

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ajda ROZMAN

**ENCIMSKA RAZGRADNJA ORGANSKO VEZANEGA FOSFORJA V
MORSKIH MAKROAGREGATIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ENZYMATIC HYDROLYSIS OF ORGANIC PHOSPHORUS IN
MARINE MACROAGGREGATES**

GRADUATION THESIS
University study

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Morski biološki postaji Nacionalnega inštituta za biologijo v Piranu.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Jadrana Faganelija, za somentorico doc. dr. Nives Kovač in za recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Mentor: prof. dr. Jadran FAGANELI

Somentorica: doc. dr. Nives KOVAČ

Recenzent: prof. dr. Tom TURK

Komisija za oceno in zagovor

Predsednik: prof. dr. Ines Mandić Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Jadran FAGANELI
Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran

Članica: doc. dr. Nives KOVAČ
Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran

Član: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ajda ROZMAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD DN
DK UDK 579.68 + 574.5: 546.18: 577.15 (043) = 163.6
KG morska mikrobiologija/morski makroagregati/severni Jadran/encimska razgradnja/fosfor/alkalna fosfataza/pankreatin/spektrofotometrične metode
AV ROZMAN Ajda
SA FAGANELI, Jadran (mentor)/KOVAČ, Nives (somentorica)/TURK, Tom (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2011
IN ENCIMSKA RAZGRADNJA ORGANSKO VEZANEGA FOSFORJA V MORSKIH MAKROAGREGATIH
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 60 str., 3 pregl., 18 sl., 4 pril., 174 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Cilj diplomskega dela je bil raziskati pomen morskih makroagregatov kot izvora fosforja (P), omejujočega dejavnika primarne produkcije v severnem Jadranu. Najprej smo analizirali P_{cel} v morskih makroagregatih. Nato smo študirali sproščanje P in monosaharidov v raztopino z encimsko razgradnjo morskih makroagregatov. V zadnji stopnji smo nadaljevali študij frakcionacije intersticijske vode (koloidov) makroagregatov med mikrobno razgradnjo (Marinšek, 2008) po molskih masah z ultrafiltracijo. Analizirali smo P_{cel} v različnih velikostnih frakcijah intersticijske vode. Vsebnost P_{cel} se povečuje z velikostjo in staranjem morskih makroagregatov. Alkalna fosfataza in pankreatin učinkovito sproščata P iz matriksa sluzi. Proteinaza K prispeva k hitrejšemu in večjemu sproščanju P v sodelovanju s prisotnimi izvenceličnimi encimi mikrobov vzorca. P se je zaradi selektivne mikrobne razgradnje med inkubacijo razporedil (frakcioniral) med različnimi velikostnimi frakcijami intersticijske vode. Razmerje C_{org}/P_{cel} se je zmanjševalo med inkubacijo najverjetneje zaradi selektivne razgradnje organske snovi z izvenceličnimi encimi mikrobov in hkratnega ohranjanja organsko vezanega P. Enako velja tudi za razmerje N_{cel}/P_{cel} .

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN DN
DC UDC 579.68 + 574.5: 546.18: 577.15 (043) = 163.6
CX marine microbiology/marine macroaggregates/northern Adriatic Sea/enzymatic decomposition/phosphorus/alkaline phosphatase/pancreatin/spectrophotometric methods
AU ROZMAN Ajda
AA FAGANELI, Jadran (supervisor)/KOVAČ, Nives (co-advisor)/TURK, Tom (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2011
TI ENZYMATIC HYDROLYSIS OF ORGANIC PHOSPHORUS IN MARINE MACROAGGREGATES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII, 60 p., 3 tab., 18 fig., 4 ann., 174 ref.
AL sl/en

The scope of this thesis was to decode the role of marine macroaggregates as a source of phosphorus which is the limiting factor of primary production in the northern Adriatic Sea. During the enzymatic degradation of marine macroaggregates, using alkaline phosphatase, we observed the release of P and monosaccharides into solution. In the last stage of this study, continuing the study of fractionation of macroaggregate interstitial water during microbial decomposition (Marinšek, 2008), we analyzed P_{tot} in various fractions separated according to MW by ultrafiltration. The results showed that P_{tot} is increasing with MW and age. Alkaline phosphatase and pancreatin efficiently release phosphorus from marine mucilage. Conversely, proteinase K contributes to faster and greater release of P in cooperation with microbial extracellular enzymes in the sample. P is distributed (fractionated) among various fractions, separated according to MW by ultrafiltration, of marine mucilage because of selective decomposition during incubation. The C_{org}/P_{tot} ratio decreased during incubation probably due to selective degradation of organic matter by microbial extracellular enzymes present in the sample and preservation of organically-bound P. The same appeared for N_{tot}/P_{tot} ratio.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJ DIPLOMSKE NALOGE IN HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 FOSFOR	4
2.1.1 Biološki pomen P	4
2.1.2 Oblike P	4
2.1.3 Kroženje P	4
2.1.4 Pomembnost P v morju	5
2.1.5 Biološke pretvorbe P	5
2.2.5.1 Mineralizacija P	5
2.2.5.2 Sproščanje P z mineralov	6
2.2.5.3 Mikrobno obarjanje, redukcija ali oksidacija P zvrsti	6
2.2.5.4 Mikrobne pretvorbe težje topnih oblik P v bolj topne	6
2.1.6 Alkalna fosfataza	6
2.2 SESTAVA IN ORGANIZACIJA ORGANSKE SNOVI V MORJU	7

2. 2. 1	Organska snov v morju	7
2. 2. 2	Hidrogel in različne teorije nastanka gelov	9
2. 2. 3	Morski makroagregati	12
2. 2. 4	Cvetenje morja	12
2. 2. 5	Morski sneg	13
2. 3	SLUZENJE MORJA V SEVERNEM JADRANU	13
2. 3. 1	Značilnosti področja raziskave	13
2. 3. 1. 1	Oris področja raziskave	13
2. 3. 1. 2	Pojav »sluzenja« morja v Jadranu	14
2. 3. 2	Nastanek, razvoj makroagregatov	16
2. 3. 2. 1	Izvori DOM	16
2. 3. 2. 2	Kopičenje DOM	17
2. 3. 3	Videz morskih makroagregatov	18
2. 3. 4	Biološka sestava	18
2. 3. 4. 1	Bakterije v morskih makroagregatih	18
2. 3. 4. 2	Fitoplankton v morskih makroagregatih	19
2. 3. 4. 3	Mezozooplankton v morskih makroagregatih	20
2. 3. 4. 4	Virusi v morskih makroagregatih	20
2. 3. 5	Kemijska sestava	20
2. 3. 5. 1	Elementna sestava	20
2. 3. 5. 2	Molekulska sestava	21
2.3.5.3	Intersticijska voda	22
2. 3. 6	Razgradnja (staranje) morskih makroagregatov v Jadranu	22

2.3.7	Posledice »sluzenja« morja	24
3	MATERIALI IN METODE	26
3.1	VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCEV	26
3.1.1	Vzorčenje in priprava vzorcev matriks sluzi-G in intersticijska voda-G	26
3.1.2	Vzorčenje in priprava vzorca matriks sluzi-P	27
3.1.3	Priprava komponent morskih makroagregatov med mikrobn razgradnjo	28
3.2	ANALIZA P_{cel} V MATRIKSU SLUZI-G, MATRIKSU SLUZI-P IN INTERSTICIJSKI VODI-G	30
3.3	ANALIZA SPROŠČANJA P_{anorg} V VZORCIH MED ENCIMSKO RAZGRADNJO	31
3.4	ANALIZA SPROŠČANJA OGLJIKOVIH HIDRATOV V MATRIKSU SLUZI-G MED ENCIMSKO RAZGRADNJO	34
3.5	P_{cel} V FRAKCIONIRANIH MORSKIH MAKROAGREGATIH MED MIKROBNO RAZGRADNJO	34
4	REZULTATI	35
4.1	P_{cel} V MATRIKSU SLUZI-G, MATRIKSU SLUZI-P IN INTERSTICIJSKI VODI-G	35
4.2	SPROŠČANJE P_{anorg} V VZORCIH MED ENCIMSKO RAZGRADNJO	35
4.2.1	Encim alkalna fosfataza	35
4.2.1.1	Matriks sluzi-G	35
4.2.1.2	Intersticijska voda-G	37
4.2.2	Proteinaza K	38
4.2.3	Lipaza	39
4.2.4	α amilaza	39
4.2.5	Pankreatin	39
4.3	SPROŠČANJE OGLJIKOVIH HIDRATOV MED ENCIMSKO RAZGRADNJO Z ALKALNO FOSFATAZO	41

4. 4	P_{cel} V FRAKCIONIRANIH MORSKIH MAKROAGREGATIH MED MIKROBNO RAZGRADNJO	42
4. 4. 1	P_{cel} med poskusom v različnih frakcijah morskih makroagregatov	42
4. 4. 2	Razmerja C_{org}/P_{cel} med poskusom v različnih frakcijah morskih makroagregatov	43
4. 4. 3	Razmerja N_{cel}/P_{cel} med poskusom v različnih frakcijah morskih makroagregatov	43
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	45
5. 1	RAZPRAVA	45
5. 1. 1	P_{cel} v matriksu sluzi-G, matriksu sluzi-P in intersticijski vodi-G	45
5. 1. 2	Panorg v vzorcih med encimsko razgradnjo	45
5. 1. 3	Sproščanja ogljikovih hidratov med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo	46
5. 1. 4	P_{cel} v frakcioniranih morskih makroagregatih med mikrobno razgradnjo	46
5.1.5	Pomen razgradnje P v makroagregatih Tržaškega zaliva	47
5. 2	SKLEPI	48
6	POVZETEK	49
7	VIRI	51
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Odvisnost vrednosti K_m proste alkalne fosfataze glede na pH z dodatkom $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris pufra (Orhamović in Pavela-Vrančič, 2000)	7
Slika 2: Velikostni razredi organske snovi v morju in metode njihovega določanja (Verdugo in sod., 2004)	10
Slika 3: Tržaški zaliv z lokacijo oceanografske boje (Foto: Arhiv MBP)	14
Slika 4 Sluzenje morja (površinske sluzaste prevleke) (A) (Foto: N. Kovač) in morski makroagregati v vodnem stolpcu (B) (Foto: Arhiv MBP)	18
Slika 5: Prikaz centrifugiranega matriksa sluzi-G	27
Slika 6: Priprava vzorcev intersticijske vode-G in matriksa sluzi-G	27
Slika 7: Shema poteka poskusa fracioniranja morskih makroagregatov med mikrobno razgradnjo (Marinšek, 2008)	29
Slika 8: Shema ultrafiltracije obdelanega vzorca intersticijske vode-G (Marinšek, 2008)	30
Slika 9: Postopek analize P_{cel} v matrisku sluzi-G, matriksu sluzi-P in intersticijski vodi-G	31
Slika 10: Shema določanja P_{anorg} v matriksu sluzi-G med encimsko razgradnjo	33
Slika 11: Rezultati analize sproščanja P_{anorg} v vzorcih matriksa sluzi-G med razgradnjo z encimom alkalno fosfatazo	36
Slika 12: Rezultati analize sproščanja P_{anorg} v vzorcih intersticijske vode-G med razgradnjo z encimom alkalno fosfatazo	37
Slika 13: Rezultati analize sproščanja P_{anorg} v vzorcih matriksa sluzi-G med razgradnjo z encimom proteinaza K	38
Slika 14: Rezultati analize sproščanja P_{anorg} v vzorcih matriksa sluzi-G med razgradnjo z encimi pankreatina	40
Slika 15: Rezultati analize sproščanja ogljikovih hidratov iz matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo s alkalno fosfatazo	41
Slika 16: Delež P_{cel} v različnih frakcijah morskih makroagregatov med mikrobno razgradnjo	42
Slika 17.: Razmerje C_{org}/P_{cel} v različnih frakcijah morskih makroagregatov med mikrobno razgradnjo	43
Slika 18: Razmerje N_{cel}/P_{cel} frakcijah morskih makroagregatov med mikrobno razgradnjo	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: P_{cel} , C_{org} , N_{cel} in molska razmerja C_{org}/P_{cel} in N_{cel}/P_{cel} v P_{cel} v vzorcih matriksa sluzi-G, matriksa sluzi-P in intersticijske vode-G	35
Preglednica 2: Prikaz SD (standardnih odklonov, $n=6$) v različnih časih in različnih vzorcih pri meritvah sproščenega P iz matriksa sluzi-G z encimom alkalna fosfataza	36
Preglednica 3: Prikaz SD (standardnih odklonov, $n=6$) pri analizi sproščanja P_{anorg} v vzorcih med razgradnjo z encimom alkalno fosfatazo v intersticijski vodi-G	38

KAZALO PRILOG

Priloga A1. Preglednica vrednosti P_{anorg} pri analizi njegovega sproščanja v vzorcu matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo

Priloga A2. Preglednica vrednosti P_{anorg} pri analizi njegovega sproščanja v vzorcu intersticijske vode-G med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo

Priloga A3. Preglednica vrednosti P_{anorg} pri analizi njegovega sproščanja v vzorcu matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo s proteinazo K

Priloga A4. Preglednica vrednosti P_{anorg} pri analizi njegovega sproščanja v vzorcu matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo s pankreatinom

Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije ogljikovih hidratov

Priloga C: Preglednica vrednosti koncentracij ogljikovih hidratov iz matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo

Priloga D1: Preglednica vrednosti vsebnosti P_{cel} (grami P_{cel} na 100 g vzorca) v komponentah morskih makroagregatov med mikrobno razgradnjo

Priloga D2: Preglednica vrednosti P_{cel} , C_{org} , N_{cel} (grami P_{cel} , C_{org} ali N_{cel} na 100 g vzorca) v komponentah morskih makroagregatov med mikrobno razgradnjo

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADP = adenzindifosfat
ATP = adenozintrifosfat
COM = koloidna organska snov
C_{org} = organski ogljik
dH₂O = destilirana voda mili Q
DNA = deoksiribonukleinska kislina
DOC = raztopljeni organski ogljik
DOM = raztopljena organska snov
DOP = raztopljeni organski fosfor
EPS = izvencelične polimerne substance
Fp = pigmentni indeks
GF/F filter = stekleni mikrofibrilni filter GF/F (Whatman) s premerom por 0,7 µm
H-NMR = protonova jedrna magnetna resonanca
Intersticijska voda-G = obdelan vzorec intersticijske vode, vzorčene 1. 7. 2004 na globini 11–12 m s črpalko
Matriks sluzi-G = obdelan vzorec matriksa sluzi, vzorčenega 1. 7. 2004 na globini 11–12 m s črpalko
Matriks sluzi-P = obdelan vzorec matriksa sluzi, vzorčenega 23. 6. 2004 na površini
MWCO = izključitvena molekulska masa
N_{cel} = celotni dušik
nM = navtična milja ali 2,28 km
P_{anorg} = anorganski fosfor
P_{cel} = celotni fosfor
POM = suspendirana organska snov
P_{org} = organsko vezani fosfor
R1 = reagent vsebuje K₂S₂O₈, H₃BO₃ in NaOH
R2 = reagent vsebuje askorbinsko in žveplovo(VI) kislino
R3 = reagent vsebuje amonij heptamolibat tetrahidrat, K-Sb-O-tartrat in žveplovo(VI) kislino
RNA = ribonukleinska kislina
rRNA = ribosomska RNA
SD = standardni odklon
TEP = prozorni eksopolimerni delci (transparent exopolymer particles)
UF1/F = filtrat ultrafiltracije z velikostjo por 30.000 MWCO
UF1/O = retentat ultrafiltracije z velikostjo por 30.000 MWCO
UF2/F = filtrat ultrafiltracije z velikostjo por 10.000 MWCO
UF2/O = retentat ultrafiltracije z velikostjo por 10.000 MWCO
UF3/F = filtrat ultrafiltracije z velikostjo por 5.000 MWCO
UF3/O = retentat ultrafiltracije z velikostjo por 5.000 MWCO
UV = ultravijolično valovanje
VLP = delci, podobni virusom (virus-like particles)

SLOVARČEK

α -amilaza = encim, ki hidrolizira oz. cepi $\alpha(1-4)$ vezi v molekuli škroba, in sicer na naključnih mestih vzdolž verige amiloze in amilopektina.

Alkalna fosfataza = skupina encimov, ki v laboratorijskih razmerah katalizirajo hidrolizo organskih monofosfatnih estrov v alkalnem pH.

K_m = je Michaelisova konstanta, ki nam pove informacijo o katalitični učinkovitosti nekega encima. Manjša, kot je K_m encima, večja je katalitična učinkovitost tega encima. K_m je odvisna tako od substrata encima, kot od pH raztopine in temperature, pri kateri reakcija poteče.

Lipaza = encim, ki hidrolizira tri-, di- in monogliceride.

Mediana ali centralna vrednost = vrednost spremenljivke, od katere ima polovica enot manjše, polovica pa večje vrednosti.

Pankreatin = zmes encimov prebavnega soka trebušne slinavke. Ti encimi so npr. amilaze, tripsin, lipaze, ribonukleaze, proteaze in druge.

Piknoklina = plast oziroma vodni sloj gostotnega preskoka, ločuje redkejšo površinsko vodo od globlje gostejše vode.

Proteinaza K = encim endolitična proteaza, ki cepi peptidne vezi na karboksilnih ostankih alifatskih, aromatskih oz. hidrofobnih aminokislin. Proteinaza K hidrolizira proteine, glikoproteine, peptide in estre aminokislin. Najmanjšo peptid, ki ga cepi, je tetrapeptid.

Termoklina = plast temperaturnega preskoka, ločuje toplo površinsko vodo od globlje hladne vode.

1 UVOD

Pri pojavu sluzenja morja gre za kopičenje morskih makroagregatov s kompleksno in heterogeno (biološko in kemijsko) sestavo. V morskih makroagregatih najdemo heterogeno združbo mikroorganizmov, ki vključuje fitoplankton, bakterije (tudi cianobakterije), kvasovke, mezozooplankton in mikrozooplankton. Poleg tega pa so tu prisotni še ostanki zooplanktona, pelod ter različne anorganske sestavine, kot so prazne lupinice oz. skeltni delci diatomej, kokolitoforidov, dinoflagelatov in mineralni delci (Kovač in sod., 2008). Morski makroagregati lahko vsebujejo tudi več kot 90 % vode skladno z njihovo gelsko naravo (Alldredge in Crocker, 1995). Elementna analiza morskih makroagregatov severnega Jadrana je pokazala prisotnost glavnih elementov, kot so P, Si, Al, Fe, Mn, Ka, Mg, Na, K, Ti (Pettine in sod., 1993). Kemijske analize pa so razkrile, da so ogljikovi hidrati količinsko največja komponenta, ki ji sledijo proteini in lipidi (Posedel in Faganeli, 1991; Penna in sod., 2003).

Pojav morskih makroagregatov v severnem Jadranu negativno vpliva na morsko okolje in ekonomijo obalnih regij. Ob tem pojavu so prizadete predvsem dejavnosti, kot so: turizem, ribištvo in marikulture. Njihova prisotnost pa vpliva tudi na druga življenjska dogajanja in procese v morju. Zato je izredno pomembno da raziskujemo pojav morskih makroagregatov, da bi ga lahko uspešno napovedovali ali celo preprečili.

Obstaja več hipotez o nastanku morskih makroagregatov, ki se med seboj pogosto prepletajo in dopolnjujejo. Pri tem posamezne hipoteze izpostavljajo določene hidrološke razmere (rečni vnosi, slanost, temperatura), kopičenje raztopljenega organskega ogljika (DOC – dissolved organic carbon) zaradi lize celic z virusi, neravnovesja hranil ter drugo.

Predhodne raziskave poudarjajo pomen hranil dušika (N) in P oziroma razmerja N/P. P ni le pomembno hranilo v morskem okolju, ampak je tudi omejujoč dejavnik primarne produkcije v mnogih obalnih morjih (Aydin in sod., 2009). Kljub temu da je bilo opravljenih mnogo raziskav o sestavi in nastanku morskih makroagregatov v Jadranu, pa vloga makroagregatov v kroženju P v morju še ni osvetljena.

1.1 CILJ DIPLOMSKE NALOGE IN HIPOTEZE

Namen diplomskega dela je raziskati pomen morskih makroagregatov kot izvora P, omejujočega dejavnika primarne produkcije v severnem Jadranu. Pri tem smo izbrane vzorce morskih makroagregatov vzorčenih na površini (matriks sluzi-P) ter v vodnem stolpcu (globini, matriks sluzi-G, intersticijska voda-G) po odtalitvi ločili na dve frakciji: matriks sluzi in intersticijsko vodo. V posameznih frakcijah smo analizirali celotni fosfor (P_{cel}). Poleg tega smo izvedli eksperiment encimske razgradnje (z encimi alkalno fosfatazo, lipazo, α amilazo, proteinazo K in zmesjo encimov pankreatina) izbranih frakcij, kjer smo merili koncentracije anorganskega fosforja (P_{anorg}), ki se je sproščal med hidrolizo organsko vezanega v teku eksperimenta.

Glede na dosedanje raziskave morebitne ekstracelularne hidrolizne aktivnosti organo-P spojini v makroagregatih z alkalno fosfatazo (Zaccone in sod., 2002) smo pričakovali

razmeroma počasno razgradnjo in sproščanje P v primerjavi z N komponentami (proteini). Posledica naj bi bila povečana limitativnost P za bakterijske združbe.

Osnovno hipotezo, katero smo podali pred začetkom eksperimentalnega dela, smo kasneje razvili in dopolnili v posamezne delovne hipoteze povezane z različnimi analiznimi pristopi.

Osnovni analizni pristopi in delovne hipoteze:

- Analiza P_{cel} v matriksu sluzi-G, matriksu sluzi-P in intersticijski vodi-G

Pričakovali smo, da bo v intersticijski vodi-G manj P kot v matriksu sluzi-G, saj menimo, da je v intersticijski vodi manj s P bogate organske snovi, hkrati pa je v matriksu sluzi-G verjetno manj anorganske snovi (predvsem različne soli). Predvidevali smo, da je v bolj »svežih« matriksih sluzi več P kot v zrelejših, saj smo menili, da se bo med razvojem matriksa zniževala količina P na račun razgrajevanja manj stabilnih sestavin in izločanja P v okolno vodo.

- Analiza sproščanja P_{anorg} v vzorcih matriks sluzi-G in intersticijska voda-G med encimsko razgradnjo

V drugem pristopu smo želeli opazovati kinetiko sproščanja P_{anorg} v raztopino kot posledico delovanja dodanih izbranih encimov (alkalne fosfataze, proteinaze K, lipaze, amilaze in zmesjo encimov pankreatina) in hkrati primerjali kinetiko sproščanja P_{anorg} kot posledico delovanja že prisotnih izvenceličnih (ekstracelularnih) encimov mikrobov vzorca. Pričakovali smo, da bomo pri vseh razgradnjah z različnimi encimi opazili povečano koncentracijo P zaradi delovanja dodanega encima in da bomo hkrati opazili tudi delovanje že prisotnih izvenceličnih encimov mikrobov vzorca. Menili smo, da se bo zaradi visoke aktivnosti dodanega encima najprej sprostil lažje dostopen P, kasneje pa naj bi se s pomočjo delovanja drugih že prisotnih encimov vzorca začel sproščati še težje dostopen P. Pričakovali smo, da se bo največ P sprostilo med razgradnjo s pankreatinom, saj encimi v njem hitro in učinkovito razgrajujejo organsko snov in sproščajo hranila, kar bo omogočilo hitro sprostitev tako lažje kot težje dostopnega P. Pričakovali smo, da bo alkalna fosfataza sprostila manjše količine P, najmanjšo učinkovitost pa smo pričakovali pri ostalih encimih.

