	0,23	0,36	0,08
305	0,18	0,32	0,08
310	0,14	0,23	0,09
315	0,10	0,18	0,10
320	0,08	0,15	0,12
325	0,07	0,13	0,18
330	0,06	0,12	0,27
335	0,06	0,11	0,34

Maridalsvann-isolat (figur 4.3)		
mL	Uten konserv.	Med konserv.
125	0,00	-
130	0,00	-
135	0,00	-
140	0,00	-
145	0,00	-
150	0,00	-
155	0,00	-
160	0,00	-
165	0,00	-
170	0,00	-
175	0,00	-
180	0,00	-
185	0,00	-
190	0,00	-
195	0,00	-
200	0,00	0,00
205	0,00	0,00
210	0,00	0,06
215	0,00	0,06
220	0,00	0,16
225	0,00	0,16
230	0,02	0,15
235	0,07	0,15
240	0,16	0,11
245	0,20	0,11
250	0,20	0,07
255	0,18	0,07
260	0,15	0,06
265	0,12	0,06
270	0,09	0,05
275	0,08	0,05
280	0,06	0,05
285	0,06	0,05
290	0,06	0,06
295	0,05	0,06
300	0,05	0,07
305	0,05	0,07
310	0,06	0,08
315	0,06	0,08
320	0,06	0,09
325	0,06	0,09
330	0,06	0,10
335	0,07	0,10

Aurevann-isolat forts.	
mL	UV-abs
340	0,06
345	0,05
350	0,04
355	0,04
360	0,04
365	0,03
370	0,03
375	0,02
380	0,02
385	0,01
390	0,01
395	0,01
400	0,01
405	0,01
410	0,01
415	0,01
420	0,01
425	0,01
430	0,01
435	0,01
440	0,01
445	0,01
450	0,01
455	0,01
460	0,01
465	0,01

Aurevann-isolat forts.			
mL	Etter 3 døgn	Etter 3 uker	Etter 6 mnd.
340	0,06	0,11	0,33
345	0,05	0,12	0,26
350	0,04	0,12	0,20
355	0,04	0,13	0,15
360	0,04	0,14	0,12
365	0,03	0,12	0,10
370	0,03	0,08	0,09
375	0,02	0,04	0,08
380	0,02	0,03	0,08
385	0,01	0,02	0,09
390	0,01	0,01	0,10
395	0,01	0,01	0,12
400	0,01	0,01	0,17
405	0,01	0,01	0,21
410	0,01	0,01	0,21
415	0,01	0,01	0,15
420	0,01	0,01	0,10
425	0,01	0,01	0,06
430	0,01	0,01	0,04
435	0,01	0,01	0,03
440	0,01	0,01	0,03
445	0,01	0,01	0,02
450	0,01	0,01	0,02
455	0,01	0,00	0,02
460	0,01	0,00	0,02
465	0,01	0,00	0,01
470	-	0,01	0,01

Maridalsvann-isolat forts.		
mL	Uten konserv.	Med konserv.
340	0,07	0,10
345	0,08	0,10
350	0,11	0,10
355	0,18	0,10
360	0,24	0,09
365	0,24	0,09
370	0,20	0,08
375	0,13	0,08
380	0,10	0,07
385	0,08	0,07
390	0,07	0,07
395	0,06	0,07
400	0,06	0,07
405	0,05	0,07
410	0,05	0,07
415	0,06	0,07
420	0,07	0,07
425	0,08	0,07
430	0,09	0,06
435	0,13	0,06
440	0,18	0,05
445	0,20	0,05
450	0,16	0,03
455	0,10	0,03
460	0,06	0,01
465	0,04	0,01
470	0,03	0,01
475	0,02	0,01
480	0,02	0,01
485	0,01	0,01
490	0,01	0,00
495	0,01	0,00
500	0,01	-
505	0,01	-

Appendiks C

Data for kurvene i del 4.2 DNOM-fraksjonering

Tabell C: Data for UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$), til figurene 4.4, 4.5, 4.6 og UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$), DOC og sUVa til figurene 4.7, 4.8, 4.9, 4.10

Maridalsvann-isolat (figur 4.4)			
mL	Fraksjonering 1	Fraksjonering 2	Fraksjonering 3
125	0,00	0,00	0,00
130	0,00	0,00	0,00
135	0,00	0,00	0,00
140	0,00	0,00	0,00
145	0,00	0,00	0,00
150	0,00	0,00	0,00
155	0,00	0,00	0,00
160	0,00	0,00	0,00
165	0,00	0,00	0,00
170	0,00	0,00	0,00
175	0,00	0,00	0,00
180	0,00	0,00	0,00
185	0,00	0,00	0,00
190	0,00	0,00	0,00
195	0,00	0,00	0,00
200	0,00	0,00	0,00
205	0,00	0,00	0,00
210	0,00	0,00	0,00
215	0,00	0,00	0,00
220	0,00	0,00	0,00
225	0,00	0,00	0,00
230	0,02	0,01	0,01
235	0,08	0,07	0,06
240	0,17	0,16	0,15
245	0,21	0,21	0,22
250	0,21	0,22	0,23
255	0,19	0,20	0,20
260	0,15	0,17	0,16
265	0,12	0,14	0,12
270	0,10	0,11	0,09
275	0,08	0,09	0,08
280	0,07	0,08	0,07
285	0,06	0,07	0,06
290	0,06	0,06	0,06
295	0,06	0,06	0,06
300	0,05	0,06	0,06
305	0,05	0,06	0,06
310	0,06	0,06	0,06
315	0,06	0,06	0,06
320	0,06	0,06	0,07
325	0,06	0,06	0,07
330	0,06	0,07	0,08
335	0,07	0,08	0,09
340	0,07	0,10	0,11