- Analiza sproščanja ogljikovih hidratov v matriksu sluzi-G med encimsko razgradnjo

Glede na predhodne ugotovitve (Mohar, 2006), da se pri encimski hidrolizi (pri dodatku specifičnih encimov) iz zamreženega organskega matriksa makroagregatov sproščajo sočasno vse glavne organske komponente (ogljikovi hidrati, protein, lipidi), smo želeli preučiti, ali to velja tudi za primer alkalne fosfataze. Pri tem pristopu smo želeli opazovati kinetiko sproščanja monosaharidov v raztopino kot posledico delovanja dodanega encima alkalne fosfataze in hkrati primerjati kinetiko sproščanja monosaharidov kot posledico delovanja že prisotnih izvenceličnih encimov mikrobov v vzorcu. Pričakovali smo, da bomo pri vseh razgradnjah z alkalno fosfatazo opazili povečano koncentracijo

monosaharidov ter da bomo hkrati opazili tudi delovanje že prisotnih izvenceličnih encimov mikrobov v vzorcu. Menili smo, da se bo zaradi visoke aktivnosti dodanega encima najprej sprostil lažje dostopni P, kasneje pa naj bi se s pomočjo delovanja drugih že prisotnih encimov začel sproščati še težje dostopni P.

- Analiza P_{cel} v frakcioniranih morskih makroagregatih med mikrobno razgradnjo

Z zadnjim pristopom smo nadaljevali delo T. Marinšek (2008). Omenjena raziskava je obravnavala naravno mikrobno razgradnjo organske snovi v intersticijski vodi med štiritedensko inkubacijo v rastni komori v temi na stresalniku pri 25 °C. V frakcijah, ki so ostale po poskusu, smo analizirali P_{cel} . Pričakovali smo, da bomo na začetku inkubacije največ P izmerili v frakciji z največjo molsko maso (UF1/F), tj. v filtratu po ultrafiltraciji skozi membrano z velikostjo por 30.000 MWCO (MWCO – molecular weight cut off oziroma izključitvena molska masa v daltonih), ob koncu inkubacije pa največ v frakciji z najnižjo molsko maso oziroma v filtratu po ultrafiltraciji skozi membrano z velikostjo por 5000 MWCO (UF3/O). Menili smo, da bo ob začetku poskusa večina P v organskih kompleksih, P pa se bo med inkubacijo sproščal v raztopino zaradi razgradnje z izvenceličnimi encimi prisotnih mikrobov. Pričakovali smo, da se bo razmerje C_{org}/P_{cel} zmanjševalo med inkubacijo zaradi razgradnje organske snovi z izvenceličnimi encimi mikrobov. Poleg tega smo menili, da bomo najvišja razmerja C_{org}/P_{cel} zasledili v največjih frakcijah, ker smo pričakovali, da je v večjih makroagregatih večja vsebnost C_{org} hkrati pa manj P. Pričakovali smo tudi, da se bo razmerje celotnega dušika N_{cel}/P_{cel} med inkubacijo zmanjševalo, saj smo pričakovali razgradnjo organske snovi z izvenceličnimi encimi mikrobov. Poleg tega smo menili, da bomo najvišja razmerja N_{cel}/P_{cel} zaznali v frakcijah z največjo molsko maso, ker smo pričakovali, da je v teh prisotna večina N_{cel} , hkrati pa manj P.

2 PREGLED OBJAV

2. 1 FOSFOR

2. 1. 1 Biološki pomen P

P je esencialno hranilo in je izredno pomembno v celičnem metabolizmu (adenozintrifosfat (ATP), adenzindifosfat (ADP), fosfoproteinih, fosfolipidih) in reprodukciji (deoksiribonukleinska kislina (DNA), ribonukleinska kislina (RNA)). Nukleinske kisline predstavljajo 76 % organskega fosforja (P_{org}) v celicah (Minear, 1972; Deflaun in sod., 1987; Karl in Bailiff, 1989). V gram-pozitivnih bakterijah je prisoten v teihoični in teihuronski kislini, v rastlinah pa v inozitol fosfatu (fitin). V oksidacijskem številu +5 tvori anhidride (v obliki organskih in anorganskih pirofosfatov, z amini, organskimi kislinami, sulfatom). V vezi v P anhidridu je shranjena biokemijsko pomembna energija (ATP), vez je odporna proti hidrolizi (zaradi negativnih nabojev pri nevtralnem pH), in verjetno je to vzrok za evolucijsko izbiro te spojine kot prenašalca kemijske energije v metabolizmu (Faganeli, 2008).

2. 1. 2 Oblike P

P najdemo v naravi v različnih oblikah: raztopljeni in suspendirani obliki oz. anorganski in organski obliki (Aydin in sod., 2009). Na Zemlji prevladuje P v obliki mineralov, kot so apatiti (floro- ali kloro-), vivianiti, strengit in fosforit. Apatit je največji rezervoar P na Zemlji in je relativno slabo topen v vodi. Trenutna količina P v zemeljski skorji je približno 0,12 %. Glavne oblike P v naravnih vodah so orto-, meta-, piro- in polifosfati ter različne P-vsebujoče organske snovi (Aydin in sod., 2009). Najbolj pogosta oblika P v naravnih vodah so monoprotonirani ali diprotonirani ortofosfati, ki so hkrati biološko najbolj dostopna oblika P (Worsfold in sod., 2008). P je v biosferi pretežno prisoten v obliki derivatov anorganskih in organskih fosfatov. Pomemben izvor organskih P spojin v naravi je razgradnja živalske in rastlinske organske snovi (Faganeli, 2008).

2. 1. 3 Kroženje P

Globalno kroženje P je pretežno geokemijsko, saj vključuje preperevanje, transport in sedimentacijo. Glavni procesi v kroženju P niso posledica mikrobnih procesov, kot velja za večino drugih pomembnih bioelementov. Najpomembnejši rezervoar P je zemeljska skorja, ker so P spojine le malo hlapne in v vodi malo topne. Zato je le malo raztopljenega P v rekah, jezerih in morju. Med rezervoarji potekajo le tokovi P, vezanega v delcih v zraku (aerosol) in v vodi, ki so danes še slabo poznani in so odvisni od časovnih in prostorskih variacij in vsebnosti P v delcih. Majhna topnost P mineralov je vzrok, da večina P, deponiranega v sedimentih in prsti (tudi tam, kjer ga je dosti) rastlinam in živalim ni na razpolago za rast in je pogosto omejujoč dejavnik rasti (Faganeli, 2008). P_{cel} na kopnem izvira iz preperevanja apatita. Čeprav je vsebnost P_{cel} v prsti visoka, je le majhna količina P na razpolago organizmom. Na kopnem in v vodnih okoljih organizmi uspevajo le zaradi

uspešnega recikliranja P_{org} . Glavni tok P v globalnem kroženju poteka z rekami in je najbrž večji kot v predindustrijskem obdobju zaradi erozije, onesnaževanja in uporabe gnojil ter detergentov (Faganeli, 2008). P se nalaga v oceanskih sedimentih, ki predstavljajo največji rezervoar v površinski plasti Zemlje (Faganeli, 2008). Globalno kroženje P je edinstveno med biogeokemijskimi kroženji pomembnejših elementov, ker nima plinaste komponente (razen fosfina) (Faganeli, 2008). Prenos preko atmosfere v prašnih delcih in morskih aerosolih je v primerjavi z drugimi procesi v globalnem kroženju P manj pomemben (Faganeli, 2008).

2. 1. 4 Pomembnost P v morju

P ni le pomembno hranilo, predstavlja omejujoč dejavnik primarne produkcije v obalnih morjih (Sredozemlje, Baltik) (Aydin in sod., 2009). Onesnaženje zaradi obsežnega vnosa P kot posledica gnojenja, industrijskih in gospodinjstevskih odpadnih voda povzroča preveliko količino P v vodnih okoljih (Aydin in sod., 2009). To vodi do produkcije nekontrolirane količine vegetativne biomase in prevladovanja procesov gnitja, kar vse spreminja ekološke razmere v morju. Zaradi tega je določanje P tako v raztopini kot v suspendiranih delcih v talnih in površinskih vodah ter odplakah bistveni del kontrole vodne kakovosti (Zaporozhest in sod., 2007). Ker so različne oblike P organizmom različno dostopne, moramo za oceno nevarnosti eutrofikacije v morskih sistemih poleg vsebnosti P_{cel} poznati tudi vsebnosti v raznih drugih sestavinah. Za opis različnih oblik, v katerih se pojavlja P v sedimentih, je zelo razširjena kemijska sekvenčna ekstrakcija (Hanrahan in sod., 2005; Wang in sod., 2006; Aviles in sod., 2006; Aviles in sod., 2005; Porrello in sod., 2005; Ruiz-Calero in Galceran; 2005, Das in sod., 2001; Cha in sod., 2005; Worsfold in sod., 2005; Apostolaki in sod., 2007; Søndergaard in sod., 2003; Ribeiro in sod., 2008). Fosfati, ki so najbolj pogosta oblika P v okolju, ki je lahko dostopna za asimilacijo, se tradicionalno uporabljajo kot gnojilo (Aydin in sod., 2009). Poleg tega fosfate in druge P spojine pogosto uporabljajo v detergentih in tudi prehranskih dodatkih (Aydin in sod., 2009). Vnos P v morje je poleg rečnih vnosov največkrat posledica erozije prsti zaradi kmetijstva in izsekavanja gozdov.

2. 1. 5 Biološke pretvorbe P

2. 1. 5. 1 Mineralizacija P

P_{org} večinoma ni direktno uporaben za organizme, zato se mineralizira s hidrolizo (učinkovanje/aktivnost fosfataz). 70–80 % mikrobov lahko razgrajuje P_{org} s hidrolizo. Ti organizmi izločajo različne fosfataze, ki so bolj ali manj specifične za določen substrat. Za sproščanje P iz fitina sodeluje encim fitaza, za sproščanje P iz nukleinskih kislin nukleaza, iz nukleotidov pa nukleotidaza. Pri sproščanju P iz fosfoproteinov, fosfolipidov, ribitola in glicerol fosfata sodelujeta fosfomonoesteraza (hidroliza estra) in fosfodiesteraza (hidroliza diestra) (Ruttenberg, 2004; Faganeli, 2008).

2. 1. 5. 2 Sproščanje P z mineralov

Malo topni fosfati v naravi, apatit ($(\text{Ca})_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$), $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (strengit) in $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (vivianit), se raztapljajo z mikrobno aktivnostjo. Ta obsega raztapljanje z anorganskimi in organskimi kislinami (npr. *Thiobacillus* sp., *Penicillium* sp.), kompleksiranje (npr. *Arthrobacter*, *Pseudomonas*) kationov s kelatorji (npr. citrat, oksalat, glikonat, laktat), redukcijo železa(III) v železo(II) (anaerobna respiracija) ali z vodikovim sulfidom, ki reagira z železom v železovem fosfatu in tvori železov sulfid (npr. *B. megatherium*). Mikrobno raztapljanje poteka v prsti (pomembno v rizosferi, kjer nastajajo kisline in ligandi), zato je pomembno gnojenje z malo topnimi fosfati, ki se le počasi sproščajo (Faganeli, 2008).

2. 1. 5. 3 Mikrobno obarjanje, redukcija ali oksidacija P zvrsti

Mikrobna imobilizacija P poteka z nastankom malo topnih soli (bolj pomembno v morju) ali pa z asimilacijo v celici (bolj pomembna v tleh in sladkih vodah) (Faganeli, 2008). Mikrobna redukcija fosfata v fosfin (PH_3) je prisotna (nekateri avtorji dvomijo) v prsti in odplakah in donorja elektronov sta lahko manitol in glukoza (Faganeli, 2008). Reducirane zvrsti P se aerobno in anaerobno bakterijsko oksidirajo: npr. *Bacillus caldolyticus* oksidira PO_2^{3-} v PO_4^{3-} aerobno (encimsko z NAD^+ in dihalno verigo) in ga nato asimilira. Podobno aktivne so še glive. Bakterijska oksidacija PO_2^{3-} v PO_4^{3-} poteče tudi anaerobno, kar je bilo verjetno pomembno v prvotni reducirani zemeljski atmosferi (Faganeli, 2008).

2. 1. 5. 4 Mikrobne pretvorbe težje topnih oblik P v bolj topne

Bakterije, ki pretvarjajo težje topne oblike P v bolj topne, so široko razširjene v različnih morskih okoljih, a v obalnih predelih je njihova gostota nekoliko višja kot drugje v morju (De Souza in sod., 2000). Produkcija alkalne fosfataze in sposobnost raztapljanja P_{anorg} sta povezani (De Souza in sod., 2000). Med prostimi encimi ima izvenzelična alkalna fosfataza, ki je široko razširjena v morski vodi in sedimentih, verjetno pomembno vlogo pri kroženju P (Kobori in Taga, 1979).

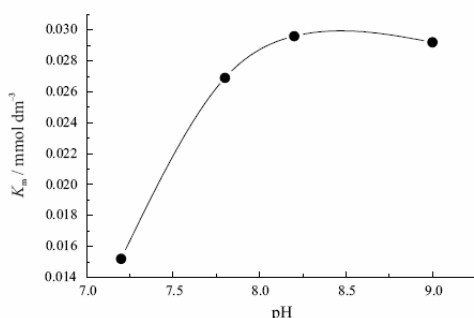
2. 1. 6 Alkalna fosfataza

Alkalna fosfataza je ekstracelularni encim, ki omogoča izkoriščanje fosfatnih monoestrov kot izvorov anorganskega fosfata, ki je potreben za vzdrževanje celičnega metabolizma (Orhamović in Pavela-Vrančič, 2000). Katalitične lastnosti tega encima so intenzivno preučevali v vodnih okoljih, da bi lahko opisali njegov vpliv na kroženje P v naravnih vodnih sistemih (Orhamović in Pavela-Vrančič, 2000). Alkalna fosfataza je prisotna v skoraj vseh organizmih od alg, bakterij in protozojev do višjih rastlin in živali, hkrati pa tudi kot prosti encim v naravnih vodah in sedimentih (Jansson in sod., 1988).

Biosinteza alkalne fosfataze je odvisna od koncentracije anorganskega fosfata v mediju (Horiuchi in sod., 1959; Toriani, 1960) in njeno aktivnost pogosto uporabljamo kot indikator porabe anorganskega fosfata v planktonski združbi (Thingstad in Rassoulzadegan, 1995; Waiser in Robats, 1995; Rivkin in Anderston, 1997; Thingstad in

sod. 1998; Zhary in Robarts, 1998). Aktivnost alkalne fosfataze lahko določamo z merjenjem hitrosti hidrolize zmesi fosforja, ki je prisoten v naravnem okolju (Orhamović in Pavela-Vrančič, 2000). To metodo pa lahko uporabimo tudi za merjenje koncentracije P v komponenti, ki je podvržena aktivnosti alkalne fosfataze (Orhamović in Pavela-Vrančič, 2000).

Encimska reakcija inaktivacije alkalne fosfataze je reakcija prvega reda s hitrostno konstantno $k = 0,42 \text{ d}^{-1}$ in $t_{1/2} = 1,64$ (Orhamović in Pavela-Vrančič, 2000). Odvisnost aktivnosti alkalne fosfataze od pH je vidna na Sliki 1, kjer se lepo vidi drastično zmanjšanje aktivnosti encima (zmanjšanje K_m) že pri $\text{pH} = 7,3$, optimalen pH za delovanje alkalne fosfataze pa je 8,2 (Orhamović in Pavela-Vrančič, 2000).



Slika 1: Odvisnost vrednosti K_m proste fosfataze glede na pH z dodatkom $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris pufra (Orhamović in Pavela-Vrančič, 2000)

2. 2 SESTAVA IN ORGANIZACIJA ORGANSKE SNOVI V MORJU

2. 2. 1 Organska snov v morju

Organsko snov v vodnih okoljih lahko razdelimo po velikosti delcev na suspendirano (POM – particulate organic matter) in raztopljeno (DOM – dissolved organic matter) organsko snov. Suspendirana snov ostane pri filtriranju skozi filter z velikostjo por $0,45 \mu\text{m}$ na filtru in jo dogovorno opredelimo kot snov v velikostnem razredu od $0,45\text{--}250 \mu\text{m}$. Raztopljena snov gre pri tem skozi filter in vključuje še mnoge koloidne delce (npr. virusi, majhne bakterije). Koloidi so definirani z velikostnim razredom med 1 nm in $1 \mu\text{m}$ (Santschi in sod. 1997). Suspendirano in raztopljeno frakcijo sestavljata anorganska in organska komponenta, ki sta lahko avtohtonega in alohtonega (npr. kopenskega) izvora.

POM, ki je predvsem produkt primarne produkcije, se večinoma reciklira v površinski plasti, manjši delež površinske POM pa tone v globino in se končno vključi v sedimentirano organsko snov (biološka črpalka). Površinska morska POM je kompleksna zmes živih organizmov in avtohtone odmrle POM, ki jo imenujemo detrit (Parsons in sod., 1984). Živi del POM ima ponavadi majhno biomaso, ki jo desetkratno presega masa detrita (Pomeroy, 1980).

DOM je večinoma sestavljena iz biopolimerov. Čeprav so prisotni v mikromolarnih koncentracijah, dosežejo skupno maso $700 \times 10^{15} \text{ g}$ ogljika (Ding in sod., 2008). DOM ima

daljši zadrževalni čas in je na splošno bolj odporna na razgradnjo kot POM (Hedges, 1992). Morska DOM je avtohtonega ali alohtonega izvora. Alohtona DOM izvira predvsem iz rečnih vnosov, kjer predstavlja večjo komponento (60 % rečne organske snovi) (Mecozzi in sod., 2009), lahko pa prehaja v morje tudi preko atmosfere. Avtohtona DOM izvira predvsem iz izločanja fitoplanktona in trofičnih interakcij, ki vodijo v izločanje DOM.

DOM najpogosteje izražamo kot raztopljeni organski ogljik (DOC – dissolved organic carbon). DOM sestoji večinoma iz DOC, poleg tega pa sta v DOM tudi raztopljeni organski dušik- N_{org} (DON – dissolved organic nitrogen) in raztopljeni organski fosfor – P_{org} (DOP – dissolved organic phosphorus). DOC igra pomembno vlogo v kroženju ogljika (C). Je največji rezervovar organkega ogljika (C_{org}) v morju in s tem glavna sestavina morskih prehranjevalnih verig (Packard in sod., 2000). Bakterije lahko izrabijo le manjši variabilni del DOC (Søndergaard in Worm, 2001), zato je koncentracija DOC v morju rezultat produkcijskih in pretvorbenih procesov, ki potekajo v različnih plasteh vodnega stolpca (De Vittor in sod., 2008). Njegovo globinsko (vertikalno) porazdelitev določa kroženje vodnih mas v bazenu (npr. v severnem Jadranu; Santinelli in sod., 2002). Raziskovanja sezonske porazdelitve DOC v Tržaškem zalivu so pokazale variacije v obdobju petih let v razponu 50 μM do 194 μM z letnimi medianami od 88 μM do 98 μM (De Vittor in sod., 2008). V letih od 1999 do 2002 se je pri koncentracijah DOC kazala očitna letna periodičnost z minimumom pozimi in maksimumom v poznem poletju, tega pa niso opazili leta 2003, verjetno zaradi suše, ki je zaznamovala celotno leto (De Vittor in sod., 2008).

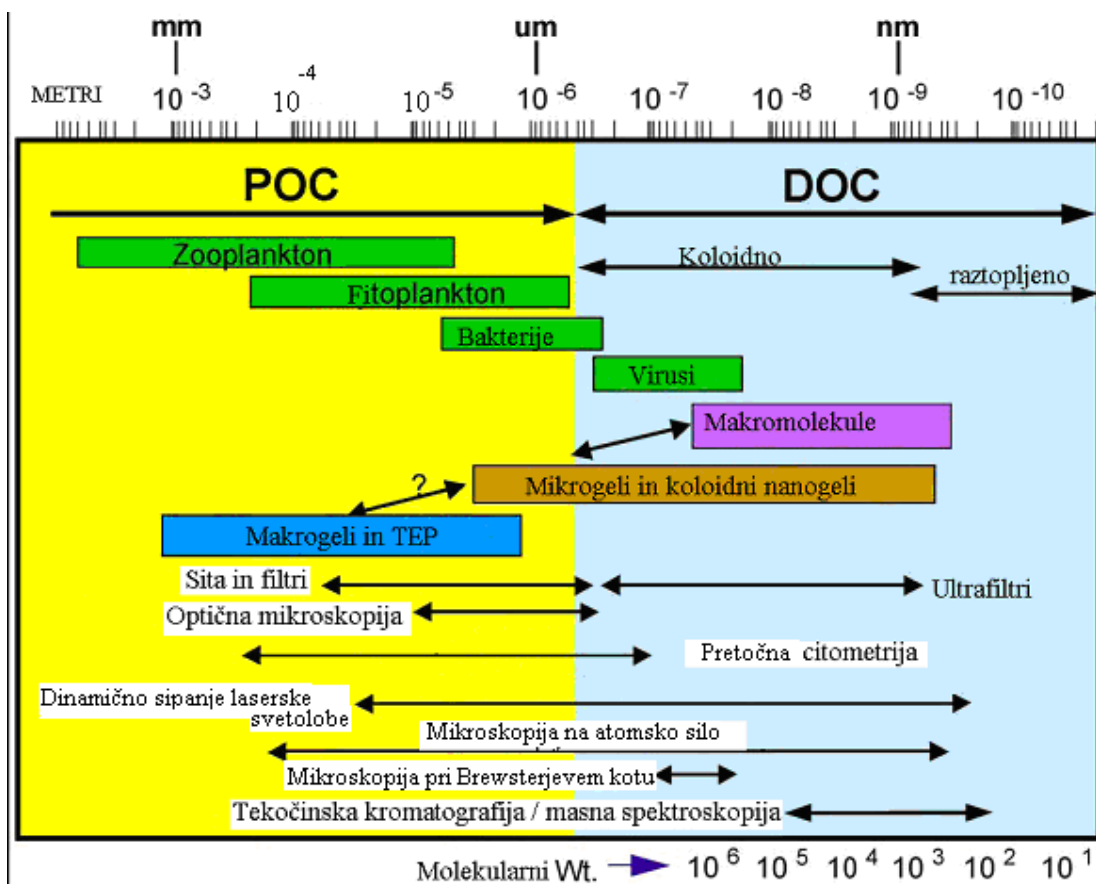
Prozorni eksopolimerni delci (TEP – transparent exopolymeric particles) so razred delcev, ki so ga opisali Alldredge in sod. (1993). Ker so v morski vodi prozorni (Mari in Dam, 2004), jih opazujemo z obarvanjem z barvilom, specifičnim za polisaharide v sluzi – Alcian blue (Gordon, 1970). TEP naj bi nastajali s koagulacijo DOM ali koloidne organske snovi (COM – colloidal organic matter), ki jo izločajo fitoplankton in bakterije (Alldredge in sod., 1993; Kiorboe in Hansen 1993; Mari in Burd, 1998), in ga lahko potrošijo praživali (Shimeta, 1993; Tranvik in sod., 1993) ali kopepodni rakci (Carman, 1990; Decho in Moriarty, 1990). Zato predstavljajo pomembno pretvorbena pot DOC v morju in alternativo mikrobni zanki (Mari X., 1999). Fizikalna struktura TEP je podobna visokorazpršenemu matriksu fibril, kjer 99 % mase TEP predstavlja voda (Sutherland, 1972). TEP so različnih velikosti, in sicer so lahko v premeru manjši od 2 μm in večji od 100 μm (Alldredge in sod., 1993; Kiorboe and Hansen 1993). Njihova koncentracijska in velikostna porazdelitev v oceanu je verjetno povezana s koncentracijo in sestavo fitoplanktona (Passow in Alldredge, 1994). Mari in Kiørboe (1996) poročata, da so vsi TEP kolonizirani z bakterijami, ki so bodisi pritrjene na površino ali pa prisotne v notranjosti TEP. Koncentracija bakterij je povezana z velikostjo delcev (Mari in Kiorboe, 1996). Prehod organske snovi od DOM do POM preko TEP poteka z mehanizmi trkov (Mari in sod., 2007). Trki so predvsem odvisni od koncentracije TEP in turbulence, za adhezijo pa je pomembna lepljivost prekurzorjev TEP (Mari in sod., 2007).