Maridalsvann-isolat forts.			
mL	Fraksjonering 1	Fraksjonering 2	Fraksjonering 3
345	0,08	0,15	0,16
350	0,11	0,19	0,26
355	0,18	0,21	0,26
360	0,24	0,21	0,18
365	0,24	0,18	0,12
370	0,20	0,15	0,10
375	0,14	0,11	0,08
380	0,10	0,09	0,07
385	0,08	0,07	0,07
390	0,07	0,06	0,07
395	0,06	0,06	0,07
400	0,06	0,06	0,07
405	0,06	0,06	0,08
410	0,06	0,06	0,08
415	0,06	0,06	0,09
420	0,07	0,07	0,10
425	0,08	0,09	0,11
430	0,09	0,12	0,16
435	0,13	0,15	0,20
440	0,18	0,16	0,14
445	0,20	0,14	0,08
450	0,16	0,11	0,06
455	0,11	0,08	0,04
460	0,06	0,05	0,03
465	0,04	0,03	0,03
470	0,03	0,02	0,03
475	0,02	0,02	0,02
480	0,02	0,02	0,02
485	0,02	0,02	0,02
490	0,02	0,02	0,02
495	0,02	0,02	-
500	0,01	0,01	-
505	0,01	0,01	-

Maridalsvann-isolat (figur 4.5)		
mL	med høy ionstyrke	med lav ionstyrke
125	0,00	0,00
130	0,00	0,00
135	0,00	0,00
140	0,00	0,00
145	0,00	0,00
150	0,00	0,00
155	0,00	0,00
160	0,00	0,00
165	0,00	0,00
170	0,00	0,00
175	0,00	0,00
180	0,00	0,00
185	0,00	0,00
190	0,00	0,00
195	0,00	0,00
200	0,00	0,00
205	0,00	0,00
210	0,00	0,00
215	0,00	0,00
220	0,00	0,00
225	0,00	0,00
230	0,01	0,02
235	0,08	0,08
240	0,22	0,17
245	0,32	0,21
250	0,28	0,21
255	0,22	0,19
260	0,16	0,15
265	0,13	0,12
270	0,10	0,10
275	0,09	0,08
280	0,08	0,07
285	0,08	0,06
290	0,07	0,06
295	0,07	0,06
300	0,07	0,05
305	0,07	0,05
310	0,07	0,06
315	0,07	0,06
320	0,08	0,06
325	0,09	0,06
330	0,10	0,06
335	0,10	0,07
340	0,10	0,07
345	0,11	0,08
350	0,10	0,11
355	0,08	0,18
360	0,06	0,24
365	0,04	0,24
370	0,04	0,20
375	0,03	0,14
380	0,03	0,10

Regression kurve (figur 4.6)		
mL	0,175 g C L ⁻¹	0,350 g C L ⁻¹
125	0,00	0,00
130	0,00	0,00
135	0,00	0,00
140	0,00	0,00
145	0,00	0,00
150	0,00	0,00
155	0,00	0,00
160	0,00	0,00
165	0,00	0,00
170	0,00	0,00
175	0,00	0,00
180	0,00	0,00
185	0,00	0,00
190	0,00	0,00
195	0,00	0,00
200	0,00	0,00
205	0,00	0,00
210	0,00	0,00
215	0,00	0,00
220	0,00	0,00
225	0,00	0,00
230	0,03	0,01
235	0,27	0,11
240	0,65	0,29
245	0,80	0,39
250	0,77	0,43
255	0,62	0,36
260	0,46	0,28
265	0,36	0,24
270	0,30	0,22
275	0,29	0,17
280	0,31	0,11
285	0,30	0,08
290	0,24	0,06
295	0,17	0,05
300	0,13	0,05
305	0,10	0,04
310	0,09	0,03
315	0,09	0,02
320	0,09	0,01
325	0,07	0,01
330	0,05	0,01
335	0,03	0,01
340	0,02	0,01
345	0,02	0,01
350	0,01	0,01
355	0,01	0,00
360	0,01	0,00
365	0,01	0,00
370	0,01	0,00
375	0,01	0,00
380	0,01	0,00

Maridalsvann-isolat forts.		
mL	med høy ionstyrke	med lav ionstyrke
385	0,03	0,08
390	0,02	0,07
395	0,02	0,06
400	0,02	0,06
405	0,02	0,06
410	0,02	0,06
415	0,02	0,06
420	0,02	0,07
425	0,02	0,08
430	0,02	0,09
435	0,02	0,13
440	0,02	0,18
445	0,02	0,20
450	0,02	0,16
455	0,02	0,11
460	0,02	0,06
465	0,02	0,04
470	0,02	0,03
475	0,02	0,02
480	0,03	0,02
485	0,03	0,02
490	0,04	0,02
495	0,05	0,02
500	0,07	0,01
505	0,10	0,01
510	0,13	-
515	0,17	-
520	0,22	-
525	0,25	-
530	0,29	-
535	0,29	-
540	0,28	-
545	0,27	-
550	0,25	-
555	0,23	-
560	0,25	-