Določene vrste fitoplanktona sproščajo TEP med cvetenjem, kar lahko vodi do nastanka velikanskih gigagelov (Mecozzi in sod., 2001; Ciglenečki in sod., 2000). TEP so posebej

pomembni v sedimentacijskih procesih in kroženju C v morju, saj tvorijo »lepilo« morskih makroagregatov suspendirane snovi in so verjetno kritični za tvorbo morskega snega in agregacij pri »cvetenju« diatomej (Alldredge in sod., 1993; Logan in sod., 1995; Passow, 2002; Passow 2000). TEP so lahko esencialni za sprožitev agregacije delcev pri nizki koncentraciji biomase (Skoog in sod., 2008), ker se tvorijo direktno iz DOC predstavljajo potencialno zelo pomembno pot, iz katere se lahko DOC pretvori v POC, ki nato sedimentira.

2. 2. 2 Hidrogel in različne teorije nastanka gelov

Hidrogel sestavlja tridimenzionalno polimerno mrežo v vodi (Verdugo in sod., 2004). Vključena voda prepreči razpad mreže ter ustvarja mikrookolja, ki so v termodinamskem ravnotežju z okolnim medijem (Verdugo in sod., 2004). Geli imajo edinstveno obliko molekularne organizacije, v kateri so polimerne verige med sabo povezane s kemijskimi ali fizikalnimi interakcijami, ki ohranjajo te verige v stabilni soseski (Tanaka, 1992). Kemijske in fizikalne značilnosti posamezne polimerne mreže in dielektričnih lastnosti vode določajo značilnosti in kemijsko reaktivnost gelske mreže in tudi način interakcije z ujetjo vodo, manjšimi organskimi ali kovinskimi ioni in živimi organizmi (Verdugo in sod., 2004). Nedavna odkritja so razkrila, da so polimerni geli obsežni in pomembni v mikrobnih zanki, sedimentacijskih procesih, biogeokemijskem kroženju in biokemiji ogljikovih hidratov in dinamiki delcev v morju (Verdugo in sod., 2004). Morski gel vključuje celoten velikostni spekter od koloidov do delcev velikosti več 100 μm , ki so rezultat povezovanja velikega števila polimernih verig DOM (Verdugo in sod., 2004). Torej je vsaka delitev organske snovi, ki temelji na velikosti, zgolj operativna in le malo odseva funkcionalne lastnosti (Verdugo in sod., 2004). Geli predstavljajo mikrookolja v nanoskali z različnimi fizikalnimi, kemijskimi in biološkimi lastnostmi glede na tiste v polimerih DOM, ki gele gradijo (Verdugo in sod., 2004). Velikostni razredi morskih gelov so prestavljeni na Sliki 2.



Slika 2: Velikostni razredi organske snovi v morju in metode njihovega določanja (Verdugo in sod., 2004)

a) Teorija tvorbe gela po Verdugu in sod. (2004)

Ker velike organske molekule tvorijo bolj stabilne samosestavljajoče se mreže, spada večina gelotvornih biopolimerov med makromolekularne koloide, čeprav vsi koloidi ne tvorijo gelov. Vsi znani polimeri, ki jih sproščajo bakterije in alge, so hidrokoloide z veliko vode. Mnogi od teh lahko tvorijo gele, predvsem ob prisotnosti kationov, kot so K^+ in Ca^{2+} ioni. Naboj aniona in vrsta funkcionalne skupine pa pogosto določata značilnosti nastanka gela in površinsko aktivnost. Prosta polimerna DOM verjetno doseže kritično koncentracijo na meji voda–zrak, kjer nastajajo nanogeli. Ti lahko nato v vodi difundirajo in se medsebojno »prilepijo«, s čimer nastajajo mikrogeli.

Mikrogeli vsebujejo polisaharide, proteine in nukleinske kisline, ki se nekovalentno povezujejo v polimerne mreže z naključno strukturo, ti pa stabilizirajo ionske vezi s Ca^{2+} . Zaradi ohlapno povezane topologije ostajajo taki geli v reverzibilnem ravnotežju sestavljanja in razpadanja. Sestavijo se spontano, a se lahko tudi spontano razstavijo in v odsotnosti Ca^{2+} ionskih vezi tudi razpršijo. Kot odgovor na spremembe pH in temperature lahko geli preidejo v kondenzirano fazo z močno povišanim sedimentacijskim koeficientom (Chin in sod., 1998 a). Nedavna odkritja, tako v laboratorijskih kakor tudi raziskavah *in situ* kažejo, da 10–25 % prostih biopolimerov DOM ostane v reverzibilnem samoorganizacijskem ravnotežju, kar ustvarja porozno mrežo mikroskopskih hidrogelov

(nanogeli in mikrogeli) (Stordal in sod., 1996; Guo in Santshi, 1997; Chin in sod., 1998 b). Nanogeli in mikrogeli lahko rastejo s ponavljajočimi trki, po katerih ostanejo delci združeni in tvorijo gelu podobne delce, kot so TEP v velikostnem razredu POM (Wells in Godberg, 1994; Kepkay, 1994).

Verdugo in sod. (2004) so predlagali dve glavni hipotezi nastanka mikro- in makrogelov: (i) agregacija polimernih fibril in koloidov s trki, ki ustvarjajo večje delce, in (ii) spontano sestavljanje polimerov DOM v večje polimerne gele. Oba mehanizma podpirajo teoretične in empirične raziskave. Po hipotezi trkov morski agregati nastajajo s trki in »lepljenjem« manjših delcev. Večji morski makroagregati nastanejo s ponavljajočimi trki in združitvami. Po tej hipotezi je hitrost agregacije funkcija velikosti, koncentracije in lepljivosti koloidnih delcev in jakosti fizikalnih interakcij oziroma medsebojnih trkov. Po hipotezi polimerizacije gelov nastaja polimerna mreža, ki tvori matriks gelov s spontanim ali sproženim sestavljanjem polimernih verig (Doi in Edwards, 1984). Združevanje se po tej teoriji zgodi, ko medverižna razdalja omogoča in dopušča medsebojne interakcije polimerov in prečne povezave zaradi vpostavitve kovalentnih, elektrostatskih, van der Waalsovih, vodikovih in hidrofobnih vezi. V polielektrolitski mreži je sestavljanje odvisno od pH, ionske moči, dielektričnih lastnosti in koncentracije ter fizikokemičnih lastnosti polimernih verig.

b) Hipoteza nastanka gela po Dingu in sod. (2008)

Gelske plasti so tudi sestavine izvenceličnih polimernih substanc (EPS-extracellular polymeric substances) morskih mikroorganizmov (Decho, 1990). EPS sproščajo v morsko vodo bakterije in fitoplankton. Ding in sod. (2008) so v raziskavi pokazali, da že nanomolarne koncentracije EPS, ki jih sprošča bakterija *Sagittula stellata*, lahko vodijo do nastanka DOM. Nastala mreža DOM kaže značilnosti hidrofobnih interakcij. Bakterijski eksopolimeri so verjetno pomembni za preživetje teh bakterij v oligotrofnih okoljih, ki pogosto vsebujejo le mikromolarne koncentracije substrata. Sproščanje majhnih koncentracij eksopolimerov lahko sproži ujetje in koncentriranje substrata z nastankom s hranili bogatih mrež DOM, v katerih se naselijo bakterije.

c) Hipoteza nastanka gela po Mecozziju in sod. (2005, 2008 in 2009)

Mecozzi in sod. (2005) menijo, da je nastanek morskih makroagregatov različica naravnega humifikacijskega procesa, do katerega pride takrat, ko je razgradnja organske snovi počasnejša od njenega nastanka. Podrobne študije kemijske sestave kažejo, da so morski makroagregati kompleksna mešanica ogljikovih hidratov, proteinov in lipidov, ki imajo tipično strukturo humina, tj. netopne komponente morskih huminskih snovi. Anorganska komponenta, prisotna v morskih makroagregatih, je prav tako pomembna – primer so interakcije med ogljikovimi hidrati in kalcijem, ki stabilizirajo morske makroagregate (Leppard, 1995). Strukturna podobnost med morskimi makroagregati in huminom nakazuje povezavo med nastankom morskih makroagregatov in specifičnim humifikacijskim procesom, imenovanim model razgradnje biopolimerov in polimerizacije (Ishiwatari, 1992). Model opisuje, da se kroženje organske snovi prične z bakterijsko

razgradnjo kompleksnih molekul, kot so polisaharidi, proteini in lipidi rastlinskega ali živalskega izvora, v preproste molekule, npr. aminokislino, oligosaharide in monosaharide (Mecozzi in sod., 2005). Te majhne in preproste molekule nato hitro reagirajo med saboj, kar ustvari nove spojine z visoko molsko maso (Mecozzi in sod., 2005). Ta model bi lahko razložil prehod iz morskega snega in morskega hidrogela v morske makroagregate (Fogg, 1995; Leppard, 1999). Pri tem gre za sinergistične učinke večih hidroloških, bioloških in klimatskih razmer v vodnem stolpcu, ki podpirajo nastanek struktur, kot so morski makroagregati (Mecozzi in sod., 2005).

Pri nizki ionski moči in visokem pH prevladujejo med delci organske snovi elektrostatični odboji. Ti so posledica negativno nabitih skupin na njihovi površini (ki ne podpirajo agregacije). In obratno, pri visoki ionski moči in nizkem pH (zaradi anoksičnih razmer) so elektrostatični odboji zanemarljivo majhni, zato se agregacija poveča. To razloži dejstvo, da se v anoksičnih razmerah z lahkoto oblikujejo sintetični morski makroagregati (Mecozzi in sod., 2008). Prisotnost visokih koncentracij dvovalentnih kationov (npr. Cu, Pb, As) vodi do interakcij med negativno nabitimi polarnimi skupinami ogljikovih hidratov in proteinov (a ne lipidov) s kovinami, kar vodi v pojav morskih makroagregatov. Raziskave tudi kažejo, da so interakcije med kovinskimi ioni (Ca^{2+} , Mg^{2+}) s karboksilno skupino uronske kisline pomembni pri nastajanju morskih makroagregatov (Mecozzi in sod., 2009).

2. 2. 3 Morski makroagregati

Morski makroagregati so hidrogeli, ki spadajo v velikostni razred POM. So živa struktura, v kateri potekajo razgradni procesi zaradi prisotnosti različnih mikroorganizmov, hkrati pa se le-ta sam vzdržuje in ohranja. Lahko rečemo, da je gel v reverzibilnem ravnotežju nastajanja in razpadanja. Zato morske makroagregate sestavljata poleg POM tudi DOM in COM. Morski makroagregati predstavljajo mikroorganizmom številne mikrohabitate/mikrookolja (aerobne in anaerobne), površino za pritrjevanje, substrat za prehranjevanje, zaščito pred plenilci in mesta velikih količin potrebnih hranil (Verdugo, 2004).

2. 2. 4 Cvetenje morja

Raznovrstne biološke pojave v morju, ko se masovno namnoži več milijonov celic morskih enoceličnih organizmov v litru morske vode, kar ima škodljive posledice za ekosistem in ljudi, strokovno poimenujemo škodljiva cvetenja alg (HAB-harmful algal bloom) (Mozetič in sod., 2006). Povzročajo jih okrog 400 vrst fitoplanktona (fitoplankton so 2–200 μm veliki fotosintetski organizmi, ki lebdi v morski vodi) (Mozetič in sod., 2006).

Škodljiva cvetenja razvrstimo v tri velike skupine (Mozetič in sod., 2006):

1. Rdeče plime – pri tem pojavu se vrste tako namnožijo, da obarvajo morski vodo rdeče, zeleno, rjavo ali belo. V glavnem so neškodljiva, v izrednih primerih pa lahko privedejo do pogina rib in nevretenčarjev zaradi pomankanja kisika.

2. Cvetenja strupenih vrst, katerih strupi se prenašajo skozi prehanjevalno verigo, zato so lahko človeku nevarne ob zaužitju morske hrane. Povzročajo diareične, paralitične ali amnezijske zastrupitve s školjkami.

3. Cvetenja tistih vrst, ki sicer niso nevarna za ljudi, vendar povzročajo poškodbe na škrgah rib in posledično njihov pogin.

2. 2. 5 Morski sneg

“Morski sneg” so v morski vodi lebdeči makroskopski (očesu vidni) delci/kosmiči oz. agregati (premer > 0,5 mm; Fowler in Knauer, 1986), ki predstavljajo pomembno komponento posedajoče se in suspendirane snovi v morju. Podobne amorfne agregate opazamo tudi drugih vodnih okoljih (rečni in jezerski sneg) (Alldredge in Silver, 1988; Simon in sod., 2002). So del biološke črpalke, ki prenaša C v obliki delno razgrajene organske snovi v globino oceana, kjer na ta način sedimentira majhen delež primarne produkcije z osvetljenega dela vodega stolpca. Večinski delež primarne produkcije pa se reciklira med tonjenjem delcev – razgradni procesi v njih predstavljajo in so »vroče točke« mikrobne aktivnosti v vodi.

2. 3 SLUZENJE MORJA V SEVERNEM JADRANU

2. 3. 1 Značilnosti področja raziskave

2. 3. 1. 1 Oris področja raziskave

Tržaški zaliv v severnem delu Jadranskega morja je plitek, napol zaprt zaliv, z največjo globino 25 m v centralnem delu (Flander Putrle in Malej, 2008). Tržaški zaliv vključuje Tržiški, Miljski, Koprski in Piranski zaliv. Njegova površina meri okrog 600 km², volumen pa 9 km³. Pomembne značilnosti Tržaškega zaliva so visoke temperaturne variacije (6–26 °C v površinski plasti, 6–20 °C blizu dna) in visoke variacije površinske slanosti (28–38,5), ki sledijo sezonski dinamiki (Flander Putrle in Malej, 2008).

Največji sladkovodni vnosi so v severozahodnem delu zaliva, na slovenski strani pa so sladkovodni vnosi mnogo manjši. Najpomembnejša reka, ki se zliva v Tržaški zaliv, je reka Soča, ki prinaša največji delež hranil (N, P, Si). Druge reke so še Timav, Glinščica, Rižana, Badaševica, Dragonja in Drnica. Njihov pretok je majhen in zaradi hudourniške narave pogojen s padavinami. Poleg omenjenih je zelo pomembna tudi reka Pad, ki se sicer ne izliva v Tržaški zaliv, a lahko sezonsko vpliva na razmere v njem. Sladkovodni vnosi, poleg vnosa hranil, namreč vplivajo na hidrološke lastnosti morja v zalivu (Mingazzini in Thake, 1995).

Pod vplivom zimskih vetrov se vsaj enkrat na leto kotanja severnega Jadrana popolnoma nadomesti z bolj slano vodo z juga, ki priteka ob vzhodni obali Jadrana, medtem ko je vnos

sladke vode reke Pad premaknjen južno ob zahodni obali Jadrana (Mingazzini in Thake, 1995). Spomladi se vodni stolpec pogosto stratificira in se oslajena voda reke Pad premakne proti vzhodu (Mingazzini in Thake, 1995). Ob velikem rečnem vnosu se zapre cirkulacija v severnem Jadranu. Vodna izmenjava takrat poteka večinoma le zaradi longitudinalnih oscilacij morja, ki vnaša slano, s hranili osiromašeno vodo z juga (Mingazzini in Thake, 1995). Severni Jadran lahko postane poleti izoliran in lahko so prisotne številne piknokline (Mingazzini in Thake, 1995). Bibavica v Tržaškem zalivu je sicer med največjimi v Jadranskem morju, kljub temu pa razlika med plimo in oseko ponavadi ni večja od 60 cm. Ob močnejših plimah (zaradi močnih jugozahodnih vetrov in visokega zračnega tlaka) pa lahko morje poplavi, kar vodi v povečan vnos s hranili bogatega materiala v morje.



Slika 3: Tržaški zaliv z lokacijo oceanografske boje (Foto: Arhiv MBP)

Koncentracije P_{cel} (organske in anorganske P spojine) so v slovenskem morju od 0,13 do 0,54 $\mu\text{mol/L}$. Organska frakcija lahko predstavlja tudi 70–80 % P spojin. Koncentracije P_{anorg} (ortofosfata) pa so ponavadi zelo nizke (od 0,01 $\mu\text{mol/L}$ do 0,5 $\mu\text{mol/L}$) ter kažejo velika nihanja v času in prostoru (Orlando Bonaca in sod., 2009).

2.3.1.2. Pojav »sluzenja« morja v Jadranu

Sluzasti morski makroagregati oziroma »sluzenje morja« različnega obsega so se pojavljali v severnem Jadranu v nepravilnih intervalih preko 280 let. Prvi pisani opis izvira iz leta 1729 (Fonda-Umani in sod., 1989 cit. po Turk in sod., 2010), to je pred razvojem industrije in masovnega turizma in eutrofikacije severnega Jadrana. V drugi polovici dvajsetega

stoletja so opazili le majhne lokalne izbruhe. Intenzivne raziskave pa so se začele šele po letu 1988, v pozno spomladanskem in poletnem obdobju je bilo sluzenje prisotno v večji meri leta 1988, 1989, 1991, 1997, 2000, 2002, 2004.

V severnem Jadranu se masovni pojavi morskih makroagregatov ponavadi pojavljajo sezonsko med poletjem, ko je vodni stolpec stratificiran (Flander Putrle in Malej, 2008). Pojav se običajno začne pozno spomladi/zgodaj poleti (močna vertikalna stratifikacija, zaprta cirkulacija) (Degobbis in sod., 1999). Takrat okoljske razmere omogočajo daljše zadrževalne čase organske snovi in njeno kopičenje, posledično pa tudi agregacijo. Pojav morskih makroagregatov je imel največji obseg v prostoru in času med leti, ko so bili tako vertikalni kot horizontalni termohalini gradienti največji (Russo in sod., 2005). Občasno matriks sluzi ostane suspendiran v vodnem stolpcu severnega Jadrana za več mesecev, tj. med poletno sezono stratifikacije (maja do septembra) do jesenskega vertikalnega mešanja vodnega stolpca (Degobbis in sod., 1995; Malej in sod., 1995; Sellner in Fonda Umani, 1999).

Visoka temperatura lahko igra, čeprav sekundarno, pomembno vlogo v pojavu morskih makroagregatov v Jadranu. Pred pojavi morskih makroagregatov so izmerili močno povišanje temperature morske vode (Russo in sod., 2005). Leta 2000 in 2002 (prisotni makroagregati) je bila poleg hitrega dviga temperature izrazita stratifikacija vodnega stolpca tudi z več piknoklinami, pri katerih se organska snov lahko kopiči in agregira (Degobbis in sod., 1995). Hkrati so opazili nenavadno visoko slanost voda v vmesnih plasteh in celo na površju jugovzgodnega dela severnega Jadrana (Russo in sod., 2005). A te variabilnosti vodnega stolpca niso opazili leta 1999 in 2001, ko se morski makroagregati niso pojavili (Russo in sod., 2005). V zimah v letih 2000 in 2002 (pojav morskih makroagregatov) je zaradi izjemno nizkih temperatur nastajala izredno gosta voda, kar pa se ni zgodilo v letih 1999 in 2001 (ni morskih makroagregatov) (Russo in sod., 2005). Gosta hladna voda se je večinoma zadrževala v sloju pri dnu vsaj do pomladi, kar je nadalje prispevalo k stabilizaciji vodnega stolpca (Russo in sod., 2005).

Glede na klimatološke razmere pojav morskih makroagregatov povezujejo z zahodnim jadranskim tokom, ki je bil močan v njihovi odsotnosti in šibak v njihovi prisotnosti (Grilli in sod., 2005 a, b). Druge študije meteoroloških podatkov med pojavom in ponorom morskih makroagregatov v severnem Jadranu kažejo, da povratni anticikloni z brezvetrjem in mirnim morjem podpirajo prisotnost in obsežnost morskih makroagregatov, medtem ko močno nestabilno vreme prispeva k ponoru morskih makroagregatov (Russo in sod., 2005). Morski makroagregati ponavadi nastanejo v oligotrofnih razmerah (Innamorati, 1995). Bližina gladine morja in gostotne mejne površine vodnega stolpca tudi prispevajo k obliki in velikosti morskih makroagregatov v severnem Jadranu (Žutić in Svetličić, 2000).

Opisane okoljske razmere so lahko idealne za sprožitev pojava sluzastih makroagregatov (Mingazzini in Thake, 1995), vendar so le eden izmed dejavnikov, ki prispevajo k razvoju sluzenja morja.

2. 3. 2 Nastanek, razvoj makroagregatov

Nastanek morskih makroagregatov je sestavljen iz procesov preoblikovanja COM v DOM in nato v POM (Kovač in sod., 2002). Pretvorbe makromolekularnega DOM v POM vključujejo povečanje velikosti in spremembe reaktivnosti snovi (Kovač in sod., 2008). Začetni proces nastajanja morskih makroagregatov poteka predvsem v zgornjem delu vodnega stolpca nad piknoklino (De Philipps in sod., 2005). Kljub temu da so opravili že veliko raziskav, tako *in situ* kot *in vitro*, pa te še niso zadostne, da bi lahko v celoti razložili izvor in mehanizem nastanka morskih makroagregatov (Turk in sod., 2010).

Poleg specifičnih razmer v severnem Jadranu mnogi avtorji poudarjajo tudi pomen hranil za razvoj sluzastih makroagregatov. Leta 2004 so v Jadranu v času sluzenja morja v morski vodi opazili višje koncentracije in variabilnost hranil N, P in tudi klorofila *a* (Faganeli in sod., 2009). Omejeno dostopen P omejuje bakterijsko razgradnjo izločkov (Azam in sod., 1999), kar lahko vodi do kopičenja raztopljenih organske snovi in nadaljnje agregacije. Menijo, da je v severnem Jadranu P omejujoč dejavnik primarne produkcije pred in tudi po znatnem zmanjšanju obremenitve reke Pad s hranili (Degobbis in sod., 2005). Eden najpomembnejših korakov, ki vodijo v nastanek morskih makroagregatov, je vsekakor kopičenje makromolekularnega DOM (Penna in sod., 2009).

2. 3. 2. 1 Izvori DOM

Sestava stabilnih izotopov C in N v morskih makroagregatih iz Jadrana je pokazala vrednosti od -17 do -21,3 ‰ $\delta^{13}\text{C}$ in 5 ‰ $\delta^{15}\text{N}$, kar kaže na njihov fitoplanktonski izvor (Posedel in Faganeli, 1991; Faganeli in sod., 1995). Tudi druge raziskave morskih makroagregatov v Jadranu so pokazale, da je fitoplankton pomemben vir morskih makroagregatov (Stachowitsch in sod., 1990; Relevante in Gilmartin, 1990; Degobbis in sod., 1995). Puggnetti in sod. (2005) so pokazali, da lahko določene vrste fitoplanktona (npr. primnezofit *Phaeocystis*) izločajo biološko aktivne snovi, ki lahko zmanjšajo bakterijski privzem in spremenijo mikrobo sestavo. Ti na razgradnjo odporni izločki lahko prispevajo k nastanku in kopičenju morskih makroagregatov.

O pomembni vlogi primneziofitov za nastanek makroagregatov poročata tudi Flander Putrle in Malej (2008). Aprila do junija so v Jadranu v letih pojava morskih makroagregatov (1997, 2000, 2002 in 2004) izmerili visoko abundanco primneziofitov v morskih makroagregatih v zgornjih 10 m vodnega stolpca. V letih brez pojava tega planktona makroagregatov niso opazili. Zaključili so, da je v obdobju pred sluzenjem morja pomemben prispevek primneziofitov, ki imajo verjetno ključno vlogo za začetek pojavljanja morskih makroagregatov (Flander Putrle in Malej, 2008). Pistocchi in sod. (2005 b) pa so pojav morskih makroagregatov v Jadranu leta 1999 in 2001 povezali z dinoflagelati *Gonyaulax fragilis*.

Začetno sproščanje sluzastega materiala iz fitoplanktona je verjetno posledica porušenega razmerja nitrati/fosfati, ki se zgodi v obdobju povečanega rečnega pritoka v severni Jadran (Cappiello in sod., 2007). To neravnovesje sproži spremembo v sestavi in hitrosti rasti diatomej, kar dovoli sproščanje polisaharidnih izvenceličnih izločkov (Myklestad in sod., 1995; Mingazzini in Thake, 1995; Penna in sod., 1999). Do nedavnega so domnevali, da igra cvetenje diatomej glavno vlogo v razvoju in vrževanju morskih makroagregatov (Alldredge in Silver, 1988; Fanuko in sod., 1989; Stachowitsch in sod., 1990; Rinaldi in sod., 1995; Aldredge, 1999). Vendar cvetenja diatomej, ki jih zaznajo kot višje koncentracije fukoksantina, v letih pojava morskih makroagregatov v Jadranu (1997, 2000, 2002 in 2004) niso bile izjemne v primerjavi z leti, ko pojava ni bilo (Flander, 1999; Flander Putrle in sod., 2000; Flander Putrle, 2003). Vrstna sestava diatomej je bila podobna v letih s pojavom in brez (Flander Putrle in Malej, 2008). Specifičnih vrst diatomej, ki bi sovpadale s pojavom morskih makroagregatov, niso našli (Pistocchi in sod., 2005 b). Rezultati so nakazovali, da fitoplanktonska biomasa v okoliški vodi ne vpliva bistveno na razvoj morskih makroagregatov (Flander Putrle in Malej, 2008).

Azam in sod. (1999) pa so postavili hipotezo, da je oblikovanje sluzi lahko tudi produkt interakcij bakterije-organska snov.

Pri trofičnih interakcijah, ki vodijo v izločanje DOM, sta pomembna tudi liza celic (npr. zaradi virusov) in »paša« zooplanktona. Zmanjševanje "paše" bičkarjev vodi v povečanje števila bakterij in hitrejšo razgradnjo DOM (Wetz in sod., 2008). Alternativen vir DOM je tudi metabolna bakterijska pretvorba POM v DOM. Kljub temu da veliko organizmov izloča encime v izvencelični prostor, so bakterije verjetno glavni vir izvenceličnih encimov, ki so lahko vključeni v razgradnjo raztopljenih organskih snovi (Chrost, 1992).

2. 3. 2. 2 Kopičenje DOM

Kljub mnogo raziskavam še vedno ni povsem pojasnjeno, zakaj se DOM kopiči in ostaja v obalnih sistemih, čeprav so predlagali več okoljskih faktorjev, ki potencialno omejujejo bakterijsko porabo DOM (Wetz in sod., 2008). Nekateri zagovarjajo misel, da je del komponente DOM preprosto določen čas, odporen na razgradnjo (Søndergaard in sod., 2000; Barbosa in sod., 2001). Zoppini in sod. (2005) in Søndergaard in sod. (2000) so pokazali, da dodatki hranil ne povišajo obsega razgradnje DOM (iz fitoplanktonskega cvetenja). Avtorja zagovarjata, da je zaradi kemijske sestave določenega dela DOM le-ta za določen čas odporen proti bakterijski razgradnji, kar omogoči njegovo kopičenje v obalnih sistemih. Bakterijsko koriščenje ogljikovih hidratov je močno odvisno od njihove kemijske sestave (Aluwihare in Repeta, 1999; Arnosti, 2000) in počasna hidroliza lahko vodi do kopičenja v vodnih okoljih (Zoppini in sod., 2005). Ko je veliko sluzi sproščene v morskovo vodo, lahko druge okoljske razmere vodijo do njegovega redčenja ali kopičenja v vodni masi (Degobbis in sod., 1995; Mingazzini in Thake, 1995). Pri tem pa so pomembni specifični pogoji oziroma razmere značilne za severni Jadran (glej poglavje 2. 3. 1.).

2. 3. 3 Videz morskih makroagregatov

Morski makroagregati so najrazličnejših barv (mlečno-beli, rožnati, rumeni do rjavi), oblik (drobni sluzasti kosmiči, nitke, zavese, spleti, oblaki, sluzaste površinske odeje) in velikosti (od nekaj milimetrov do nekaj kilometrov) (Stachowitsch, 1990). Sluzenje morja in morski makroagregati so prikazani na Sliki 4A in 4B.



Slika 4 Sluzenje morja (površinske sluzaste prevleke) (Foto: N. Kovač) (A) in Morski makroagregati v vodnem stolpcu (B) (Foto: Arhiv MBP)

2. 3. 4 Biološka sestava

Morski makroagregati imajo značilno heterogeno sestavo, ki vključuje fitoplankton (sestavljeno iz pelagičnih ali bentičnih vrst, sestava združbe pa je bila podobna tisti v okoliški vodi; Del Negro in sod., 2005), bakterije in cianobakterije, mezozooplankton ter mikrozooplankton, ličinke in jajca drugih živali (Kovač in sod., 2008). Morski makroagregati so pomembne »hot spot oz. vroče točke« mikrobne rasti in recikliranja ogljika (Azam in Long, 2001). Poleg mikroorganizmov pa morski makroagregati vsebujejo še različne delce, kot so ostanki različnih rastlinskih in živalskih celic (prazne fitoplanktonske celice, hitinski oklepi rakcev ...), fekalne peletke, mineralne delce ter cvetni prah itd. (Stachowitsch, 1990; Mingazzini in Thake, 1995; Baldi in sod., 1997; Kovač in sod., 2008).

2. 3. 4. 1 Bakterije v morskih makroagregatih

Zoppini in sod. (2005) so izvedli poskus, s katerim so želeli ugotoviti sestavo združbe v morskih makroagregatih in dinamiko te združbe med kratkoročnimi inkubacijami z dodanimi hranili (P, N in glukoza). Analize bakterijske skupnosti s specifičnimi ribosomskimi RNA (rRNA) tarčnimi probami so odkrile filogenetsko sestavo združbe, ki jo določa kvaliteta substrata in dosegljivost hranil. Na začetku eksperimenta in po 72 urah inkubacije so v kulturi, ki ji niso dodali hranil, tako v vodi kot v morskih makroagregatih prevladovali α in γ proteobakterije. Združba, ki so ji med inkubacijo dodali hranila P in N, je prav tako pokazala visok odstotek α in γ proteobakterij, a je bilo tudi več bakterij skupine citofaga-flavobakterija. V združbi, ki so ji med inkubacijo dodali hranila P, N in glukoza, pa so prevladovali γ proteobakterije (Zoppini in sod., 2005).

Analiza s fluorescentno in *in situ* hibridizacijo je na začetku poskusa pokazala relativno nizke deleže bakterij, ki pa so bili v morskih makroagregatih višji kot v vodi. Na koncu inkubacije (72 ur) se je delež bakterij močno povečal v vseh kulturah, a najbolj v kulturi, ki so ji dodali glukoza (Zoppini in sod., 2005). Bakterije so našli v skoraj vseh tipih morskih makroagregatov, a se je njihova koncentracija spreminjala z določenimi tipi morskih makroagregatov od 2×10^9 celic/L v nitkah, do 2×10^{11} celic/L v oblakih. Število bakterij je obratno povezano z velikostjo morskih makroagregatov verjetno zaradi njihove fraktalne narave (Ploug in Grossart, 2000). V morskih makroagregatih opazimo tudi cianobakterije, ki lahko fiksirajo C (fotosinteza) in N (fiksacija N). V primeru pojava morskih makroagregatov postane okolna voda običajno oligotrofna, verjetno zato, ker potekata organska produkcija in remineralizacija predvsem znotraj morskih makroagregatov (Fuks in sod., 2005). V takih razmerah so cianobakterije bolj uspešne kot heterotrofne bakterije in ostali avtotrofi ter zato postanejo glavni vir hrane za nanoflagelate (Fuks in sod., 2005). Vpliv bakterij na staranje morskih makroagregatov je opisan v poglavju 2. 3. 6.

2. 3. 4. 2 Fitoplankton v morskih makroagregatih

Flander Putrle in Malej (2008) sta s preučevanjem morskih makroagregatov iz Jadranskega morja prišli do zaključka, da je fitoplanktonska biomasa teh morskih makroagregatov sestavljena primarno iz diatomej, poleg njih pa so bili prisotni še primenziofiti, dinoflagelati, cianobakterije in zelene alge. Tipične fitoplanktonske vrste v morskih makroagregatih so:

- a.) diatomeje: *Cylindrotheca closterium*, *Cyclotella* sp., *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros* sp., *Cerataulina pelagica*, *Thalassiosira* sp., *Leptocylindrus danicus*, *Rhizosolenia alata*;
- b.) dinoflagelati: *Prorocentrum* vrste, kot *P. triestinum*, *P. minimum*, *P. micans*, *P. gracile*, *Heterocapsa* sp., *Ceratium furca*, nagi *Gymnodinium*-podobni dinoflagelati;
- c.) kokolitoforidi: *Calyptrosphaera oblonga*, *Emiliania huxleyi* in *Syracosphaera pulchra* (Kovač in sod., 2008).

Med pojavom morskih makroagregatov leta 2000 v Jadranu je bila količina diatomej višja v matriksu sluzi kot v okolni vodi, vrste, kot *Chaetoceros* spp., *Cylindrotheca closterium*, *Proboscia alata* in *Pseudo-nitzschia delicatissima*, pa stalna flora takih skupkov (Del Negro in sod., 2005). Diatomejo *Cylindrotheca closterium* so prepoznali kot vrsto, ki se ponavljajoče pojavlja predvsem v zrelejših morskih makroagregatih in pogosto tvori zelo goste in skoraj monospecifične populacije (Totti in sod., 2005). Med pojavom morskih makroagregatov 2002 v Jadranu so bili najbolj pogoste določene vrste dinoflagelatov (Del Negro in sod., 2005). Več podatkov o vplivu fitoplanktona na morske makroagregate pa v poglavju 2. 3. 6.

2. 3. 4. 3 Mezozooplankton v morskih makroagregatih

Med zooplanktonom, ki obsega praživali (bičkarji, migetalkarji) in mikroskopske nevretenčarje (Faganeli, 2008), najdemo v makroagregatih predvsem ličinke polihetov in rakce podrazreda *Copepoda* (npr. vrsta *Temora stylifera*) (Bochdansky in Herndl, 1992).

2. 3. 4. 4 Virusi v morskih makroagregatih

Virusne infekcije imajo vpliv na fitoplanktonsko biomaso in primarno produkcijo, saj znižajo fitoplanktonska cvetenja in znižajo bakterioplanktonsko koncentracijo in produkcijo. Virusna liza je lahko mehanizem, ki nadzoruje sestavo bakterijske združbe. Obstajajo hipoteze, da virusi prispevajo k pojavu prevelike količine humusa v vodi (Bochdansky in Herndl, 1992). Tipična količina virusom podobnih delcev (VLP – virus like particles) za površinske vode je od 10^5 do 10^8 delcev/L v površinskih vodah morskega okolja (Danovaro in sod., 2003). Koncentracija VLP v morskih makroagregatih iz severnega Jadrana leta 2000, 2001 in 2002 je bila 300-krat višja od tiste v okoliški vodi, s

povprečjem 2×10^{11} VLP/L (Del Negro in sod., 2005). Razmerje VLP : bakterije je bilo v morskih makroagregatih zelo visoko (v primerjavi z razmerjem VLP : bakterije v okoliški vodi), povprečno 72 (Del Negro in sod., 2005). Koncentracija VLP se je spreminjala glede na velikost morskih makroagregatov od 7×10^9 VLP/L v nitkah in $3,7 \times 10^{12}$ VLP/L v oblakih (Del Negro in sod., 2005). Razmerje VLP : bakterije je višje v visoko produktivnih sistemih (Weinbauer, 2004).

2. 3. 5 Kemijska sestava

2. 3. 5. 1 Elementna sestava

Zaradi gelu podobne strukture morski makroagregati velikokrat vsebujejo celo več kot 95 % vode (Faganeli in sod., 2010). Zrelejši morski makroagregati običajno vsebujejo manj vode in več mineralnih delcev, zaradi česar je njihovo posedanje večje. Organske snovi v morskih makroagregatih je običajno med 35–57 % z razmerjem organska snov/ C_{org} v razponu med 2 in 3,6 (Posedel in Faganeli, 1991). Vsebnosti C_{org} in N_{cel} so se v morskih makroagregatih spreminjale od 5–35 % za C_{org} in od 0,5–4,4 % za N_{cel} , razmerje C_{org}/N_{cel} pa je bilo od 5,8 do 28,7 (Kovač in sod., 2008). Relativno visoko razmerje C_{org}/N_{cel} odraža kompleksno sestavo morskih makroagregatov z nizko vsebnostjo proteinov in prisotnostjo razgradnih produktov (Kovač in sod., 2008).

Anorganska komponenta morskih makroagregatov je večinoma rezultat vključevanja avtohtonih in alohtonih delcev v morske makroagregate (Kovač in sod., 2005). Anorganska komponenta lahko obsega od 20–80 % materiala, ta del pa je nižji v morskih makroagregatih, vzorčenih ob začetku sluzenja morja, ter višji v zrelejših morskih makroagregatih oziroma tistih iz nižjih slojev stolpca ter sedimentiranih vzorcih (Giani in sod., 2005; Kovač in sod., 2005). Visoka relativna vsebnost mineralne komponente v sedimentiranih morskih makroagregatih je posledica razgradnih procesov in prispevka resuspenzije sedimenta (Kovač in sod., 2005). Elementna analiza površinskih morskih makroagregatov in morskih makroagregatov iz vodnega stolpca je pokazala prisotnost glavnih elementov, kot so P, Si, Al, Fe, Mn, Ca, Mg, Na, K, Ti (Pettine in sod., 1993). Vsebnost železa, aluminija, titana in magnezija večinoma izvira z mineralnih komponent, medtem ko sta žveplo in silicij lahko rezultat biogenih in mineralnih izvorov (Pettine in sod., 1993). Visoke koncentracije železa in silicija v morskih makroagregatih pripisujejo diatomejam, ki so bile prevladujoča skupina v preučevanih vzorcih (Penna in sod., 2000). V morskih makroagregatih so opazili naslednji vrstni red zmanjševanja koncentracij: železo>mangan>cink>nikelj>baker>krom, svinec>živo srebro>kadmij (Stumm in Morgan, 1995). Ko so primerjali koncentracije kovin v morskih makroagregatih in POM, so ugotovili, da so te koncentracije višje v POM (Kovač in sod., 2008). Nižje koncentracije kovin v morskih makroagregatih lahko kažejo na pomankanje vezavnih mest v organski in anorganski komponenti (Kovač in sod., 2008). Tudi biološka sestava in faza razgradnje morskih makroagregatov lahko vplivata na vključevanje in sproščanje ter prenos težkih kovin v morsko vodo (Kovač in sod., 2008).

2.3.5.2 Molekulska sestava

Analiza s protonsko jedrsko magnetno resonanco ($^1\text{H-NMR}$) je pokazala štiri glavne strukturne elemente: ogljikove hidrate (CHO), alifatske komponente (R), estre in amidne skupine (COR) in organosilicijeve sestavine (Si-R, Si-O-R) (Kovač in sod., 2002). Zadnje navadno povezujejo s prisotnostjo diatomej in siliciju vezanim z organsko snovjo v morskih makroagregatih. Vsebnost aromatskih snovi je majhna (Kovač in sod., 2008).

Ogljikovi hidrati so količinsko največja komponenta (vodotopni, 12–34 %), ki ji sledijo proteini (1–12 %) in lipidi (0,1–8 %) (Posedel in Faganeli, 1991; Penna in sod., 2003). Analize nevtralnih monosaharidov so pokazale, da prevladuje glukoza, ki ji sledijo manoza, fruktoza, galaktoza, arabinoza, riboza, ksiloza in fukoza (Faganeli in sod., 1995). Razlike v sestavi ogljikovih hidratov, ki so razvidne iz objav drugih avtorjev, lahko nastanejo zaradi različne sestave analiziranih morskih makroagregatov (različni razvojni stadiji) in zaradi selektivne razgradnje (Hama in Yanagi, 2001). Analize v vodi topnih oligosaharidov so razkrile njihovo značilno sestavo iz maltotrioze, maltotetraoze, maltopentaoze, maltoheksaoze in maltoheptaoze (Penna in sod., 2003; Capiello in sod., 2007).

Količina aminokislin v morskih makroagregatih se je zmanjševala v smeri glicin, asparginska kislina, alanin, glutaminska kislina, levcin, valin, treonin, serin, izolevcin, lizin, prolin, fenilalanin, arginin, histidin in tirozin (Posedel in Faganeli, 1991). V vzorcih niso zaznali aminokislin z žveplom (Kovač in sod., 2008). Ta sestava je podobna sestavi POM (v poletnem obdobju brez sluzenja morja) v severnem Jadranu (Posedel in Faganeli, 1991).

Lipidno komponento morskih makroagregatov večinoma sestavljajo: triacilgliceroli, ogljikovodiki in proste kisline (Baldi in sod., 1997). Glavni izvor lipopolisaharidov v morskih makroagregatih je verjetno razgradnja celičnih membran ter polisaharidov in lipidov kot rezervnih materialov (Baldi in sod., 1997). K lipidni komponenti pa lahko prispevajo tudi lipidi mikrozooplanktona in mikrometazojev, ujetih iz vode (Viviani in sod., 1995).

2.3.5.3 Intersticijska voda

V intersticijski vodi morskih makroagregatov so določili višje koncentracije celotnega raztopljenega P in N kot v okoliški vodi (Del Negro in sod., 2005). Koncentracija se je povečevala z velikostjo morskih makroagregatov (Del Negro in sod., 2005). Povprečna vrednost razmerja N/P v intersticijski vodi morskih makroagregatov je bila nižja kot v okolnih vodah, kar nadalje kaže na večje recikliranje hranil (Del Negro in sod., 2005).

2. 3. 6 Razgradnja (staranje) morskih makroagregatov v Jadranu

Tedenska ali bolj pogosta opazovanja v severnem Jadranu med poletji 1997, 2000, 2002 in 2004 kažejo, da gre pojav morskih makroagregatov skozi značilne »razvojne faze« z določljivimi stopnjami razvoja (Flander Putrle in Malej, 2008). Začetno kopičenje ohlapno povezanih morskih makroagregatov postane vidno v zgornjem vodnem stolpcu, medtem, ko se starejši, gostejši morski makroagregati kopičijo v globlji vodi okoli termokline (Malej in sod., 1997). K vertikalni porazdelitvi agregatov prispevata vzgon, povezan s tvorbo plinastih mehurčkov, in gostota agregatov (Herndl in sod., 1992). Med »življenjskim ciklom« pojava morskih makroagregatov so lahko vse oblike morskih makroagregatov prisotne istočasno (Flander Putrle in Malej, 2008). Sčasoma (»zorenje, staranje«) se v agregatih povečuje anorganska frakcija zaradi razgradnje, privzema in kopičenja suspendiranih delcev iz vodnega stolpca (avtohtonega in alohtonega izvora) ter resuspenzije (Giani in sod., 2005).

Analize kažejo na napredovanje fitoplanktonske združbe v morskih makroagregatih severnega Jadrana (opazovanja v letih 1997, 2000, 2002 in 2004), tj. od »svežih« morskih makroagregatov s primneziofiti in silikoflagelati, preko vmesnih stopenj s heterogeno fitoplanktonsko združbo, do »starih« morskih makroagregatov, kjer prevladujejo diatomeje (Flander Putrle in Malej, 2008).

Različni avtorji označujejo morske makroagregate kot »samooskrbljujoče združbe« (Najdek in sod., 2001), ki delujejo kot mikrookolje z zelo malo interakcij z morsko vodo. Bakterije se v morskih makroagregatih uspešno hranijo z notranjimi viri oz. tu nastalimi hranili, hkrati pa tudi sam matriks morskih makroagregatov predstavlja pomemben vir hrane za bakterije. Tako se ti lahko ohranjajo in obstajajo v vodnem okolju dalj časa (Zoppini in sod., 2005). Po tej teoriji zgodnji morski makroagregati predstavljajo idealno okolje za sekundarni razvoj oportunističnih diatomej in heterotrofnih bakterij, ki nadalje vodijo tvorbo morskih makroagregatov (Flander Putrle in Malej, 2008). Interakcije fitoplankton-bakterije lahko podaljšajo zadrževalni čas morskih makroagregatov v vodnem stolpcu. Heterotrofne bakterije imajo pomembno vlogo tudi v nastanku in evoluciji morskih makroagregatov (Azam in sod., 1999; Najdek in sod., 2001; Del Negro in sod., 2005; Pistocchi in sod., 2005 a). Poleg tega pa so bakterije najpomembnejše za njihovo razgradnjo.

Izvenselični encimi, encimi, lokalizirani izven citoplazemske membrane, so pomembni katalizatorji pri razgradnji suspendirane organske snovi in raztopljenih organske snovi, vključno z morskim snegom (Cho in Azam, 1988; Smith in sod., 1992). Kljub temu da veliko organizmov izloča encime v izvenselični prostor, menijo, da so bakterije glavni izvor izvenseličnih encimov, ki so lahko vključeni v razgradnjo raztopljenih in organske snovi (Chrost, 1992). Bakterije lahko privzamejo le manjše molekule <600 Da (Weiss in sod., 1991). Bakterije izločajo encime, da hidrolizirajo visokomolekularno organsko snov in tako sproščajo hranila v raztopino (Zoppini in sod., 2005). Zaradi kompleksne sestave (prevladujejo ogljikovi hidrati, proteini, lipidi) vodi hidroliza morskih makroagregatov do visokih lokalnih koncentracij raztopljenih polimerov, oligomerov in monomerov in lahko

proizvede počasirazgradljivo DOM (Zoppini in sod., 2005). DOM nastaja hitreje, kot ga bakterije lahko porabijo, kar vodi v produkcijo obilice substrata (Azam in Long, 2001).

Bakterijska razgradnja lahko prispeva k povečanju razmerja C_{org}/N , saj je hidroliza aminokislin hitrejša kot razgradnja polisaharidov (Giani in sod., 2005). Razmerje C_{org}/N se v splošnem povečuje z večanjem, gostoto in prisotnostjo agregatov (Giani in sod., 2005). Razmerje C_{org}/N se povečuje med razvojem makroagregatov: drobni sluzasti kosmiči → nitke → spleti → oblaki → sedimentirani oblaki (Giani in sod., 2005).