Regression kurve forts		
mL	0,175 g C L ⁻¹	0,350 g C L ⁻¹
385	0,01	0,00
390	0,01	0,00
395	0,01	0,00
400	0,01	0,00
405	0,00	0,00
410	0,00	0,00
415	0,00	0,00
420	0,00	0,00
425	0,00	0,00
430	0,00	0,00
435	0,00	0,00
440	0,00	0,00
445	0,00	0,00
450	0,00	0,00
455	0,00	0,00
460	0,00	0,00
465	0,00	0,00
470	0,00	0,00

Maridalsvann-isolat (Figur 4.7)			
mL	UV-abs	DOC mg C L ⁻¹	sUVa (Acm ⁻¹ mgC ⁻¹)
125	0,00	-	-
130	0,00	-	-
135	0,00	-	-
140	0,00	-	-
145	0,00	-	-
150	0,00	-	-
155	0,00	-	-
160	0,00	-	-
165	0,00	-	-
170	0,00	-	-
175	0,00	-	-
180	0,00	-	-
185	0,00	-	-
190	0,00	-	-
195	0,00	-	-
200	0,00	-	-
205	0,00	-	-
210	0,00	-	-
215	0,00	-	-
220	0,00	-	-
225	0,00	0,53	-
230	0,03	0,74	0,04
235	0,11	2,59	0,04
240	0,19	4,66	0,04
245	0,21	4,96	0,04
250	0,19	4,65	0,04
255	0,16	4,78	0,03
260	0,12	3,37	0,04
265	0,09	2,50	0,04
270	0,07	1,94	0,04
275	0,06	1,90	0,03
280	0,05	1,52	0,03
285	0,04	1,27	0,03
290	0,04	1,28	0,03
295	0,04	1,33	0,03
300	0,03	1,54	0,02
305	0,03	1,11	0,03
310	0,03	1,29	0,03
315	0,03	1,20	0,03
320	0,04	1,40	0,03
325	0,04	1,23	0,03
330	0,04	1,21	0,04
335	0,05	1,36	0,04
340	0,07	2,04	0,03
345	0,09	2,61	0,03
350	0,14	4,45	0,03
355	0,19	6,62	0,03
360	0,18	8,50	0,02
365	0,14	5,25	0,03
370	0,11	4,46	0,02
375	0,09	3,05	0,03

Aurevann-isolat (Figur 4.8)			
mL	UV-abs	DOC mg C L ⁻¹	sUVa (Acm ⁻¹ mgC ⁻¹)
125	0,00	-	-
130	0,00	-	-
135	0,00	-	-
140	0,00	-	-
145	0,00	-	-
150	0,00	-	-
155	0,00	-	-
160	0,00	-	-
165	0,00	-	-
170	0,00	-	-
175	0,00	-	-
180	0,00	-	-
185	0,00	-	-
190	0,00	-	-
195	0,00	-	--
200	0,00	-	-
205	0,00	-	-
210	0,00	-	-
215	0,00	-	-
220	0,00	0,10	-
225	0,00	0,12	-
230	0,02	0,21	-
235	0,14	2,94	0,05
240	0,31	6,56	0,05
245	0,40	8,31	0,05
250	0,42	8,83	0,05
255	0,37	8,10	0,05
260	0,30	6,88	0,04
265	0,23	5,15	0,05
270	0,18	4,06	0,04
275	0,14	3,29	0,04
280	0,12	3,81	0,03
285	0,10	2,56	0,04
290	0,09	2,24	0,04
295	0,09	2,24	0,04
300	0,09	1,96	0,04
305	0,09	2,04	0,04
310	0,09	2,19	0,04
315	0,11	2,88	0,04
320	0,18	4,25	0,04
325	0,24	6,26	0,04
330	0,28	7,84	0,04
335	0,27	7,20	0,04
340	0,22	5,88	0,04
345	0,17	4,49	0,04
350	0,13	3,38	0,04
355	0,10	2,75	0,04
360	0,08	2,08	0,04
365	0,07	1,91	0,04
370	0,07	1,92	0,04
375	0,07	1,73	0,04

Maridalsvann-isolat forts.			
mL	UV-abs	DOC mg C L ⁻¹	sUVa (Acm ⁻¹ mgC ⁻¹)
380	0,08	2,58	0,03
385	0,07	2,92	0,03
390	0,07	2,58	0,03
395	0,07	2,01	0,04
400	0,08	2,54	0,03
405	0,08	2,89	0,03
410	0,09	2,57	0,03
415	0,09	2,66	0,03
420	0,10	3,34	0,03
425	0,11	5,26	0,02
430	0,12	4,00	0,03
435	0,15	4,99	0,03
440	0,20	6,94	0,03
445	0,19	6,86	0,03
450	0,12	4,39	0,03
455	0,07	2,38	0,03
460	0,05	2,39	0,02
465	0,03	-	-
470	0,02	-	-
475	0,02	-	-
480	0,02	-	-
485	0,01	-	-
490	0,01	-	-
490	0,01	-	-
500	0,01	-	-

Aurevann-isolat forts.			
mL	UV-abs	DOC mg C L ⁻¹	sUVa (Acm ⁻¹ mgC ⁻¹)
380	0,07	1,70	0,04
385	0,09	2,30	0,04
390	0,13	3,42	0,04
395	0,15	3,97	0,04
400	0,16	4,43	0,04
405	0,12	3,29	0,04
410	0,09	2,35	0,04
415	0,06	1,13	-
420	0,04	0,65	-
425	0,03	0,65	-
430	0,02	0,27	-
435	0,02	0,24	-
440	0,01	0,33	-
445	0,01	0,05	-
450	0,01	0,20	-
455	0,01	0,03	-
460	0,01	-	-
465	0,01	-	-
470	0,01	-	-
475	0,01	-	-
480	0,00	-	-

Humex B-isolat (Figur 4.9)			
mL	UV-abs	DOC mg C L ⁻¹	sUVa (Acm ⁻¹ mgC ⁻¹)
125	0,00	-	-
130	0,00	-	-
135	0,00	-	-
140	0,00	-	-
145	0,00	-	-
150	0,00	-	-
155	0,00	-	-
160	0,00	-	-
165	0,00	-	-
170	0,00	-	-
175	0,00	-	-
180	0,00	-	-
185	0,00	-	-
190	0,00	-	-
195	0,00	-	-
200	0,00	-	-
205	0,00	-	-
210	0,00	-	-
215	0,00	-	-
220	0,00	-	-
225	0,00	-	-
230	0,01	-	-
235	0,05	0,08	-
240	0,26	0,38	-
245	0,65	3,64	-
250	0,72	11,97	0,06
255	0,57	13,21	0,04
260	0,40	10,84	0,04
265	0,29	7,61	0,04
270	0,25	5,85	0,04
275	0,26	4,96	0,05
280	0,26	5,15	0,05
285	0,21	5,88	0,04
290	0,18	4,32	0,04
295	0,15	3,48	0,04
300	0,13	2,79	0,05
305	0,11	2,28	0,05
310	0,10	1,86	0,05
315	0,08	1,86	0,05
320	0,08	1,34	0,06
325	0,07	1,29	0,05
330	0,07	0,90	0,07
335	0,06	1,25	0,05
340	0,06	1,00	0,06
345	0,06	1,14	0,05
350	0,06	1,11	0,05
355	0,06	1,00	0,06
360	0,06	0,90	0,07
365	0,08	0,93	0,09
370	0,12	1,34	0,09

Hellerudmyra-isolat (Figur 4.10)			
mL	UV-abs	DOC mg C L ⁻¹	sUVa (Acm ⁻¹ mgC ⁻¹)
125	0,00	-	-
130	0,00	-	-
135	0,00	-	-
140	0,00	-	-
145	0,00	-	-
150	0,00	-	-
155	0,00	-	-
160	0,00	-	-
165	0,00	-	-
170	0,00	-	-
175	0,00	-	-
180	0,00	-	-
185	0,00	-	-
190	0,00	-	-
195	0,00	-	-
200	0,00	-	-
205	0,00	-	-
210	0,00	-	-
215	0,00	-	-
220	0,00	-	-
225	0,00	-	-
230	0,01	0,07	-
235	0,13	2,30	0,06
240	0,54	9,74	0,06
245	0,87	15,83	0,06
250	0,87	15,98	0,06
255	0,68	12,82	0,05
260	0,47	9,20	0,05
265	0,35	7,32	0,05
270	0,29	6,26	0,05
275	0,27	8,64	0,03
280	0,27	5,80	0,05
285	0,30	7,03	0,04
290	0,31	7,72	0,04
295	0,24	6,22	0,04
300	0,17	4,63	0,04
305	0,13	3,58	0,04
310	0,10	2,63	0,04
315	0,09	2,58	0,03
320	0,10	5,60	0,02
325	0,09	4,15	0,02
330	0,07	3,78	0,02
335	0,05	4,77	0,01
340	0,03	0,90	-
345	0,02	0,53	-
350	0,02	-	-
355	0,01	-	-
360	0,01	-	-
365	0,01	-	-
370	0,01	-	-

Humex B-isolat forts.			
mL	UV-abs	DOC mg C L ⁻¹	sUVa (Acm ⁻¹ mgC ⁻¹)
375	0,16	3,22	0,05
380	0,14	4,31	0,03
385	0,08	4,15	0,02
390	0,08	1,50	0,05
395	0,04	4,30	0,01
400	0,03	0,81	-
405	0,03	0,92	-
410	0,02	0,40	-
415	0,02	-	-
420	0,01	-	-
425	0,01	-	-
430	0,01	-	-
435	0,01	-	-
440	0,01	-	-
445	0,01	-	-
450	0,01	-	-
455	0,01	-	-
460	0,01	-	-
465	0,01	-	-
470	0,01	-	-