Podobno kažejo tudi raziskave aktivnosti izvenceličnih encimov v različnih tipih morskih makroagregatov (Zoppini in sod. 2005). V vseh testiranih vzorcih je namreč prevladovala hidroliza proteinov, ki je predstavljala 87 % celotne izvencelične hidrolizne aktivnosti v površinskih odejah, 86 % celotne aktivnosti v nitkah in 66 % celotne aktivnosti v drobnih sluzastih »kosmičih«. Proteolitična aktivnost v vseh testiranih morskih makroagregatih je bila 10–100 krat višja kot encimska hidroliza polisaharidov, kar podpira hipotezo o preferenčni porabi proteinov v primerjavi s polisaharidi (Smith in sod., 1992). Različna razgradnja makromolekul naj bi bila vzrok kopičenju z C bogatih spojin (Smith in sod., 1992; Martinez in sod., 1996). Hitra hidroliza peptidov in proteinov kaže na hitro recikliranje N s pomembnim vplivom na njegovo biogeokemijsko kroženje (Zoppini in sod., 2005). Znano je, da bakterijska razgradnja POM spremeni kemijsko sestavo in prehransko vrednost morskih makroagregatov, kar pri prehodu iz POM v DOM vodi do povišanja razmerja C/N (Benner, 1998). Razmerje med C, vezanim v ogljikovih hidratih, (C_{CHO}) in C_{org} (C_{org}/C_{CHO}) narašča v smeri od svežih drobnih sluzastih kosmičev, nitk (29 %), do zrejših oblakov (41,4 %), kar kaže na odporno naravo polisaharidov na razgradnjo (Giani in sod., 2005). Vsebnost galaktoze se poveča med razgradnjo oz. staranjem agregatov zaradi postopnih izgub deoksimonosaharidov, kot sta fukoza in ramnoza (Giani in sod., 2005).

Hidroliza polisaharidov je kazala najmanjši prispevek k celotni hidrolizni aktivnosti (manj, kot 5 %) (Zoppini in sod., 2005). Najpomembnejša encima, ki razgrajujeta polisaharide, sta bila α -in β -glukozidaza. Njuno razmerje se je znižalo v smeri od drobnih sluzastih kosmičev do nitk k površinskim odejam, kar kaže na spremembo hidrolazne aktivnosti od manj stabilnih α do na razgradnjo odpornejših β -glukozidih vezi (Zoppini in sod., 2005). Znižanje razmerja C_{org}/S s staranjem agregatov nakazuje, da se med razgradnjo poveča vsebina žvepla (Giani in sod., 2005), verjetno z disimilativno redukcijo sulfata. Povišanje vsebnosti žvepla je verjetno tudi posledica višje vsebnosti S vsebujočih aminokislin, kot sta cistein in metionin, in zaradi prisotnosti na razgradnjo odpornih sulfoniranih polisaharidov (Giani in sod., 2005).

Potencialna hidroliza fosforiliranih spojin z alkalno fosfatazo predstavlja 8 % v »površinskih odejah«, 11 % v »nitkah« in 25 % v drobnih sluzastih »kosmičih« (Zoppini in sod., 2005). Lipaze pripadajo skupini najbolj aktivnih izvenceličnih encimov vodnih bakterij (Chrost in Gajewski, 1995). Celotni lipidi v vzorcih morskih makroagregatov so predstavljali 17-25 % suhe mase (Pistocchi in sod., 2005 a). V agregatih je bila hidroliza lipidov manj pomembna (Zoppini in sod., 2005). Ugotovljeni razkorak bo predmet nadaljnjih raziskav.

Makroagregati v obliki »površinskih odej« so pokazali v primerjavi z globljimi vzorci najnižji potencial izvenceličnih encimskih aktivnosti (za vse preiskovane encimske aktivnosti), kar lahko kaže na to, da je bakterijska združba v tej veliki formaciji v stacionarnem stanju (Zoppini in sod., 2005). Drobni sluzasti kosmiči pa so bolj zgodnje formacije glede na večje »površinske odeje«, v katerih je organska snov v zgodnji fazi razgradnje (Zoppini in sod., 2005). Drobni sluzasti »kosmiči« torej predstavljajo prvo makroskopsko obliko morskih makroagregatov, ki se v ustreznih razmerah oblikujejo v »nitke« in »oblake« (Zoppini in sod., 2005).

2. 3. 7 Posledice »sluzenja« morja

Pojav morskih makroagregatov ima izredno velik okoljski in ekonomski vpliv na obalno skupnost. Suspendirani morski makroagregati imajo nezaželene posledice predvsem v ribiški industriji, saj se le-ti pritrdijo na ribiške mreže, gojitvene kletke ter same organizme in vplivajo na razvoj jajc, ličink in mladice morskih organizmov in tako otežijo ribištvo in zmanjšajo ulov (Kovač in sod., 2008). Podobno vplivajo tudi na gojenje školjk. Želatinozne mase, ki lebdijo na površju morja, pa lahko morski vetrovi odnesejo do obale, kar zniža turistične aktivnosti (Cappiello in sod., 2007).

Glede na splošno sestavo morskih makroagregatov ti ne predstavljajo neposrednega tveganja za človekovo zdravje. Potencialni toksični vplivi so povezani s sposobnostjo morskih makroagregatov, da absorbirajo in kopičijo sestavine, kot so toksične kovine, toksini alg in patogeni mikrobi (Volterra, 1995; Funari in Ade, 1999).

Sedimentirani morski makroagregati imajo negativen vpliv na bentoške organizme (Cappiello in sod., 2007). V Piranskem zalivu so opazili, da sedimentirani morski makroagregati lahko povzročijo smrt bentoških organizmov (npr. morskih ježkov, rib rodu *Gobius*, makroalg in razvejane koralnjake družine *Gorgonacea*) (Stachowitsch in sod., 1990). Sedimentirani morski makroagregati lahko zmanjšajo bentoškim združbam razpoložljivost svetlobe, hranil in kisika, prav tako pa lahko sprožijo kopičenje amoniaka in vodikovega sulfida (Devescovi in Iveša, 2007). Ker morski makroagregati lahko vsebujejo toksine (ki imajo vpliv na mehanizem celičnega metabolizma), je možno, da bentoški organizmi odmrejo, če so le rahlo prekriti z morskimi makroagregati. V času sluzenja lahko pride do masovnih pomorov bentosa plitvega kamnitega dna severnega Jadana (Müller in sod., 1998).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCEV

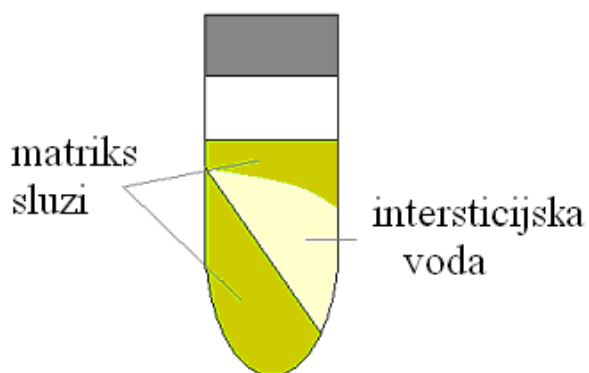
3.1.1 Vzorčenje in priprava vzorcev matriksa sluzi G in intersticijske vode G

Vzorci iz globine 11–12 m so odvzeli 1. 7. 2004 pri oceanografski boji Morske biološke postaje, ki je zasidrana na koti s koordinatami 45° 32' 55,68" N, 13° 33' 1,86" E, tj. približno 1,23 navtične milje (nM (2,28 km)) od Piranskega rta v smeri proti Gradežu. Vzorec so odvzeli s pomočjo črpalke. Temperatura morja je bila 24 °C. Vzorec je bil kompakten, sluzast oz. želatinast. Do začetka eksperimentalnega dela so vzorec razdelili v več vrečk in jih shranili v zamrzovalniku pri -36 °C.

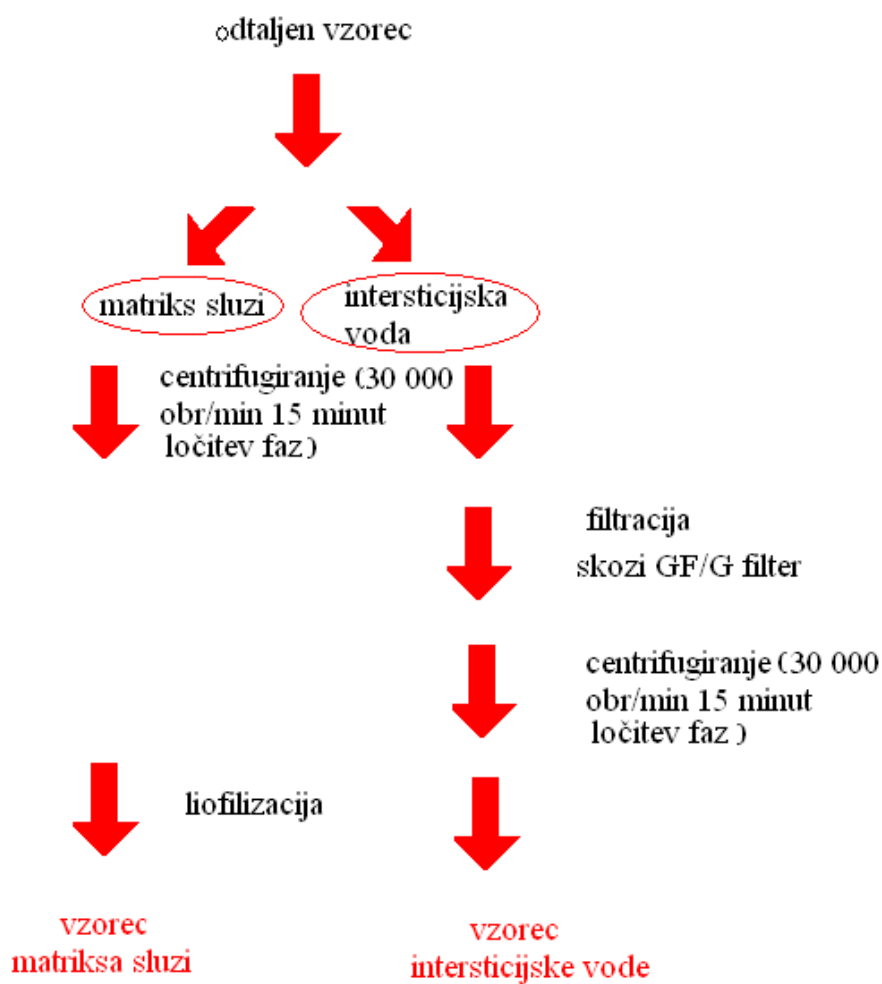
Pred analizo smo izbrane zamrznjene vzorce strli na manjše kose in jih inkubirali 2 dni pri 1,5 °C, da so se odtalili. Skupni volumen odtaljenega vzorca je bil približno 3,5 l. Vzorec se je po odtaljevanju ločil v dve fazi – intersticijsko vodo (na dnu posode) in matriks sluzi, ki se je nakopičil nad prej omenjeno vodno fazo (intersticijsko vodo). Matriks sluzi je bil kompakten, sluzast, želatinast, rumeno-zelene barve, intersticijska voda pa je bila prozorna, rahlo rumenkasto obarvana, v njej so plavali majhni kosmiči morskih makroagregatov rumenkaste barve.

Matriks sluzi smo z žlico ločili od intersticijske vode. Tako smo dobili približno 3,3 l intersticijske vode in 200 ml matriksa sluzi, vendar so v intersticijski vodi še vedno lebdeli majhni kosmiči matriksa sluzi, prav tako je bila v matriksu sluzi še vedno intersticijska voda. Zato smo intersticijsko vodo centrifugirali 15 minut pri 10.000 obr/min pri temperaturi 21 °C. Vzorec intersticijske vode se je ločil na dve fazi – usedlino matriksa sluzi in intersticijsko vodo nad usedlino. Fazi smo ločili ter shranili intersticijsko vodo za nadaljnjo obdelavo. Vzorec matriksa pa se je po centrifugiranju ločil v tri faze: del matriksa sluzi se je posedel v usedlino, drugi del pa je lebdel na vrhu, kar je prikazano na Sliki 5. Intersticijska voda je bila med obema fazama matriksa sluzi. Intersticijsko vodo smo s pipeto odstranili, matriks sluzi pa shranili za nadaljnjo obdelavo.

Ker intersticijska voda po centrifugiranju še vedno ni bila bistra, v njej so še vedno plavali kosmiči matriksa sluzi, smo 150 ml le-te filtrirali skozi filter Whatman GF/F (stekleni mikrofibrilni filter s premerom por 0,7 µm). Filtrat smo ponovno centrifugirali 15 minut pri 10.000 obr/min in 21 °C in ločili fazi (intersticijska voda je bila po centrifugiranju nad usedlino). Tako pripravljene vzorce intersticijske vode in matriksa sluzi smo zamrznili čez noč pri -36 °C in jih dva dni liofilizirali. Dobili smo 3,99 g liofiliziranega vzorca intersticijske vode in 3,71 g liofiliziranega vzorca matriksa sluzi. Liofilizirane vzorce smo shranili v eksikatorju. Priprava vzorcev intersticijske vode in matriksa sluzi je na spodnji Sliki 6.



Slika 5: Prikaz centrifugiranega matriksa sluzi-G



Slika 6: Priprava vzorcev intersticijske vode-G in matriksa sluzi-G

3. 1. 2 Vzorčenje in priprava vzorca matriks sluzi P

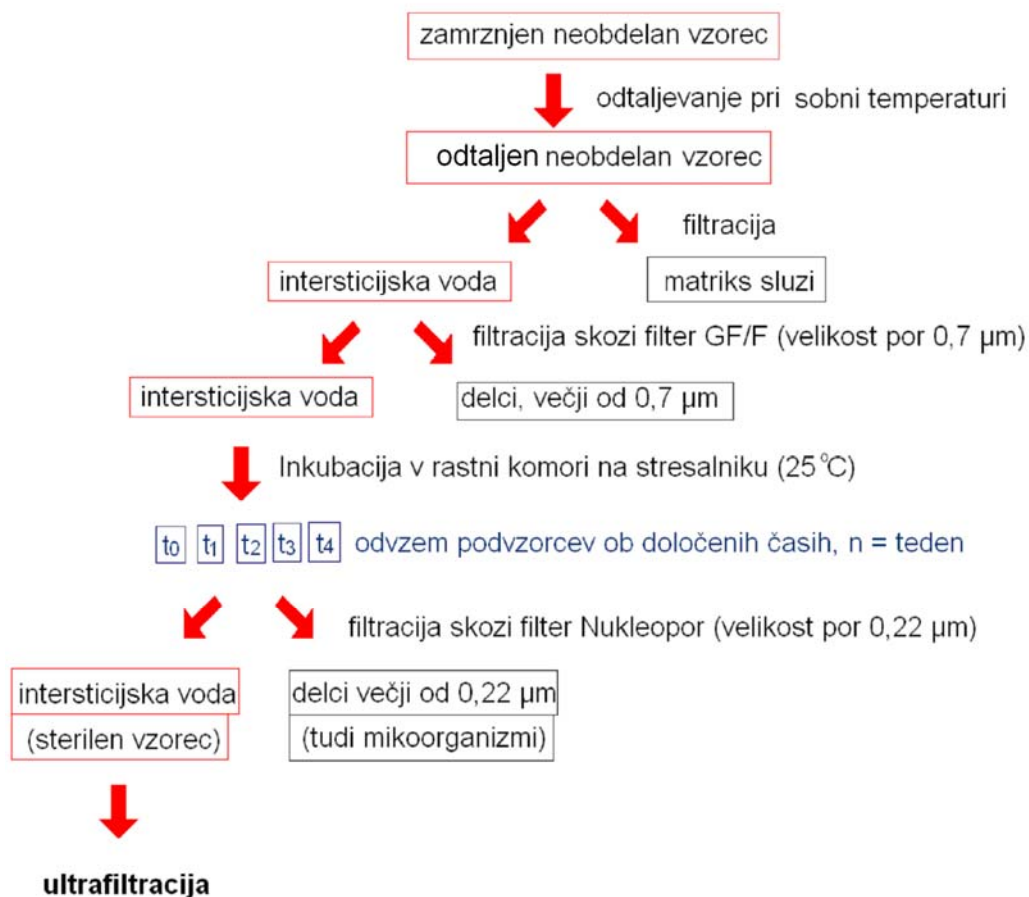
Vzorce iz površine so odvzeli 23. 6. 2004 pred Morsko biološko postajo v Piranu ročno s polietilensko posodo. Zaradi kompaktnosti samih morskih makroagregatov je pri tem bila zajeta minimalna količina okoliške morske vode. Temperatura morja je bila 26 °C. V primerjavi z vzorcem iz globine je bil vzorec s površine bolj rigiden in želatinast. Do začetka eksperimentalnega dela so vzorec razdelili v več vrečk in jih shranili v zamrzovalniku na -20 °C. Vzorce so odtalili pri temperaturi 20 °C, razdelili v posode in centrifugirali 10 minut pri 10.000 obr/min pri isti temperaturi. Ločena supernatant in usedlino so ločeno zamrznili in nato sušili 24 ur v liofilizatorju. Liofilizirane vzorce so shranili v eksikatorju (Mohar, 2006).

Ker smo imeli na razpolago le majhne količine vzorca iz površine, smo ga uporabili le za analizo P_{cel} .

3. 1. 3 Priprava komponent morskih makroagregatov med mikrobnó razgradnjo

Z merjenjem P_{cel} v podvzorcih smo nadaljevali delo T. Marinšek (2008). Le-to vključuje raziskave intersticijske vode morskih makroagregatov vzorčenih na globini 11–12 m pri oceanografski boji MBP Piran dne 1. 7. 2004. Do začetka eksperimenta so bili vzorci shranjeni v zamrzovalniku na -36 °C.

Po odtalitvi vzorca in ločevanju matriksa od intersticijske vode so intersticijsko vodo sluzi najprej prefiltrirali skozi stekleni mikrofibrilni filter GF/F (Whatman) s premorom por 0,7 μm s pomočjo vakumske črpalke. Dobljeni filtrat, ki je še vedno vseboval mikroorganizme, potrebne za spremljanje naravne mikrobne razgradnje organske snovi v intersticijski vodi, so nato 4 tedne inkubirali v rastni komori v temi na stresalniku pri 25 °C. Nato so odzemale podvzorce po enem, dveh, treh in štirih tednih inkubacije. Posamezen podvzorec so nato filtrirali skozi filter Nucleopor z velikostjo por 0,22 μm , da bi odstranili delce, ki bi lahko motili nadaljnjo ultrafiltracijo. Sledila je ultrafiltracija z Vivascience VivaFlow 200 (Sartorius) in membransko črpalko MasterFlex L/S (Cole-Palmer Instrument Co.). Podrobnejša shema poteka poskusa je prikazana na Sliki 7.

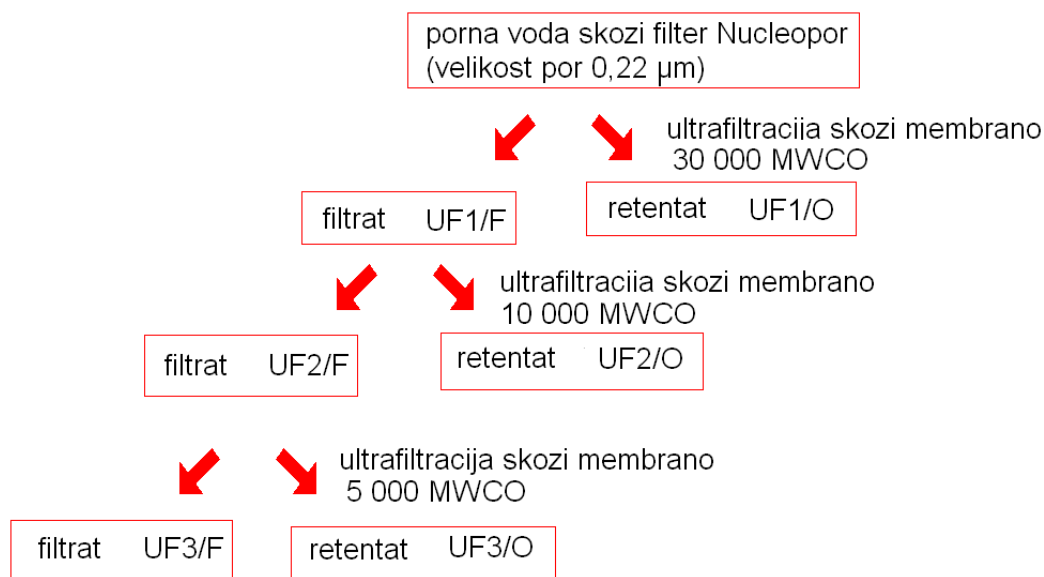


Slika 7: Shema poteka poskusa frakcioniranja morskih makroagregatov med mikrobo razgradnjo (Marinšek, 2008)

Intersticijsko vodo-G so ultrafiltrirali skozi naslednje membrane v vrstnem redu: 30.000 izključitvenih molekulskih mas (MWCO – molecular weight cut off), 10.000 MWCO, 5.000 MWCO. Po vsaki izvedeni ultrafiltraciji so membrano sprali s 25 ml destilirane vode. Dobili so naslednje frakcije vzorca:

- filtrat ultrafiltracije z velikostjo por 30 000 MWCO (UF1/F),
- filtrat ultrafiltracije z velikostjo por 10 000 MWCO (UF2/F9),
- filtrat ultrafiltracije z velikostjo por 5 000 MWCO (UF3/F),
- retentat ultrafiltracije z velikostjo por 30 000 MWCO (UF1/O),
- retentat ultrafiltracije z velikostjo por 10 000 MWCO (UF2/O),
- retentat ultrafiltracije z velikostjo por 5 000 MWCO (UF3/O).

Shema ultrafiltracije je prikazana na Sliki 8.



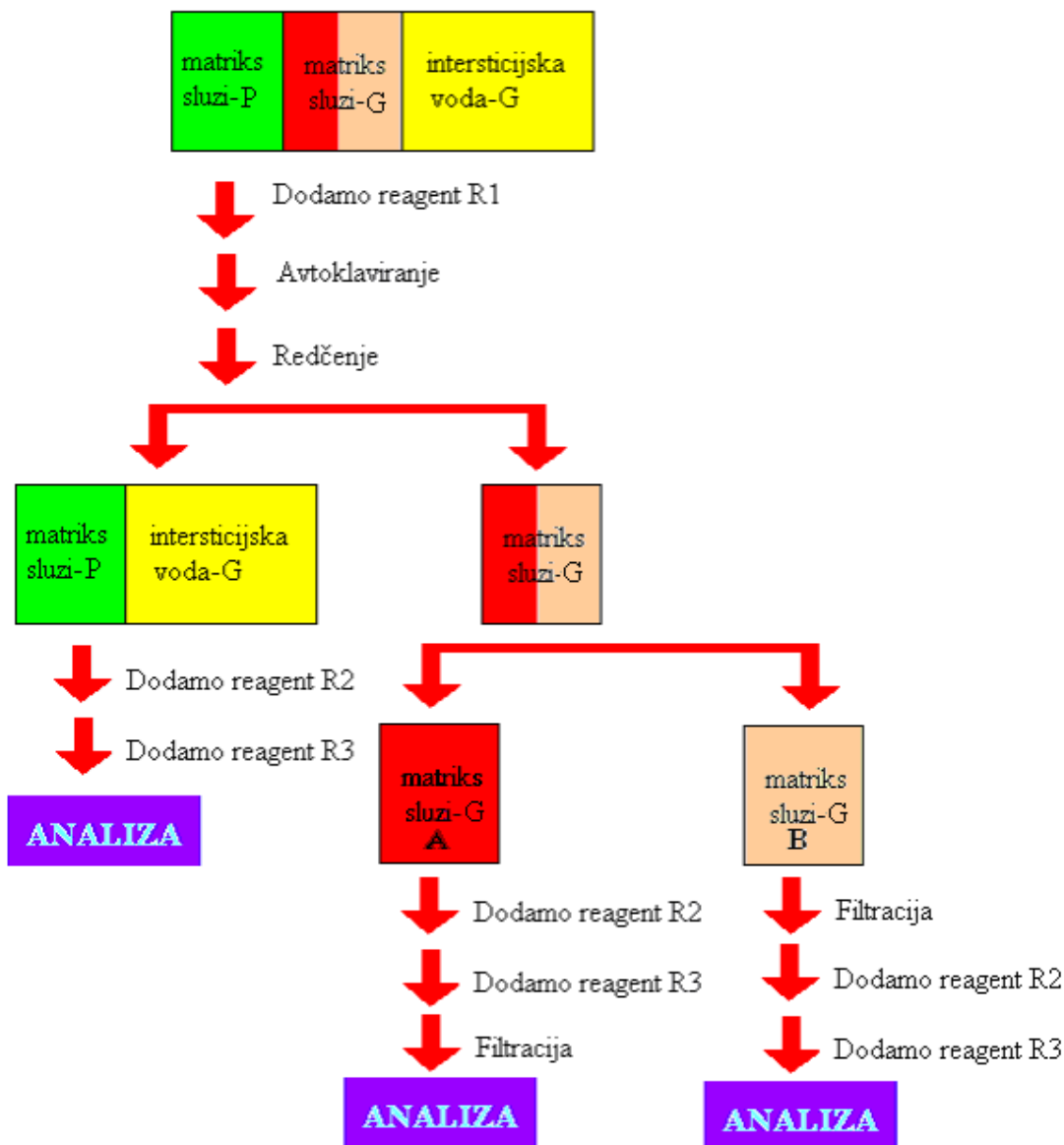
Slika 8: Shema ultrafiltracije obdelanega vzorca intersticijske vode-G (Marinšek, 2008)

3. 2 ANALIZA P_{cel} V MATRIKSU SLUZI-G, MATRIKSU SLUZI-P IN INTERSTICIJSKI VODI-G

Količino P_{cel} smo določili po Koroleffu (1977). Metodo določa celotni anorganski in organski P_{org} . Metoda ni primerna za določanje polifosfatov. Meja detekcije je 0,20 $\mu\text{mol/L}$, merimo lahko do koncentracije 75 $\mu\text{mol/L}$. Ponovljivost je $\pm 8,3\%$ do koncentracije 50 $\mu\text{mol/L}$

Stehali smo po 50 mg liofiliziranega vzorca matriksa sluzi-G, matriksa sluzi-P in intersticijske vode-G. Posamezni zatehti smo dodali 6 ml reagenta, ki vsebuje $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, H_3BO_3 in NaOH (R1). Nato smo vzorca avtoklavirali 30 minut pri 120 °C. Vzorec smo nadalje redčili z destilirano vodo – miliQ (dH_2O) ter dodali reagent, ki vsebuje askorbinsko in žveplovo(VI) kislino (R2). Tako pripravljeno raztopino smo nato mešali pol minute ter ji dodali še 1 ml reagenta, ki vsebuje amonijev heptamolibdat tetrahidrat, K-Sb-O-tartrat in žveplovo(VI) kislino (R3) in premešali. Nato smo počakali še 15 minut.

Ker je bila raztopina matriksa sluzi-G motna (vidni majhni kosmiči matriksa sluzi), smo se odločili, da bomo isti vzorec matriksa sluzi-G analizirali na dva načina. V prvem primeru (A) smo filtracijo izvedli tik pred spektrofotometrično analizo, v drugem primeru (B) pa smo filtracijo izvedli tik pred dodatkom reagentov R2 in R3. Sledila je analiza s spektrofotometrom pri $\lambda=880$ nm. Postopek prikazuje Slika 9.



Slika 9: Postopek analize P_{cel} v matriksu sluzi-G, matriksu sluzi-P in intersticijski vodi-G

3. 3 ANALIZA SPROŠČANJA P_{anorg} V VZORCIH MED ENCIMSKO RAZGRADNJO

Poskusnim vzorcem smo dodali izbrane encime, tj. alkalno fosfatazo, α amilazo, proteinazo K, lipazo ter pankreatin (zmes encimov) in po encimski hidrolizi merili sproščeni P_{anorg} , da bi lahko sklepali na vsebnost in vezave P_{org} . Analizo sproščanja P_{anorg} v vzorcih med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo smo izvedli na vzorcih matriksa

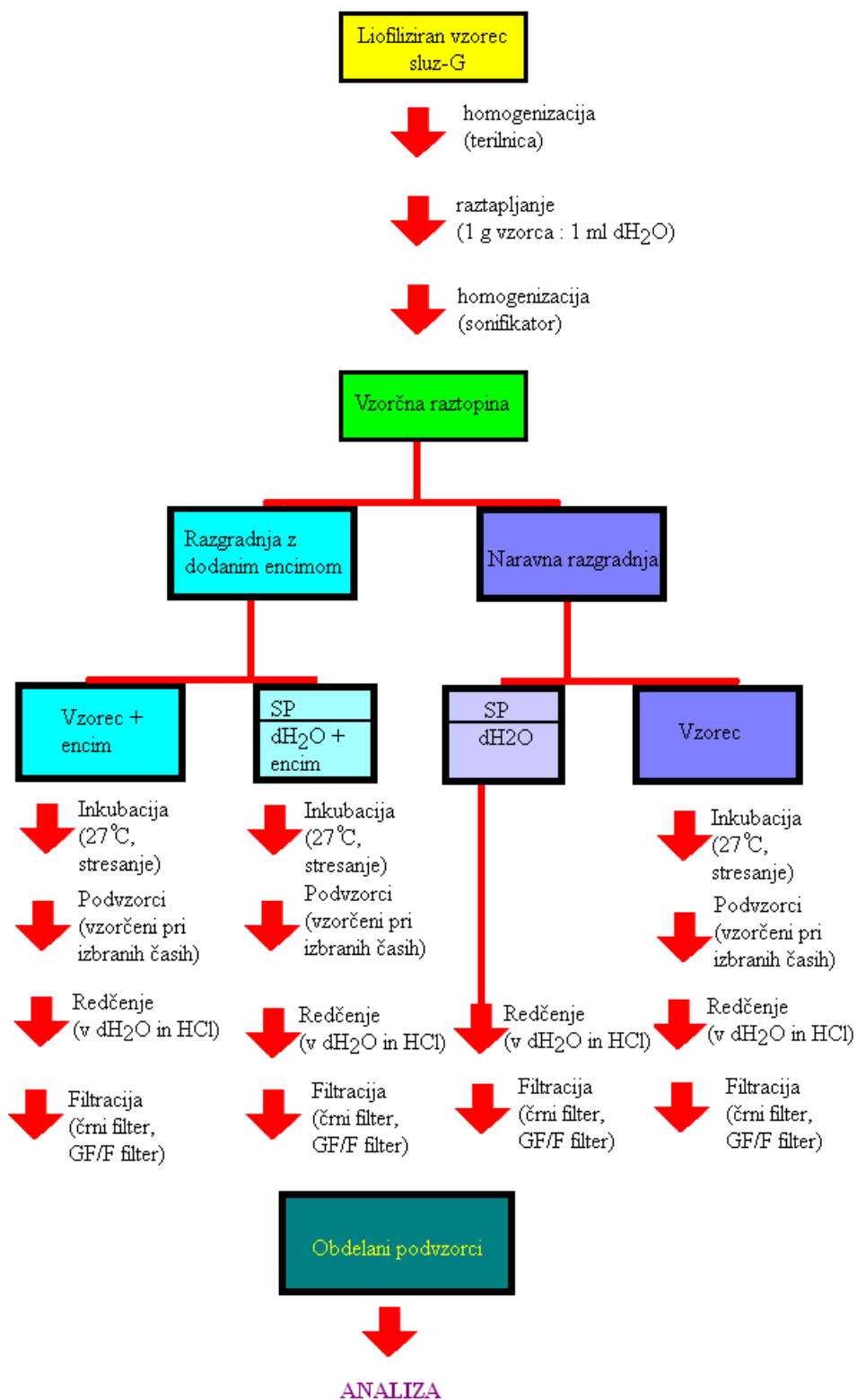
sluzi-G in intersticijske vode-G. Analizo sproščanja P_{anorg} v vzorcih med encimsko razgradnjo z drugimi encimi in pankreatinom pa smo izvedli le na vzorcih matriksa sluzi-G. Razlog za tak pristop je, da se je na predhodnih analizah intersticijske vode-G (predposkusi) z alkalno fosfatazo izkazalo, da je sproščanje P relativno majhno in so rezultati zato manj zanesljivi.

V terilnici smo strli liofiliziran vzorec matriksa sluzi-G, pri liofiliziranem vzorcu intersticijske vode-G smo ta korak spustili. Nato smo pripravili dve zatehti zelene količine vzorca in ju raztopili v dH_2O (razmerje 1 g liofiliziranega vzorca : 1 ml dH_2O). Prvi zatehti smo med poskusom dodali encim (ta vzorec kasneje imenujemo vzorec z encimom), drugi pa ne (ta vzorec kasneje imenujemo vzorec brez encima), da bi lahko opazovali sproščanje P_{anorg} zaradi encimov, že prisotnih v vzorcu, in drugih dejavnikov v vzorcu. Pripravili smo tudi dva slepa poskusa, po enega za vzorec z (dH_2O in encim) in brez encima (samo dH_2O), ki smo ju obdelali enako kot vzorca. Vzorca in slepa vzorca smo homogenizirali v ultrazvočni kopeli (trikrat po dve minuti). Nato smo odvzeli prvi podvzorec (5 ml, čas t_0) in mu dodali 44 ml dH_2O in 1 ml 0,1 M HCl. Dodatek kisline zniža vrednost pH pod 3 in ustavi delovanje encima alkalna fosfataza.

Vzorcju z encimom in slepemu poskusu smo nato dodali alkalno fosfatazo (aktivnost 1,14 enote/ml, proizvajalec Sigma-Aldrich 4252) ali proteinazo K (aktivnost 1,85 enote/ml, proizvajalec Sigma-Aldrich) ali lipazo (aktivnost 1,76 enote/ml, proizvajalec Sigma-Aldrich) ali α amilazo (aktivnost 20,4 enote/ml, proizvajalec Sigma-Aldrich) ali 10 mg pankreatina (proizvajalec Sigma-Aldrich). Pri določitvi optimalne aktivnosti encimov in pankreatina smo sledili delu B. Mohar (2006).

Sledila je inkubacija na 27 °C v rastni komori na stresalniku z 250 obr/min. Nato smo jemali podvzorce (5 ml) ob izbranih časih in jim dodali 44 ml dH_2O in 1 ml 0,1 M HCl. Slepim vzorcem brez encima nismo inkubirali, ampak smo predpostavili, da se absorbanca dH_2O ne spreminja z inkubacijo (27°C, stresanje vzorca na stresalniku v rastni komori). V izbranih časih smo odvzeli 6 podvzorcev vsakega vzorca, da bi lahko izračunali standardni odklon (SD) rezultatov.

P_{anorg} (produkt reakcije hidrolize P_{org} , ki se je med inkubacijo sproščal v raztopino), smo določali po metodi, ki sta jo vpeljala Murphy in Riley (1962), modificirali pa Strickland in Parsons (1986) in Grasshoff in sod. (1983). Meja detekcije je 0,01 $\mu\text{mol/L}$, merilno območje sega do 28 $\mu\text{mol/L}$. Pri nizkih koncentracijah do 0,2 $\mu\text{mol/L}$ znaša napaka 15 %. Analizo lahko moti prisotnost silicija, arzena, H_2S , vendar le, če so prisotni v 10-x višjih koncentracijah, kot je običajno za morska okolja. Pred analizo smo podvzorce (filtracija le pri matriksu sluzi-G in ne pri intersticijski vodi-G) najprej filtrirali skozi »črni filter« (oznaka 338, proizvajalec Sartorius Stedium), nato pa še skozi filter Whatman GF/F. Glede na volumen filtrata smo dodali ustrezno količino reagentov R2 in R3. Po 15 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo analizirali podvzorce s spektrofotometrom pri $\lambda=880$ nm. Slika 10 prikazuje shemo določanja P_{anorg} v matriksu sluzi-G med encimsko razgradnjo.



Slika 10: Shema določanja P_{anorg} v matriksu sluzi-G med encimsko razgradnjo

3. 4 ANALIZA SPROŠČANJA OGLJIKOVIH HIDRATOV V MATRIKSU SLUZI-G MED ENCIMSKO RAZGRADNJO

Želeli smo izvedeti, če se ob obdelavi matriksa sluzi-G z encimom alkalno fosfatazo sproščajo tudi ogljikovi hidrati zaradi razgradnje/hidrolize kompleksnega organskega matriksa. Postopek poskusa je do vzorčenja podvzorcev enak kot postopek pri poskusu sproščanja P_{anorg} v vzorcih med encimsko razgradnjo z encimom alkalno fosfatazo z dvema razlikami:

- za pripravo raztopin smo uporabili dH_2O in vzorec v razmerju 2 g liofiliziranega vzorca : 1 ml dH_2O .
- vzorcu z encimom in njegovi slepi probi smo dodali enkrat večji volumen encima.

Po odvzemu podvzorcev le-teh nismo redčili, saj nismo potrebovali velike količine vzorca za analizo. Nato smo podvzorce centrifugirali 5 minut pri 10.000 obr/min in 5 °C. Supernatant smo odlili v stekleno čašo, centrifugirko z usedlino (sediment) pa shranili v zamrzovalniku. Supernatant smo premešali ter odvzeli 2 ml podvzorca, dodali 1 ml 5 % fenola, premešali in dodali 5 ml koncentrirane H_2SO_4 (Dubois in sod., 1956). Raztopino smo premešali, počakali 20 minut ter spektrofotometrično določili koncentracijo ogljikovih hidratov pri $\lambda=485$ nm. Umeritveno krivuljo smo izdelali z uporabo standarda D-(+)-glukoza 99,5 % (Sigma ultra).

3. 5 P_{cel} V FRAKCIONIRANIH MORSKIH MAKROAGREGATIH MED MIKROBNO RAZGRADNJO

Vse frakcije frakcioniranih morskih makroagregatov med mikrobno razgradnjo, ki so ostale po omenjenem predhodnem eksperimentalnem delu T. Marinšek (2006), smo liofilizirali in v njih analizirali vsebnost P_{cel} po predhodno opisani metodi (Koroleff, 1977; glej poglavje 3.2.)

4 REZULTATI

4. 1 P_{cel} V MATRIKSU SLUZI-G, MATRIKSU SLUZI-P IN INTERSTICIJSKI VODI-G

Preglednica 1 podaja rezultate analize P_{cel} v matriksu sluzi-G in -P ter v intersticijski vodi sluzi-G.

Preglednica 1: P_{cel} , C_{org} , N_{cel} in molska razmerja C_{org}/P_{cel} in N_{cel}/P_{cel} v P_{cel} v vzorcih matriksa sluzi-G, matriksa sluzi-P in intersticijske vode-G

Vzorec	P_{cel} (μg/g) vzorca	C_{org} (%)	N_{cel} (%)	C_{org}/P_{cel}	N_{cel}/P_{cel}
intersticijska voda	39,0	1,93	0,03	1277	17
matriks sluzi-P	61,4				
matriks sluzi-G A	254,5				
matriks sluzi-G B	317,4	7,6	0,3	620	21

Opomba: Rezultati elementne analize C_{org} in N_{cel} , povzeti po Mohar (2006)

Koncentracija P_{cel} matriksa sluzi-G B je višja od koncentracije P_{cel} matriksa sluzi-G A. To kaže na to, da je bila izguba P_{cel} nižja v primeru filtracije pred dodatkom reagentov R2 in R3. Rezultat analize matriksa sluzi-G B je torej bolj točen in smo ga zato uporabili v nadaljnji razpravi.

Koncentracija P_{cel} intersticijske vode-G je približno osemkrat nižja od koncentracije P v matriksu sluzi-G. Koncentracija P_{cel} matriksa sluzi-P pa je približno petkrat nižja od koncentracije P v matriksu sluzi-G.

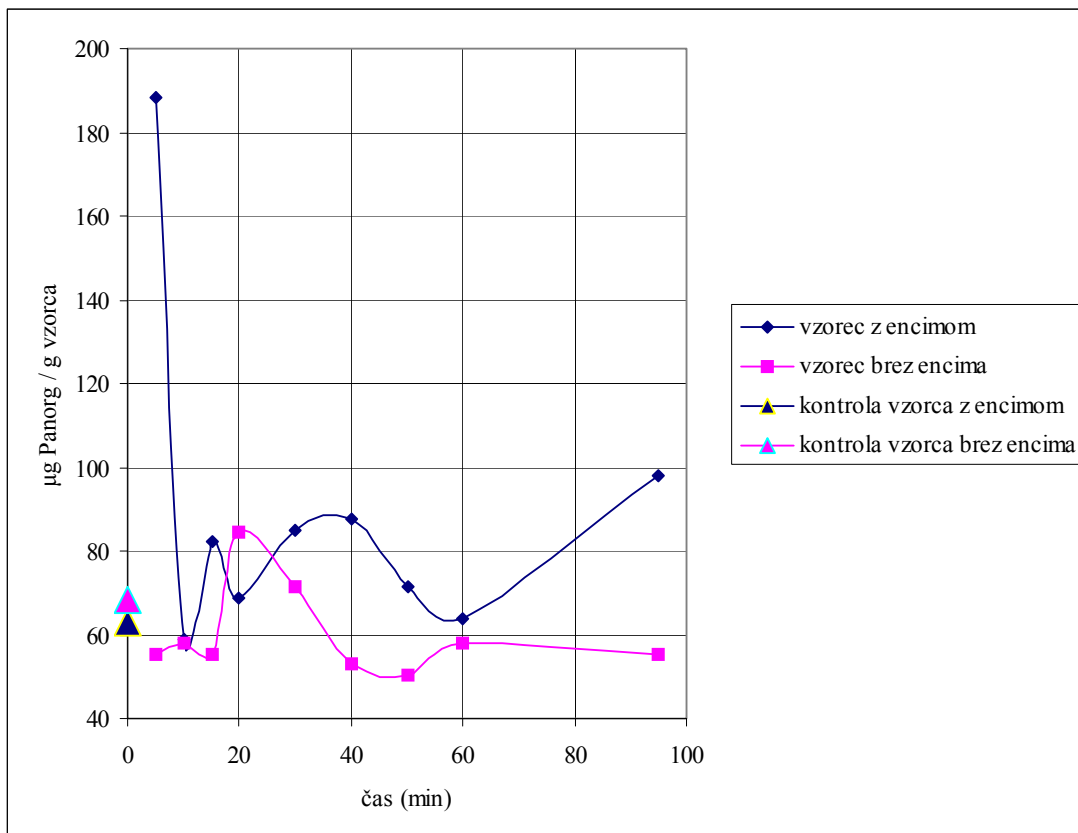
Koncentracija C_{org} je v matriksu sluzi približno štirikrat večja od koncentracije v intersticijski vodi. Koncentracija N_{cel} je v matriksu sluzi desetkrat večja od koncentracije v intersticijski vodi. Razmerje C_{org}/P_{cel} je v matriksu sluzi približno za polovico manjše od razmerja v intersticijski vodi. Razmerje N_{cel}/P_{cel} je v matriksu sluzi malo večje od razmerja v intersticijski vodi.

4. 2 SPROŠČANJE P_{anorg} V VZORCIH MED ENCIMSKO RAZGRADNJO

4. 2. 1 Encim alkalna fosfataza

4. 2. 1. 1 Matriks sluzi-G

V vzorcu z dodanim encimom alkalne fosfataze se je koncentracija sproščene P_{anorg} povečala za skoraj 300 % v času 5 minut, manjše povečanje pa smo opazili v času 15 minut in času 40 minut (Slika 11). Proti koncu eksperimenta je koncentracija sproščene P_{anorg} počasi naraščala.



Slika 11: Rezultati analize sproščanja P_{anorg} v vzorcih matriksa sluzi-G med razgradnjo z encimom alkalno fosfatazo

Sproščanje P_{anorg} po 20 minutah iz vzorca brez encima (naravna razgradnja) je posledica delovanja mikroorganizmov oziroma prostih encimov (teh organizmov) v samem vzorcu.

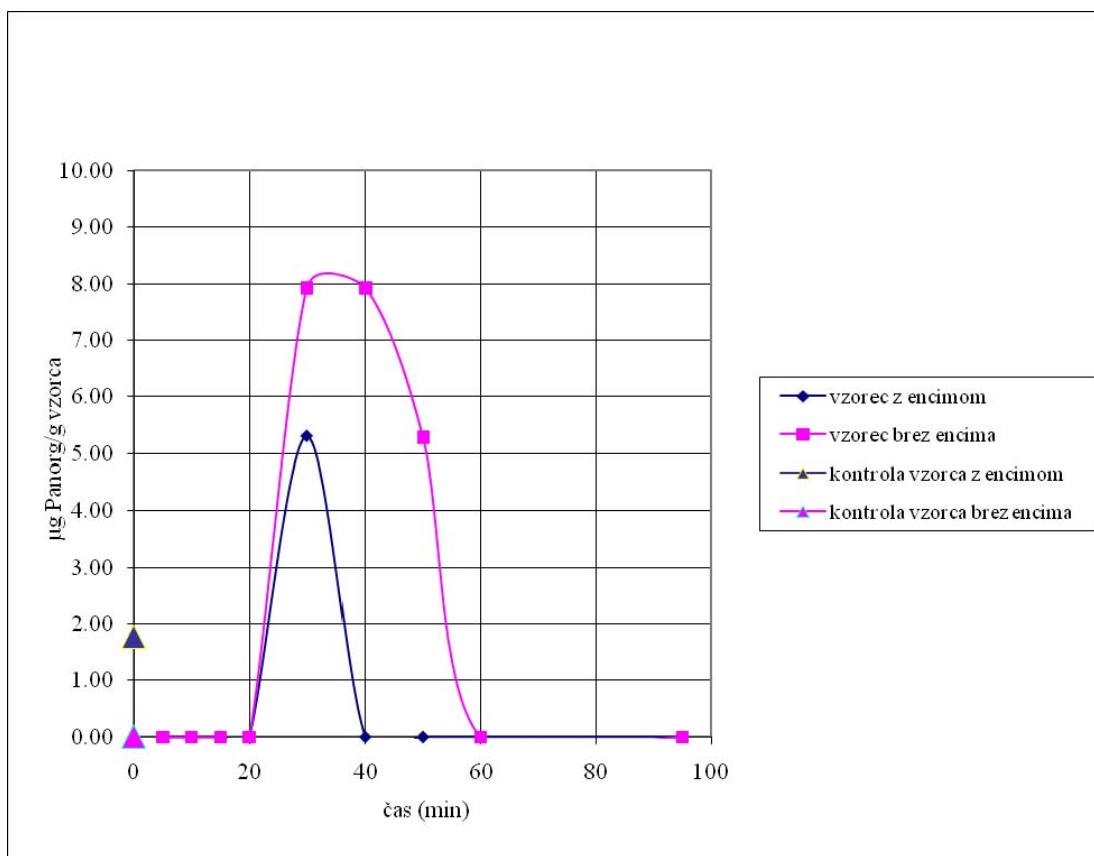
Preglednica 2: Prikaz SD (standardnih odklonov, n = 6) v različnih časih in različnih vzorcih pri meritvah sproščenega P iz matriksa sluzi-G z encimom alkalna fosfataza

čas (min)	SD vzorcev z encimom	SD vzorcev brez encima	SD slepe probe z encimom
0	1,60 %	0,80 %	0,24 %
10	0,56 %	0,51 %	0,24 %
60	0,78 %	0,15 %	0,62 %

Iz Preglednice 2 vidimo, da so SD različnih vzorcev različne. Najmanjše so pri slepih vzorcih, večje pri vzorcih brez encima in največje pri vzorcih z encimom.

4. 2. 1. 2 Intersticijska voda-G

Največje spremembe koncentracije sproščene P_{anorg} smo opazili po 20–60 minutah poteka encimske razgradnje z alkalno fosfatazo (Slika 12). V primeru obeh vzorcev, tj. vzorcu z kot brez encima, nastopi hitro povečanje (izrazit porast) koncentracije P_{anorg} v raztopini v času 20 minut od začetku poskusa. Vrh oziroma najvišjo koncentracijo P_{anorg} smo določili v vzorcu z encimom v času 35 minut, v vzorcu brez encima pa v času 30 minut od začetka poskusa. Po 60 minutah (vzorec brez encima) oziroma po 40 minutah (vzorec z encimom) se koncentracije znižajo na vrednosti določene v začetku eksperimenta.