Hellerudmyra-isolat forts.			
mL	UV-abs	DOC mg C L ⁻¹	sUVa (Acm ⁻¹ mgC ⁻¹)
375	0,01	-	-
380	0,01	-	-
385	0,01	-	-
390	0,01	-	-
395	0,01	-	-
400	0,01	-	-
405	0,01	-	-
410	0,01	-	-
415	0,00	-	-
420	0,00	-	-

Appendiks D

Data for kurvene i del 4.3 Hg-eksperiment

Tabell D-1: Data for UV-abs ($A_{254nm;1\text{ cm}}$), R° og R° normalisert til figurene 4.11, 4.12, 4.13 og R° , R° normalisert til figurene 4.14 og 4.15

Humex B-isolat (figur 4.11)			
mL	UV-abs	R° (cps)	R° norm.
200	0,00	0,433	0,002
210	0,17	21,068	0,078
220	0,68	55,902	0,208
230	0,52	28,972	0,108
240	0,35	16,672	0,062
250	0,25	6,542	0,024
260	0,17	3,044	0,011
270	0,11	1,695	0,006
280	0,08	1,330	0,005
290	0,07	0,923	0,003
300	0,06	0,870	0,003
310	0,05	0,698	0,003
320	0,05	0,592	0,002
330	0,05	0,461	0,002
340	0,04	0,472	0,002
350	0,04	0,411	0,002
360	0,04	0,407	0,002
370	0,04	0,373	0,001
380	0,05	0,403	0,002
390	0,06	0,449	0,002
400	0,09	0,530	0,002
410	0,12	0,478	0,002
420	0,12	0,534	0,002
430	0,09	0,412	0,002
440	0,07	0,338	0,001
450	0,04	0,253	0,001
460	0,02	0,210	0,001
470	0,01	0,156	0,001
480	0,01	0,150	0,001
490	0,01	0,111	0,000
500	0,01	0,125	0,001
510	0,01	0,122	0,001
520	0,01	0,103	0,000
530	0,00	0,091	0,000
540	0,01	0,062	0,000
550	0,00	0,072	0,000
560	0,00	0,113	0,000
570	0,00	0,153	0,001
580	0,00	0,249	0,001
590	0,00	0,241	0,001

Aurevann-isolat (figur 4.12)			
mL	UV-abs	R° (cps)	R° norm.
200	-	-0,007	0,000
210	-	-0,022	0,000
220	0,00	0,136	0,000
230	0,01	10,785	0,028
240	0,21	69,063	0,177
250	0,38	46,209	0,118
260	0,24	18,882	0,048
270	0,14	6,231	0,016
280	0,09	3,162	0,008
290	0,07	1,575	0,004
300	0,06	1,255	0,003
310	0,06	1,033	0,003
320	0,09	1,094	0,003
330	0,20	1,272	0,003
340	0,21	1,259	0,003
350	0,10	0,700	0,002
360	0,06	0,571	0,001
370	0,05	0,405	0,001
380	0,05	0,494	0,001
390	0,04	0,400	0,001
400	0,04	0,502	0,001
410	0,04	0,549	0,001
420	0,04	0,696	0,002
430	0,06	0,815	0,002
440	0,07	1,043	0,003
450	0,10	1,301	0,003
460	0,16	1,618	0,004
470	0,15	1,521	0,004
480	0,05	1,026	0,003
490	0,03	0,796	0,002
500	0,02	0,723	0,002
510	0,01	0,531	0,001
520	0,01	0,574	0,001
530	0,01	0,480	0,001
540	0,01	0,497	0,001
550	0,01	0,449	0,001
560	0,01	0,411	0,001
570	0,01	0,392	0,001
580	0,01	0,393	0,001
590	0,00	0,429	0,001

Maridalsvann-isolat (figur 4.13)			
mL	UV-abs	R ^o (cps)	R ^o norm.
200	0,00	0,049	0,004
210	0,06	0,525	0,046
220	0,16	1,014	0,089
230	0,15	0,657	0,058
240	0,11	0,393	0,035
250	0,07	0,134	0,012
260	0,06	0,061	0,005
270	0,05	0,049	0,004
280	0,05	0,040	0,003
290	0,06	0,015	0,001
300	0,07	0,026	0,002
310	0,08	0,029	0,003
320	0,09	0,033	0,003
330	0,10	0,040	0,004
340	0,10	0,023	0,002
350	0,10	0,006	0,001
360	0,09	0,032	0,003
370	0,08	0,012	0,001
380	0,07	0,008	0,001
390	0,07	0,020	0,002
400	0,07	0,016	0,001
410	0,07	-0,003	0,000
420	0,07	0,010	0,001
430	0,06	0,011	0,001
440	0,05	0,017	0,002
450	0,03	0,016	0,001
460	0,01	-0,001	0,000
470	0,01	-0,004	0,000
480	0,01	-0,023	-0,002
490	0,00	0,004	0,000
500	-	-0,008	-0,001
510	-	0,000	0,000
520	-	0,002	0,000
530	-	0,009	0,001
540	-	0,000	0,000
550	-	-0,007	-0,001
560	-	0,006	0,001
570	-	-0,016	-0,001
580	-	-0,014	-0,001
590	-	-0,014	-0,001