Slika 12: Rezultati analize sproščanja P_{anorg} v vzorcih intersticijske vode-G med razgradnjo z encimom alkalna fosfataza

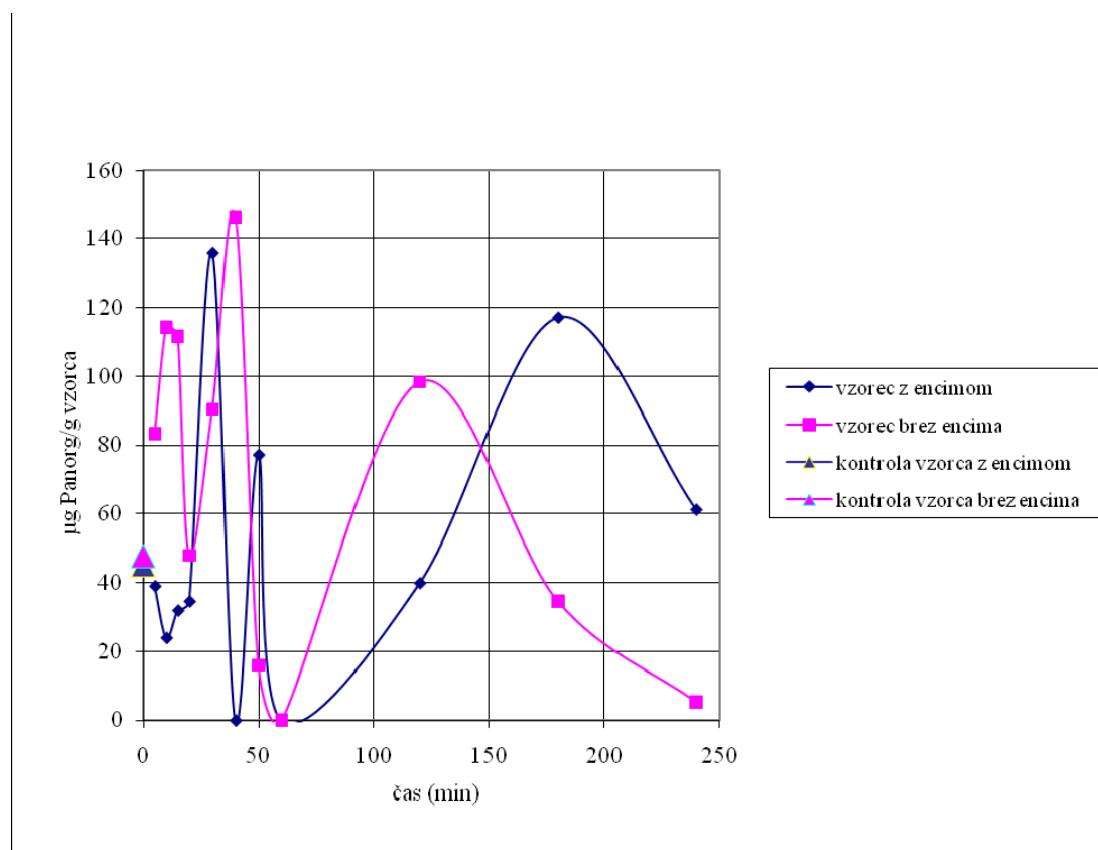
Iz Preglednice 3 vidimo, da so SD izmerjenih koncentracij P_{anorg} izbranih vzorcev različne. Najmanjše so v vzorcih slepega poskusa, večje pa v vzorcih brez encima in največje v vzorcih z encimom. SD v vzorcih intersticijske vode so precej nižje kot SD v vzorcih matriksa sluzi.

Preglednica 3: Prikaz SD (standardnih odklonov, n=6) pri analizi sproščanja P_{anorg} v vzorcih med razgradnjo z encimom alkalno fosfatazo v intersticijski vodi-G

čas (min)	SD vzorcev z encimom	SD vzorcev brez encima	slepi poskus z encimom
0	0,23 %	0,00 %	0,08 %
10	0,05 %	0,20 %	0,10 %
60	0,12 %	0,00 %	0,10 %

4. 2. 2 Proteinaza K

Slika 13 prikazuje spreminjanje koncentracije sproščenega P_{anorg} iz matriksa sluzi-G med razgradnjo z encimom proteinaza K in brez encima. V obeh primerih so opazni trije vrhovi. V vzorcu z encimom smo viške koncentracij določili v času 30, 50 in 180 minut od začetka poskusa, v vzorcu brez encima pa v času 15, 40 in 120 minut od začetka poskusa. Če primerjamo vrhove za posamezne vzorce, vidimo, da obstaja časovni zamik – vrhovi vzorcev z encimom se pojavijo kasneje kakor vrhovi vzorcev brez encima.



Slika 13: Rezultati analize sproščanja P_{anorg} v vzorcih matriksa sluzi-G med razgradnjo z encimom proteinaza K

Standardni odklon v času 5 minut v vzorcu z encimom je bil 0,92 %, v vzorcu brez encima 0,99 % in v slepem poskusu z encimom 0,81 %.

4. 2. 3 Lipaza

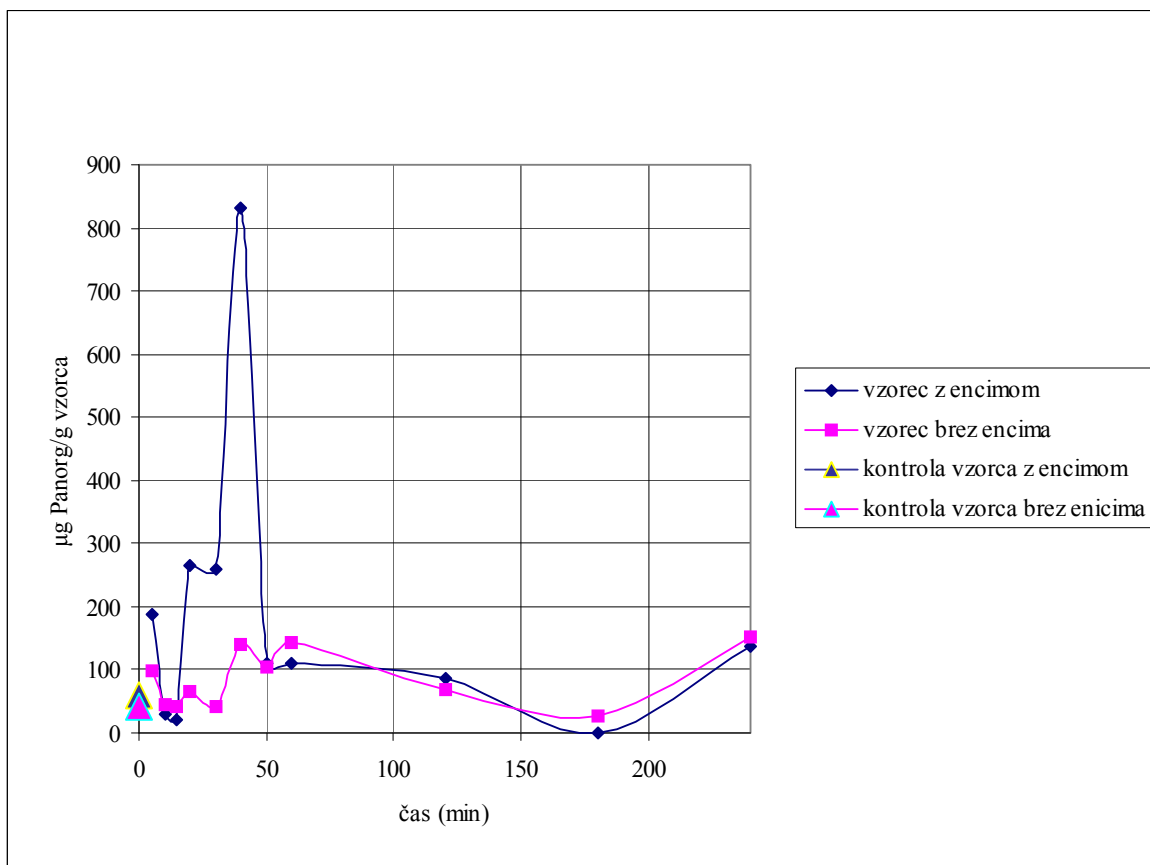
Pri izvedbi eksperimenta smo opazili, da je prišlo do obarvanja tudi v primeru slepega poskusa z encimom. Zato menimo, da z encimom lipaza nastane podobno obarvan kompleks (produkt) z reagenti kakor s P_{anorg} , ki ga s to metodo določamo. Izmerjene vrednosti koncentracije P_{anorg} v vzorcu z encimom in njegovem slepem poskusu so bile zato podobne.

4. 2. 4 α amilaza

Rezultati poskusa vodijo do podobnega sklepa kakor v primeru obdelave vzorcev z encimom lipazo. Liofiliziran encim (prah) namreč vsebuje Na_3PO_4 (vir P_{anorg}).

4. 2. 5 Pankreatin

Merjenje koncentracije sproščenega P_{anorg} med encimsko razgradnjo matriksa sluzi-G (Slika 14) s pankreatinom kaže najvišjo vrednost po 40 minutah poteka eksperimenta. Koncentracija P_{anorg} je bila $830 \mu\text{g } P_{\text{anorg}}/\text{g}$ vzorca, kar predstavlja 1360 % začetne koncentracije pred dodatkom pankreatina. V prvi uri eksperimenta smo pri vzorcu brez pankreatina opazili več manjših vrhov (koncentracija $P_{\text{anorg}} < 150 \mu\text{g}/\text{g}$ vzorca). Po 60 minutah opazimo v obeh primerih manjše nihanje vrednosti koncentracij, ki se v dveh urah in pol po dodatku encima približajo začetni vrednosti ter nato spet počasi naraščajo.

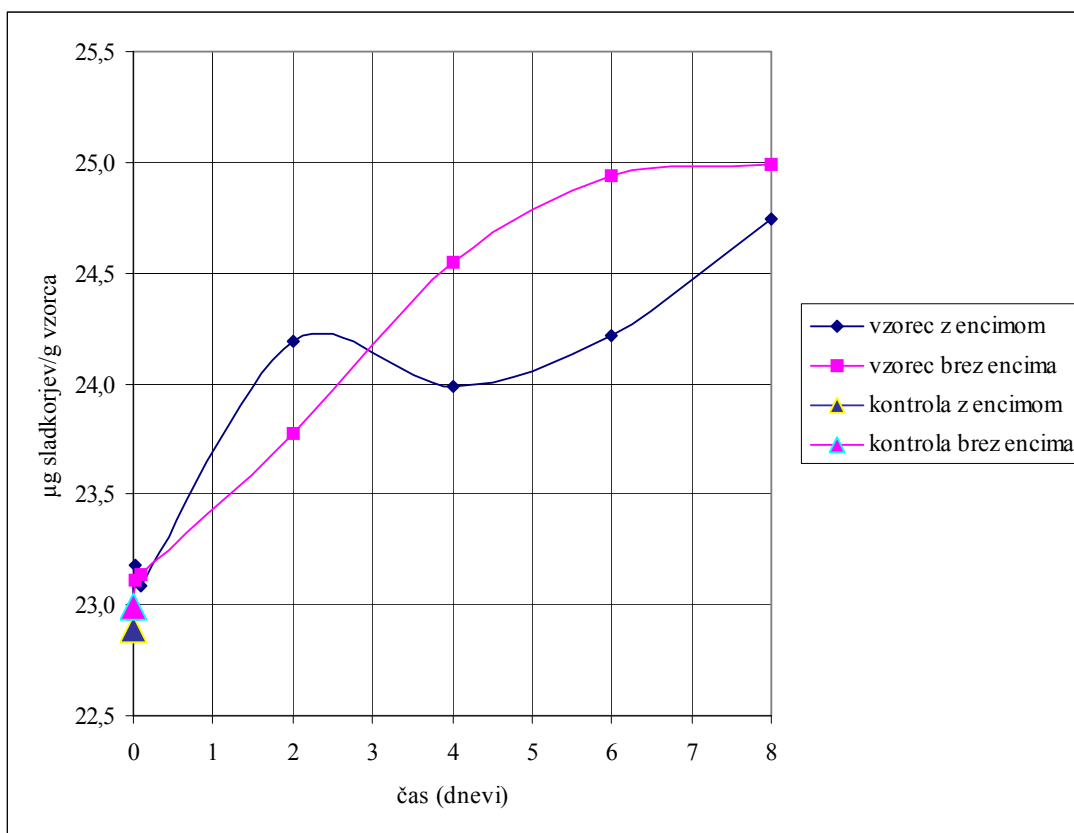


Slika 14: Rezultati analize sproščanja P_{anorg} v vzorcih matriksa sluzi-G med razgradnjo z encimi pankreatina

Standardni odklon v času 5 minut v vzorcu z encimom je bil 3,26 %, v vzorcu brez encima 0,41 in v slepem poskusu z encimom 0,40 %.

4. 3 SPROŠČANJE OGLJIKOVIH HIDRATOV MED ENCIMSKO RAZGRADNJO S ALKALNO FOSFATAZO

Meritve koncentracij sproščenih ogljikovih hidratov med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo kažejo na šibke povezave med sladkorno in P komponento v matriksu sluzi. V primeru encimske razgradnje je koncentracija sproščenih ogljikovih hidratov v prvih dveh dneh po dodatku encima naraščala do 24,2 μg ogljikovih hidratov/g vzorca, nato pa je sledil rahel padec koncentracije. Kmalu je koncentracija spet začela naraščati in je ob koncu poskusa (osmi dan inkubacije) dosegla 24,8 μg ogljikovih hidratov/g vzorca. V vzorcu brez encima je med poskusom koncentracija ogljikovih hidratov bolj enakomerno naraščala, tj. do približno 8 dni od začetku poskusa, ko smo določili najvišjo vrednost 25,5 μg ogljikovih hidratov/g vzorca.

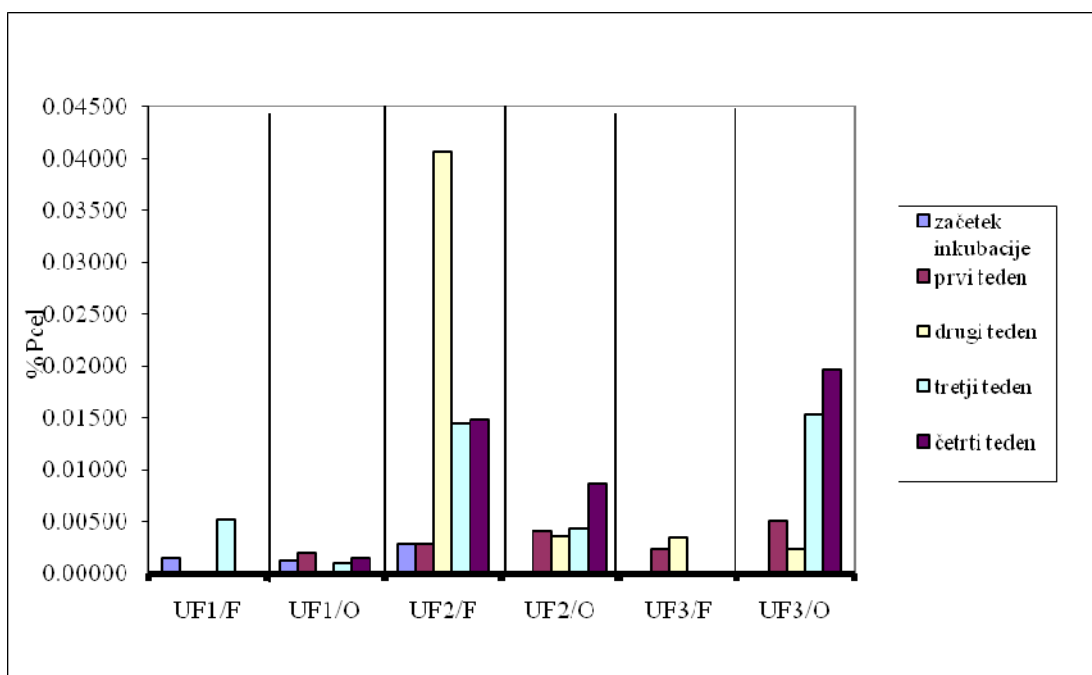


Slika 15: Rezultati analize sproščanja ogljikovih hidratov iz matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo s alkalno fosfatazo

4. 4 P_{cel} V FRAKCIONIRANIH MORSKIH MAKROAGREGATIH MED MIKROBNO RAZGRADNJO

4. 4. 1 P_{cel} med poskusom v različnih frakcijah morskih makroagregatov

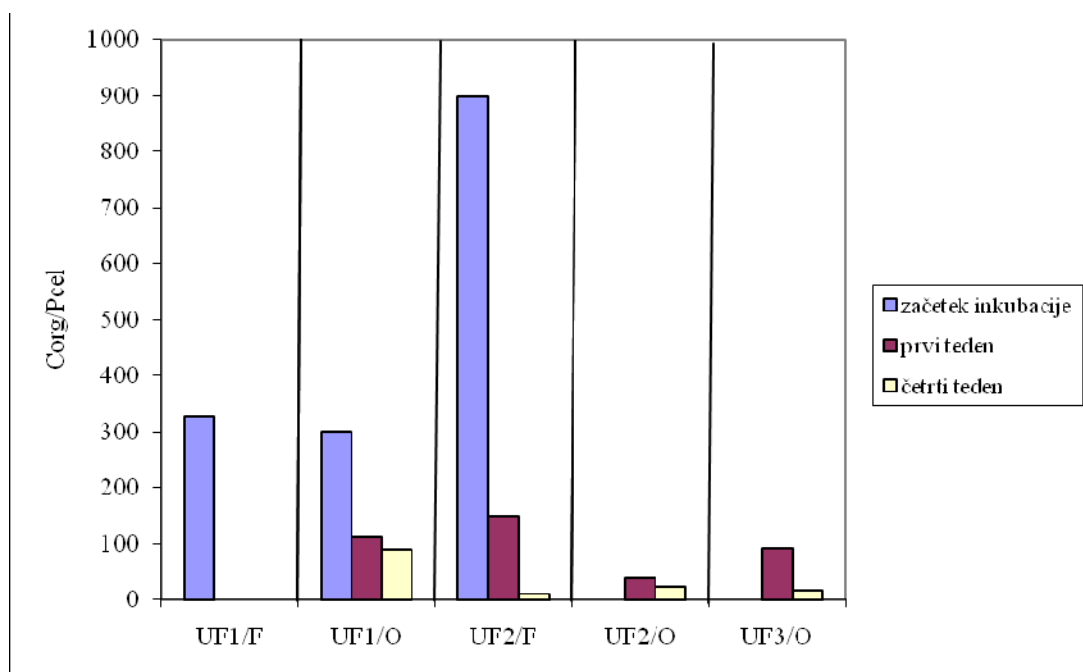
Koncentracije P_{cel} , določene v različnih frakcijah, vzorčenih med eksperimentom naravne razgradnje (med inkubacijo), so si med seboj različne. Zaradi manjkajočih podatkov ne moremo natančno določiti trenda upadanja ali naraščanja P v različnih komponentah in časih (Slika 16). Pri tem pa smo opazili, da na začetku inkubacije prevladujejo relativno majhne koncentracije P v večjih frakcijah (UF1/F, UF1/O, UF2/O), v manjših frakcijah (UF2/O, UF3/F in UF3/O) pa je opazen trend povečevanja koncentracije P med inkubacijo. Pri UF2/F je bila najvišja koncentracija P v drugem tednu, tretji in četrti teden pa se koncentracija v tej frakciji sicer precej zmanjšala, a je bila še vedno precej višja glede na tisto izmerjeno po enem tednu ali na začetku inkubacije.



Slika 16: Delež P_{cel} v različnih frakcijah morskih makroagregatov med mikrobno razgradnjo (kjer stolpec manjka ni podatka)

4. 4. 2 Razmerja C_{org}/P_{cel} med poskusom v različnih frakcijah morskih makroagregatov

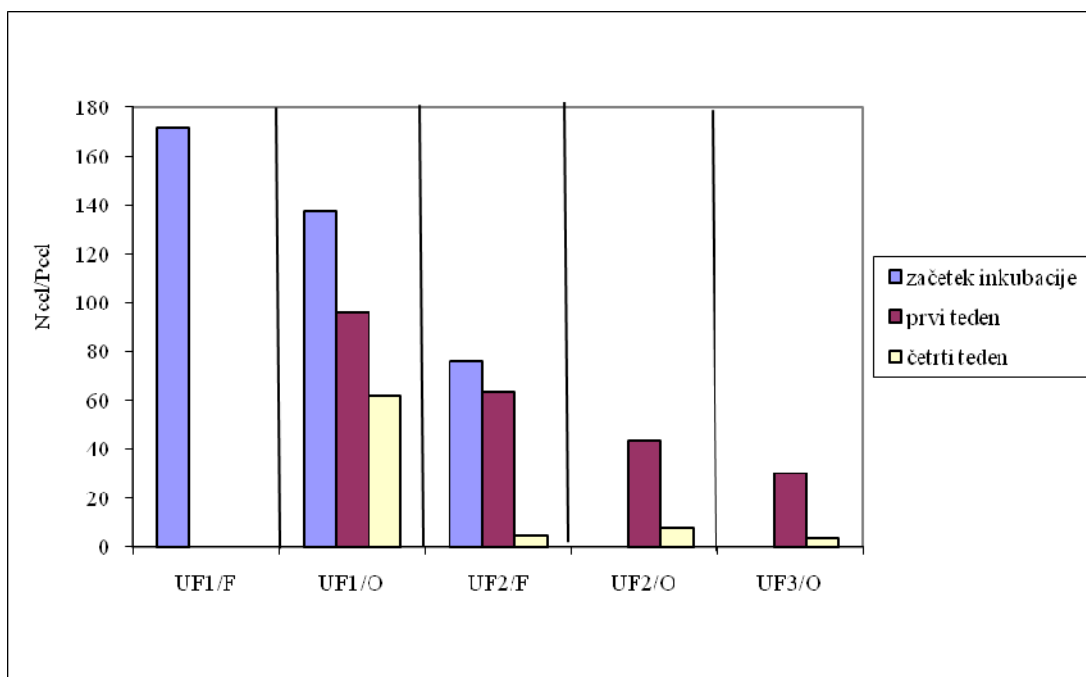
Podobno kakor v primeru določitve P_{cel} zaradi manjkajočih podatkov tudi v tem primeru nismo mogli natančno določiti trenda upadanja ali naraščanja razmerja C_{org}/P_{cel} (Slika 17). Kljub temu je vidno, da so bila razmerja v začetku inkubacije precej višja kakor tista izmerjena po prvem tednu inkubacije. Najnižja razmerja smo določili v frakcijah, vzorčenih po 4 tednih inkubacije.



Slika 17: Razmerje C_{org}/P_{cel} v različnih frakcijah morskih makroagregatov med mikrobo razgradnjo (kjer stolpec manjka ni podatka)

4. 4. 3 Razmerja N_{cel}/P_{cel} med poskusom v različnih frakcijah morskih makroagregatov

Najvišja razmerja N_{cel}/P_{cel} smo posameznih komponentah makroagregatov določili v začetku inkubacije, najmanjša pa po štirih tednih oziroma ob koncu eksperimenta. Poleg trenda zniževanja razmerja N_{cel}/P_{cel} med potekom poskusa smo opazili, da so višja razmerja N_{cel}/P_{cel} značilna za večje komponente.