Blindprøve (figur 4.14)		
mL	R ^o (cps)	R ^o norm.
200	-0,017	0,000
210	-0,012	0,000
220	0,041	0,000
230	0,455	0,003
240	0,768	0,005
250	0,304	0,002
260	0,070	0,000
270	0,021	0,000
280	-0,002	0,000
290	-0,019	0,000
300	0,005	0,000
310	-0,014	0,000
320	0,000	0,000
330	0,000	0,000
340	-0,007	0,000
350	-0,012	0,000
360	-0,018	0,000
370	-0,024	0,000
380	-0,012	0,000
390	-0,013	0,000
400	0,013	0,000
410	0,001	0,000
420	0,029	0,000
430	0,000	0,000
440	-0,002	0,000
450	0,008	0,000
460	0,009	0,000
470	0,003	0,000
480	-0,003	0,000
490	0,002	0,000
500	-0,002	0,000
510	-0,012	0,000
520	-0,018	0,000
530	0,002	0,000
540	-0,013	0,000
550	-0,023	0,000
560	-0,011	0,000
570	-0,007	0,000
580	0,000	0,000
590	0,002	0,000

Blindprøve kjørt på fersk Sephadex (figur 4.14)		
mL	R ^o (cps)	R ^o norm.
200	2,667	0,000
210	3,599	0,000
220	2,369	0,000
230	1,289	0,000
240	0,592	0,000
250	0,325	0,000
260	0,270	0,000
270	0,269	0,000
280	0,326	0,000
290	0,336	0,000
300	0,729	0,000
310	0,668	0,000
320	0,612	0,000
330	0,531	0,000
340	0,475	0,001
350	0,362	0,001
360	0,328	0,006
370	0,300	0,008
380	0,300	0,007
390	0,233	0,004
400	0,215	0,003
410	0,192	0,002
420	0,188	0,003
430	0,191	0,002
440	0,178	0,002
450	0,128	0,001
460	0,132	0,002
470	0,133	0,001
480	0,131	0,001
490	0,096	0,001
500	0,114	0,001
510	0,107	0,001
520	0,103	0,001
530	0,099	0,000
540	0,077	0,001
550	0,111	0,000
560	0,111	0,001
570	0,112	0,000
580	0,157	0,001
590	0,160	0,001

Tabell D-2: Hg adsorpsjon gjennom kolonnen med og uten DNOM-løsninger

	Humex B- isolat	Aurevann- isolat	Maridalsvann- isolat	Blindprøve	Blindprøve kj. på fersk Sephadex
R^0 (cps) før fraksjonering	269	390	11	158	386
ΣR^0 (cps) etter fraksjonering	146	179	3	2	21
Adsorpsjon	46%	54%	73%	99%	95%

Appendiks E

Produksjon av ¹⁹⁷Hg på syklotronen

Produksjon av ¹⁹⁷Hg på syklotronen (12 MeV p-stråle)

Common parameters:

Target area: 4.90625 cm²
 Proton beam intensity: 3 pμA
 Proton beam intensity: 3.816E+12 p/(s cm²)
 Irradiation time: 180 min
 "Cooling" time: 0 min
 Counting time: 5 min

Nucleus A:

T _{1/2} :	3846 min	N _t =	7,2359E+21 atoms	⇒	Stoffmengder:
Gross section:	150 mbarn	F =	4,1413E+09 Bq	⇒	1,38E+15 2,29E-03 umol
Amount:	2,3667 g	(1-e ^{-λ_{abs}t) =}	0,0319		0,4510238 μg
Isotopic abundance:	100 %				
Atomic weight:	196,9665 g/mol	A ₀ =	1,3219E+08 Bq	⇒	1,14E+12 1,90E-06 umol
		Count rate=	1,3215E+08 Bq		0,0003743 μg
		Net area=	449314,824 cps		
		Uncertainty=	134794447 counts +/-		11610
			0,009 %		

Appendiks F

Abstrakt til International Humic Substances Society (IHSS) XIII

Gel Fractionation of NOM for preparative size fractionation

Rolf D. Vogt, Polina Solomonova, Egil T. Gjessing, Jon Petter Omtvedt

Dept. of Chemistry, University of Oslo, Blindern, 0315 Oslo, Norway.

Rolf.vogt@kjemi.uio.no

1. INTRODUCTION

More than forty years ago it was shown that dissolved natural organic matter (NOM) in water could be separated into a number of distinct size fractions (ⁱ) using the gel-matrix Sephadex. Since then a number of different techniques and methods have been introduced for the purpose to define and describe the collective physical and chemical properties NOM. During the last few decades the awareness of the eco-environmental importance of this complex composed mix of organic matter has increased. It is now recognized that more knowledge on some distinct fundamental fractions of NOM are needed, rather than the NOM as a whole.

We have therefore re-introduced preparative gel-filtration, using simply water as mobile phase, in order to separately study the biophysiochemical characteristics of the three main size classes of NOM; i.e. large, medium and small size fraction. This fractionation techniques offer the advantage of distinct NOM fractions, minor perturbation to the NOM by e.g. high ionic strength mobile phases and comparably large sample volume. Refining this method may lead to a generally more acceptable standard NOM fractionation technique, allowing for better comparison of results from different labs and experiments. This will enable us to learn more about the fate of micro pollutants in fresh-water ecosystems.

Mercury (Hg) is an element of considerable health concern, mostly due to its global distribution and its bio-magnification potentials in water. The important role of NOM both as carrier and as mediator of Hg transport from soil to the surface water is demonstrated

by elevated Hg concentrations in humic-rich waters. A purpose of the work to be presented is to fractionate “Hg-spiked” dissolved natural organic matter (NOM), and to investigate the Hg distribution on the NOM in detail.

2. MATERIAL AND METHODS

Size fractionation: Sephadex is a gel that was introduced by Pharmacia Ltd. in the late 1950-s. It is a neutral three dimensional network of polysaccharides and the size of the pores depends on the extent of cross-linkage. Sephadex is therefore available in a number of different grades for separation of a wide spectrum of organic macromolecules. Typical fractionation diagrams are shown in the figures below.

The experimental work is based on selected NOM-samples that have been isolated from water by reverse osmosis (RO) and then freeze dried. RO samples are dissolved in 50 mL carbon free water so that all samples produce the same concentration of carbon ($0,35\text{g L}^{-1}$). A 3 mL filtrated ($0,45\ \mu\text{m}$ pore size) sample is then added to the top of a column ($L = 980\ \text{mm}$, $\varnothing = 29\ \text{mm}$, volume = 649,9 mL), containing swelled Sephadex G-25 (Mw 100 – 5000 Da), and carried through the gel using water as mobile phase. The eluent is split into 60 sub-samples by means of an automatic fraction collector. Absorbance at 254 nm and content of Dissolved Organic Carbon (DOC) is measured in all the aliquots. A minimum of three replicates were fractionated for each sample.

Mercury experiment: We fractionated NOMs that had been spiked with minute amounts of radioactive Hg along with environmentally relevant amounts of Hg in an attempt to investigate the Hg distribution along with the size distribution of NOM in detail. The radioactive ^{197}Hg , with half live of 64.1 h, in the different size fractions in the 40 aliquots was determined by use of a High-Purity Ge γ -detector. The radionuclide was produced with a high-energy proton beams on targets of gold. The beams are supplied from a Scanditronix MC-35 cyclotron at the Oslo Cyclotron Laboratory (OCL). The results of this study have so far proven to be inconclusive, suggesting that there may be a problem with the time of interactions between the Sephadex and Hg. Additional studies are therefore

required before any results may be presented.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The ability of Sephadex-G25 to separate the NOM into three distinct size fractions improved when allowing the material to mature over several weeks (Figure 1). It took considerably longer time than the prescribed 72 hours needed for swelling (**Error! Bookmark not defined.**) before an acceptable fractionation was achieved. This aging process is fixated by conserving the column using a few drops of chloroform in the mobile phase, thereby allowing for reproducible results (Figure 2). The fact that chloroform halts the process indicates that some microbial activity may be responsible for opening the pores of the polysaccharide gel material. It is evident from Figure 3 that the Sephadex with water as mobile phase is successful in fractionating the NOM from the large lake *Maridalsvannet* into three distinct size fractions. The fractionation of the NOM from the dystrophic water from the bog *Hellerudmyra* (Figure 3) is an example of a less satisfactory separation. The catchment size of the tarn Hellerudmyra is 0,08 km², compared to 252 km² draining into lake Maridalsvannet. The presumably younger Hellerudmyra water appears to be of higher molecular weight.

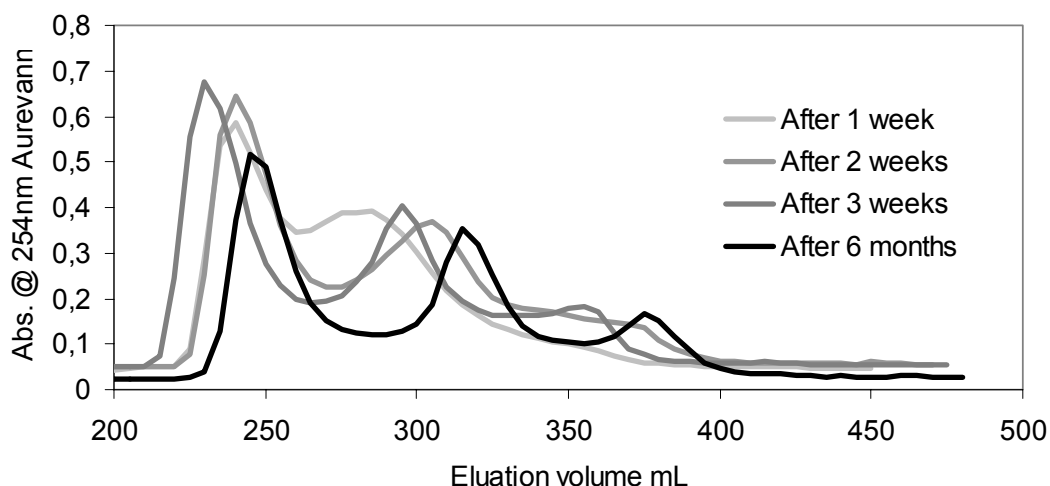


Figure 1: Development in fractionation after 1, 2, 3 weeks and after 6 months of “maturing” of the column before fixation with chloroform.

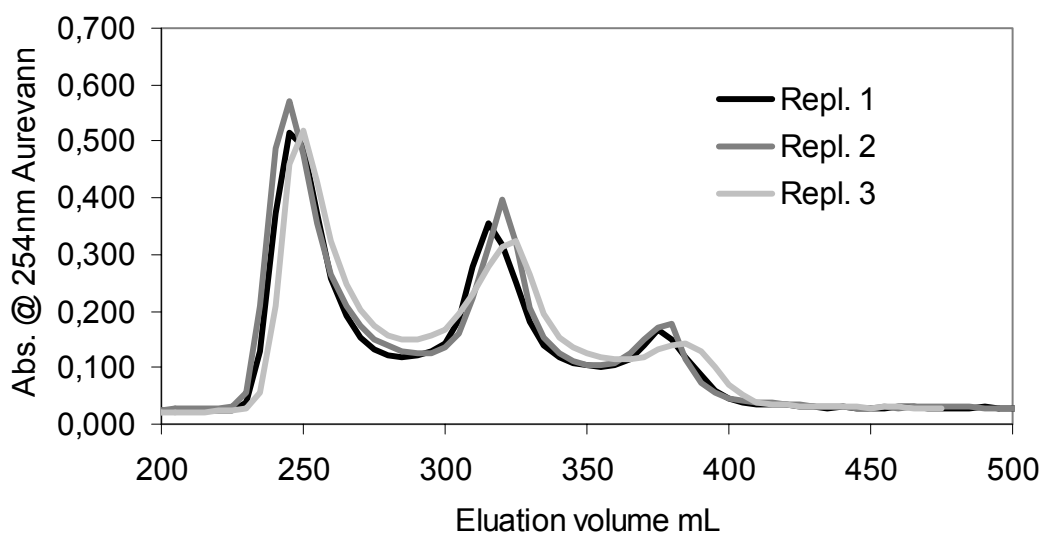


Figure 2: Reproducibility of the method as shown by three replicates of the sample from Aurevann

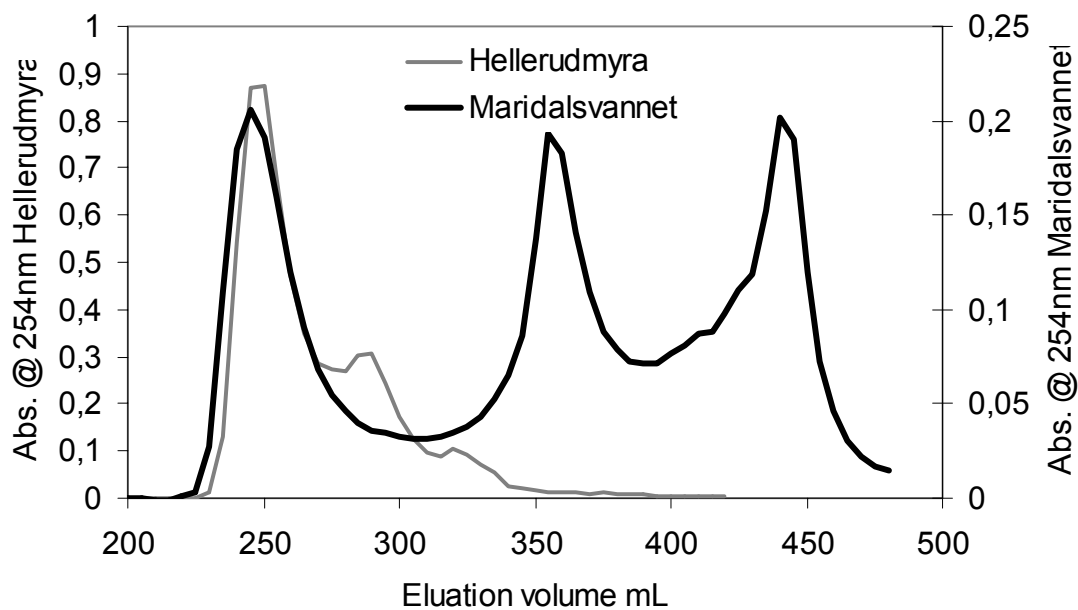


Figure 3: Example of UV [$A_{254nm;1\text{ cm}}$] of reverse osmosis isolated dissolved natural organic matter from Hellerudmyra (gray line) and Maridalsvannet (black line) fractionated by Sephadex G25 using water as mobile phase.

4. CONCLUSIONS

The preliminary results indicate that aged Sephadex-G25 using water as mobile phase is well suited for preparatory fractionation of NOM into distinct size fractions

ACKNOWLEDGEMENTS

We greatly appreciate the laboratory assistance by Hege Lynne. Assistance with production of high-intensity proton-beams at the Oslo Cyclotron Laboratory by Eivind A. Olsen is highly appreciated.

REFERENCES

⁽ⁱ⁾ Gjessing, E.T.: Use for Sephadex gel for the estimation of molecular weight of humic substances in natural water. Nature 208, 1091-1092 (1965).