Slika 18: Razmerje N_{cel}/P_{cel} v različnih frakcijah morskih makroagregatov med mikrobovo razgradnjo (kjer stolpec manjka ni podatka)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5. 1 RAZPRAVA

5. 1. 1 P_{cel} v matriksu sluzi-G, matriksu sluzi-P in intersticijski vodi-G

Pričakovali smo, da bo koncentracija P_{cel} v intersticijski vodi-G nižja od tiste izmerjene v matriksu sluzi-G. Rezultat, t. j. osemkrat nižja koncentracija P_{cel} v intersticijski vodi-G glede na koncentracijo P_{cel} matriksa sluzi-G 2, potrjuje našo hipotezo. Verjetno je to posledica manjše vsebnosti s P bogate organske snovi v intersticijski vodi oziroma manjšega deleža anorganske snovi v matriksu sluzi-G.

Poleg tega smo predvidevali, da bomo v matriksu bolj »svežih« sluzi določili več P kakor v zrejših, saj smo menili, da se je med razvojem matriksa sluzi zmanjševala količina P zaradi razgradnje labilnejših komponent in sproščanja P v okolno vodo. Rezultati so dokazali prav nasprotno, saj je bila koncentracija P_{cel} matriksa sluzi-P (bolj »sveža«) približno petkrat nižja od koncentracije P v matriksu sluzi-G 2. Vsebnost P_{cel} se torej povečuje z zorenjem/staranjem morskih makroagregatov. Vzrok za to lahko poiščemo v biokemijski sestavi organsko vezanega P. Raziskave makromolekularnega DOP (>1 kDa) z uporabo ^{31}P -NMR (Kolowith in sod., 2001; Cade-Menum, 2005) so pokazale, da je le-ta zelo enakomerno porazdeljena v morju, ne glede na lokacijo in globino. Poleg tega so analize pokazale na dokaj visoko in konstantno vsebnost fosfatov (približno 25 %; vez C-P), ostalo pa sestavljajo fosfoestri (vez C-O-P), ki naj bi bili bolj razgradljivi (Ruttenberg, 2004). Drugi razlog je lahko limitativna vloga P. Mikrobi verjetno P takoj po sprostitvi iz organske snovi, ki poteka z izvenceličnimi encimi, učinkovito in hitro asimilirajo nazaj v organsko snov in preprečijo izgube P v okolno vodo.

5. 1. 2 Panorg v vzorcih med encimsko razgradnjo

Pri encimski razgradnji z encimi alkalno fosfatazo, α amilazo, proteinazo K, lipazo ter pankreatinom (zmes encimov) izbranih substratov smo med poskusi merili P_{anorg} , ki se je posledično sproščal iz organskih oblik P. Pri tem smo pričakovali dvig koncentracije P zaradi delovanja izbranih in prostih encimov (že prisotnih izvenceličnih mikrobnih encimov v vzorcu). Zaradi visoke aktivnosti dodanega encima smo menili, da se bo takoj po dodatku encima sprostil najprej lažje dostopen P in nato, s pomočjo delovanja drugih že prisotnih encimov vzorca, še težje dostopen P.

Rezultati potrjujejo naše hipoteze, saj je v grafih (Slike 11, 13, 14) encimske razgradnje matriksa sluzi-G prisotnih več (ločenih) vrhov sproščenega P.

V primeru encimske razgradnje s proteinazo K (Slika 13) smo tako v vzorcih z in brez encima opazili enako število vrhov približno na enakih mestih, le-da so bili le-ti pri vzorcu z encimom nekoliko širši in so se pojavili nekoliko kasneje.

Največji obseg sproščanja P smo predvidevali pri razgradnji s pankreatinom, saj njegovi sestavni encimi hitro in učinkovito razgrajujejo organsko snov in sproščajo hranila, kar bi

omogočilo hitro sproščanje tako lažje kakor težje dostopnega P. Pričakovali smo, da bo alkalna fosfataza sprostila manjše količine P, najmanjšo učinkovitost pa smo pričakovali pri ostalih encimih. Rezultati so potrdili to hipotezo.

Razlog za prisotnost več vrhov v grafih časovnega poteka encimske razgradnje tako pri vzorcu z kakor tudi brez encima je verjetno v tem, da je sluz izredno kompleksen substrat, ki zaradi svoje strukture onemogoča hiter in neoviran dostop encimov do substrata v notranjosti matriksa. Zato poteče v prvi fazi defosforilacija lažje dostopnih mest v organskem matriksu, najverjetneje fosfoestrov, kar kasneje omogoči »odprtje« oziroma dostop do ustreznega substrata v zamreženi strukturi.

V nasprotju z analizami matriksa so rezultati poskusov z uporabo intersticijske vode nezanesljivi.

Naša osnovna hipoteza je predvidevala počasnejšo razgradnjo in sproščanje P v primerjavi s sproščanjem N iz organskih molekul. Posledica naj bi bila manjša dostopnost P za bakterijske združbe. Rezultati merjenja P_{anorg} v vzorcih med encimsko razgradnjo tega niso potrdili, saj je bilo sproščanje P z alkalno fosfatazo in pankreatinom hitro.

5. 1. 3 Sproščanja ogljikovih hidratov med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo

Zvečanje koncentracije sproščenih ogljikovih hidratov med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo kaže na šibke povezave med ogljikovimi hidrati in P komponento v matriksu sluzi. V Grafu 16 je prikazan vrh, ki se pojavi približno 1 dan od začetka poskusa in kaže na učinkovanje dodanega encima v tem času. K rezultatu pa verjetno pripelje še naravna mikrobnna komponenta, tj. v smislu razgradnje in sproščanja P kot tudi porabe. V primeru »naravne razgradnje« (vzorec brez encima) med poskusom zasledimo bolj enakomerno sproščanje in porast koncentracij ogljikovih hidratov zaradi aktivne, v vzorcu prisotne mikrobnne komponente oziroma aktivnih prostih encimov. V obeh primerih gre le za majhno povečanje koncentracije ogljikovih hidratov.

5. 1. 4 P_{cel} v frakcioniranih morskih makroagregatih med mikrobnno razgradnjo

Pričakovali smo, da bomo na začetku inkubacije največ P izmerili v največji frakciji (UF1/F), ob koncu inkubacije pa največ v najmanjši frakciji (UF3/O). Ker je P pomembna sestavina organskih kompleksov, smo menili, da se bo med inkubacijo P sproščal v raztopino zaradi razgradnje z izvenceličnimi encimi prisotnih mikrobov. Ker so v različnih časih inkubacije koncentracije P_{cel} v določenih frakcijah različne, lahko sklepamo, da se je P med inkubacijo razporejal (frakcioniral) v različne frakcije (diferencialna razgradnja).

Izmerjene nizke koncentracije P_{cel} v frakcijah UF1/F, UF1/O, UF2/O so ovrgle našo hipotezo, da je večina P v začetku eksperimenta vezanega v večjih organskih kompleksih. Kljub temu pa rezultati kažejo dvig koncentracije P med inkubacijo v manjših frakcijah UF2/O, UF3/F in UF3/O, kar potrjuje našo hipotezo, da se koncentracija P v manjših

frakcijah v času povečuje zaradi ohranjanja tistih delov makromolekul (polisaharidov), ki vsebujejo P. Frakcija UF3/F tudi potrjuje našo hipotezo, saj se v tej frakciji, verjetno zaradi razgradnje z izvenceličnimi encimi mikrobov, drugi teden koncentracija najprej poveča, tretji in četrti pa zmanjša.

Rezultati so potrdili našo hipotezo, da se je razmerje C_{org}/P_{cel} zmanjševalo med inkubacije zaradi zmanjševanja C_{org} (zaradi razgradnje organske snovi z izvenceličnimi encimi mikrobov med inkubacijo) in ohranjanja P (zaradi učinkovite in hitre mikrobne asimilacije P po razgradnji z izvenceličnimi encimi).

Nadalje smo menili, da bodo najvišja razmerja C_{org}/P_{cel} v največjih frakcijah, ker je v večjih makroagregatih prisotna večja koncentracija C_{org} , hkrati pa manjša koncentracija P. Rezultati te hipoteze ne potrjujejo in ponovno nakazujejo ohranjanje organsko vezanega P.

V skladu z našimi pričakovanji se je razmerje N_{cel}/P_{cel} zmanjševalo med inkubacijo, kar je verjetno posledica razgradnje organsko vezanega N z izvenceličnimi encimi mikrobov. Najvišja razmerja N_{cel}/P_{cel} smo določili v višjih frakcijah, kar se ujema s predhodnimi rezultati, ki kažejo na večjo vsebnost N, verjetno N-vsebujočih polisaharidov, v višjih (koloidnih) frakcijah intersticijske vode makroagregatov (Faganeli in sod., 2010).

5. 1. 5 Pomen razgradnje P v makroagregatih Tržaškega zaliva

Matriks makroagregatov iz vodnega stolpca v Tržaškem zalivu je v letu 2004, po naših rezultatih sodeč, vseboval v povprečju 285 $\mu\text{g P/g}$ (makroagregatov). Če upoštevamo, da alkalna fosfataza hitro (v nekaj minutah) razgradi okrog 2/3 vsega P in da razgradni produkti prehajajo v raztopino (vodno fazo), lahko sklepamo, da se ga torej približno 1/3 sedimentira. V poletnem stratificiranem vodnem stolpu je ta sedimentacija počasna. Intenzivno razgradnjo P v matriksu makroagregatov potrjuje tudi velika razlika med vsebnostmi P v vzorcu odvzetem v vodnem stolpcu in tistem pri dnu. Pri tem se, verjetno predvsem iz fosfopolisaharidov, počasneje (v urah) sproščajo tudi ogljikovi hidrati. Sedimentirani P se vključuje v kroženje P v sedimentu, kjer se končno tudi dolgoročno deponira (Ogrinc in Faganeli, 2006). Če upoštevamo, da je povprečna koncentracija DOC v Tržaškem zalivu 0,1 mmol/L (Faganeli in Herndl, 1991; De Vittor in sod., 2008), razmerje C_{org}/P 1287 (molsko) v intersticijski vodi (makromolekulah) makroagregatov, ki so njihov prekursor (Verdugo in Santschi, 2010), in da ga je približno 1/4 makromolekularno ($>1\text{kDa}$) vezanega (Mopper in sod., 2007), lahko ocenimo, da je približno makromolekularno vezanega DOP le 0,02 $\mu\text{mol/L}$. Upoštevajoč povprečno koncentracijo DOP v Tržaškem zalivu približno 3 $\mu\text{mol/L}$ (Faganeli in Herndl, 1991), bi bilo tako le $<1\%$ makromolekularno vezanega DOP. To pritrjuje mnogim ugotovitvam, da je rezervoar DOP v morju pretežno sestavljen iz nizkomolekularnih spojin (Ruttenberg, 2004). Višjemolekularne frakcije DOP se torej intenzivneje razgrajujejo in nižjemolekularne preferenčno ostajajo v raztopini (morski vodi). Za verifikacijo teh izračunov načrtujejo izolacijo raztopljenih makromolekularnih organskih snovi (UDOM) iz Tržaškega zaliva in njene nadaljnje analize ter študije razgradnje.

5. 2 SKLEPI

- Koncentracije P_{cel} so manjše v intersticijski vodi kakor v matriksu sluzi, kar je verjetno posledica višje vsebnosti organske komponente. Koncentracija P_{cel} je bila v večjem oz. zrelejšem morskem makroagregatu večja kakor v mlajšem, kar kaže na povečanje celotne koncentracije P z velikostjo oz. s staranjem morskih makroagregatov. Razlog za to je verjetno prisotnost frakcije z ohranjenim P, pa tudi omejujoča vloga P, kar vodi v hitro asimilacijo P ob njegovem sproščanju z izvenceličnimi encimi mikrobov.

- Ob razgradnji z alkalno fosfatazo in pankreatinom je vidno tako sproščanje P zaradi delovanja dodanega encima/encimov kot zaradi že prisotnih izvenceličnih encimov mikrobov v vzorcu. Tako alkalna fosfataza kot zmes encimov pankreatina sproščajo P iz matriksa sluzi-G. Pankreatin sprošča P precej hitreje kakor alkalna fosfataza zaradi učinkovite hkratne razgradnje z različnimi proteolitičnimi encimi. Pri hidrolizi s proteinazo K ne opazimo sproščanja P.

- Ob razgradnji z alkalno fosfatazo je vidno sproščanje ogljikovih hidratov tako zaradi dodanega encima alkalna fosfataza, kakor zaradi izvenceličnih encimov mikrobov v vzorcu. Sklepamo, da ima P v morskih makroagregatih povezovalno vlogo, saj razgradnja z alkalno fosfatazo poleg P sprošča v manjši meri tudi monosaharide.

- P se je med mikrobovno razgradnjo v inkubacijskem poskusu porazdelil med različnimi frakcijami. Koncentracija P v manjših frakcijah se je v času povečevala verjetno zato, ker so se P vsebujoče molekule med inkubacijo ohranjale, druge pa razgrajevale z izvenceličnimi encimi prisotnih mikrobov. Razmerje C_{org}/P_{cel} se je zmanjševalo med inkubacijo, prav tako zaradi razgradnje organske snovi z izvenceličnimi encimi mikrobov. Razmerje N_{cel}/P_{cel} se je tudi zmanjševalo med inkubacijo, verjetno zaradi razgradnje organsko vezanega N z izvenceličnimi encimi mikrobov. Najvišja razmerja N_{cel}/P_{cel} smo zasledili v največjih frakcijah verjetno zato, ker so v večjih makroagregatih prisotne večje vsebnosti N_{cel} , najverjetneje v obliki aminopolisaharidov.

6 POVZETEK

Glavne oblike P v naravnih vodah so orto-, meta-, pirofosfati in polifosfati ter različne P-vsebujoče organske snovi. Organske oblike P so nukleinske kisline, fosfolipidi, inozitol fosfati, fosfoamidi, fosfoproteini, fosfolidi, fosforilirani ogljikovi hidrati in aminofosforne kisline. Globalno kroženje P je pretežno geokemijsko, saj vključuje preperevanje, transport in sedimentacijo. Glavni procesi v globalnem kroženju P niso mikrobnno vodeni. Mikrobi lahko P sproščajo iz organske snovi z mineralizirajo, raztapljanjem mineralov, hkrati P lahko tudi obarjajo, reducirajo ali oksidirajo. Majhna topnost P mineralov je vzrok, da večina P, deponiranega v sedimentih in prsti (tudi tam, kjer ga je precej), ni na razpolago za rast rastlinam in živalim in je pogosto omejujoč dejavnik rasti.

Morski makroagregati so kompleksna zmes ogljikovih hidratov, proteinov in lipidov ter anorganske komponente. V morskih makroagregatih je prisotna kompleksna združba mikroorganizmov, ki vključuje fitoplankton, bakterije in cianobakterije, mezozooplankton in mikrozooplankton, poleg žive biološke komponente pa še odmrle ostanke.

DOM predvsem na faznih mejah lahko tvori mikrogel. Ti mikrogeli vsebujejo polisaharide, proteine in verige nukleinskih kislin. Vsi skupaj tvorijo nekovalentno povezane polimerne mreže z naključno strukturo, ki jo verjetno stabilizirajo Ca^{2+} ionske vezi. Zaradi ohlapno povezane strukture ostaja gel v reverzibilnem ravnotežju sestavljanja in razpadanja. Ultravijolično B (UV-B) sevanje razgradi oz. onemogoča nastanek mikrogela, nastanek pa pospeši prisotnost visokih koncentracij dvovalentnih kationov, kot so Ca, Cu, Pb in As. Pri veliki ionski moči in nizkem pH zaradi anoksičnih razmer, je manj elektrostatskih odbojev in je agregacija delcev povečana. Nanogeli in mikrogeli lahko rastejo s trki in pritrditvami drug na drugega, s čimer nastajajo večji makrogeli in večji delci, kot so TEP. Nastanek morskih makroagregatov je torej odvisen od procesov preoblikovanja makromolekularne DOM v COM in nato v POM. Morski makroagregati so tako sestavljeni iz DOM, COM in POM. Obstajata osnovni hipotezi o nastanku mikrogelov in makro-gelov: (i) agregacija polimernih fibril in kolloidov s trki, ki tvorijo večje delce; (ii) spontano sestavljanje polimerov DOM v večje polimerne gele. Na pojav morskih makroagregatov vplivajo še visoka temperatura, šibek zahodni jadranski tok, brezvetrje.

Tržaški zaliv v severnem delu Jadranskega morja je plitek, napol zaprt zaliv, za katerega so značilna velika nihanja temperature in površinske slanosti. Zaradi spomladanske in poletne otoplitve zgornje plasti se razvije stratifikacija, ki traja do jeseni. V severnem Jadranu so opazili sezonske masivne pojave morskih makroagregatov pozno pomladi in poleti, ko je vodni stolpec razslojen. Občasni pojavi morskih makroagregatov različnih jakosti so v severnem Jadranu v nepravilnih intervalih stalnica že vsaj 280 let. Pojav morskih makroagregatov v severnem Jadranu ima resne posledice za okolje in gospodarstvo obalnih območij. Prizadete so ribiška dejavnost, turizem in marikultura. Morski makroagregati vplivajo na razvoj jajc, ličink in mladice morskih organizmov. Sedimentacija morskih makroagregatov ima negativen vpliv na bentoške organizme. Zato je pomembno, da raziskujemo nastajanje morskih makroagregatov, da bi ga lahko uspešno napovedovali ali celo preprečili.

Cilj diplomskega dela je bil osvetlitev morskih makroagregatov kot vira P, omejujočega dejavnika primarne produkcije v severnem Jadranu, z analizo celotnega in P_{anorg} v različnih komponentah makroagregatov in s hidrolizo organo-P spojin z uporabo alkalne fosfataze in drugih encimov. Naše analize smo razdelili v štiri stopnje. V prvi stopnji smo analizirali P_{cel} v liofiliziranih vzorcih matriksa sluzi-G, matriksa sluzi-P in v intersticijski vodi-G. Vzorci iz površine so bolj »sveži« v primerjavi z vzorci vodnega stolpca. P_{cel} smo določali spektrofotometrično. V drugi stopnji smo želeli opazovati sproščanje P_{anorg} v raztopino kot posledico delovanja dodanih določenih encimov in hkrati primerjali sproščanje P_{anorg} kot posledico delovanja že prisotnih izvenceličnih encimov mikrobov vzorca. Izvedli smo inkubacijo vzorca z in brez dodanega encima ter odvezemali in analizirali vzorce v določenih časih inkubacije. P_{anorg} , ki se je sprostil v raztopino zaradi razgradnje z encimi, smo določali spektrofotometrično.

V tretji stopnji smo želeli opazovati sproščanje monosaharidov v raztopino kot posledico delovanja dodanega encima alkalne fosfataze in hkrati primerjati sproščanje monosaharidov kot posledico delovanja že prisotnih izvenceličnih encimov mikrobov vzorca. Izvedli smo inkubacijo vzorca z in brez dodane alkalne fosfataze ter odvezemali in analizirali vzorce v določenih časih inkubacije. Monosaharide, ki so se sproščali v raztopino zaradi razgradnje z alkalno fosfatazo, smo določali spektrofotometrično. V zadnji stopnji smo nadaljevali poskuse T. Marinšek (2008), ki je spremljala mikrobovo razgradnjo organske snovi v intersticijski vodi s štiritedensko inkubacijo v rastni komori v temi na stresalniku pri 25 °C. Podvzorce različnih časov inkubacij je ultrafiltrirala in tako dobila šest različnih velikostnih frakcij. V teh frakcijah smo spektrofotometrično določili koncentracijo P_{cel} .

Z analizami smo prišli do več zanimivih ugotovitev. P_{cel} se povečuje z velikostjo oz. s staranjem morskih makroagregatov. Razlog za to je verjetno ohranjanje organsko vezanega P, pa tudi limitativna vloga P, ki vodi v njegovo hitro asimilacijo ob sproščanju z izvenceličnimi encimi mikrobov. Alkalna fosfataza in tudi zmes encimov pankreatina sproščajo P iz matriksa sluzi-G. Proteinaza K sama ne sprošča P, ampak prispeva k hitrejšem in večjem sproščanju P v sodelovanju z že prisotnimi izvenceličnimi encimi mikrobov vzorca. P ima v morskih makroagregatih povezovalno vlogo, saj razgradnja z alkalno fosfatazo poleg P sprošča tudi monosaharide.

P se je med mikrobovo razgradnjo v inkubacijskem poskusu razporejal (frakcioniral) med različnimi velikostnimi frakcijami. Koncentracija P v manjših frakcijah se je v času povečevala verjetno zato, ker se je P med inkubacijo ohranjal, druge sestavine pa so se razgrajevale z izvenceličnimi encimi prisotnih mikrobov. Rezultati so potrdili našo hipotezo, da se je razmerje $C_{\text{org}}/P_{\text{cel}}$ zmanjševalo med inkubacijo zaradi zmanjševanja C_{org} (zaradi razgradnje organske snovi z izvenceličnimi encimi mikrobov med inkubacijo) in ohranjanja P (zaradi učinkovite in hitre mikrobne asimilacije P po razgradnji z izvenceličnimi encimi). Razmerje $N_{\text{cel}}/P_{\text{cel}}$ se je med inkubacijo tudi zmanjševalo, verjetno prav tako zaradi razgradnje organske snovi z izvenceličnimi encimi mikrobov in ohranjanja P-vsebujočih molekul. Najvišja razmerja $N_{\text{cel}}/P_{\text{cel}}$ smo izmerili v največjih frakcijah, verjetno zato, ker je tam več N_{cel} , verjetno v obliki aminopolisaharidov.

7 VIRI

- Allredge A. L. 1999. The potential role of particulate diatom exudates in forming nuisance mucilaginous scums. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita*, 35: 397–400
- Allredge A. L., Passow U., Logan B. E. 1993. The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Research*, 40: 1131–1140
- Allredge A. L. 1999. The potential role of particulate diatom exudates in forming nuisance mucilaginous scums. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita*, 35: 397–400
- Allredge A. L., Crocker K. M. 1995. Why do sinking mucilage aggregates accumulate in the water column? *Science of the Total Environment*, 165, 1–3: 15–22
- Allredge A. L., Silver M. W. 1988. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Progress in Oceanography*, 20, 1: 41–82
- Aluwihare L., Repeta D. J. 1999. A comparison of the chemical characteristics of oceanic DOM and extracellular DOM produced by marine algae. *Marine Ecology Progress Series*, 186: 105–117
- Apostolaki E. T., Tsagaraki T., Tsapakis M., Karakassis I. 2007. Fish farming impact on sediments and macrofauna associated with seagrass meadows in the Mediterranean. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 75, 3: 408–416
- Arnosti C. 2000. Substrate specificity in polysaccharide hydrolysis: Contrast between bottom water and sediments. *Limnology and Oceanography*, 45: 1112–1119
- Aviles A., Niell F. X. 2005. Pattern of phosphorus forms in a Mediterranean shallow estuary: Effect of flooding events. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64, 4: 786–794
- Aviles A., Rodero J., Amores V., Vicente I., Rodriguez M. I. Niell F. X. 2006. Factors controlling phosphorus speciation in a Mediterranean basin (River Guadalfeo, Spain). *Journal of Hydrology*, 331, 3–4: 396–408
- Aydin I., Aydin F., Saydut A., Hamamci C. 2009. A sequential extraction to determine the distribution of phosphorus in the seawater and marine surface sediment. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 664–669
- Azam F., Fonda Umami S., Funari E. 1999. Significance of bacteria in the mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita*, 35, 3: 411–419
- Azam F., Long R. A. 2001. Sea snow microorganisms. *Nature*, 414: 495–498
- Baldi F., Minacci A., Sailot A., Mejanelle L., Mozetič P., Turk V., Malej A. 1997. Cell lysis and release of particulate polysaccharides in extensive marine mucilage assessed by lipid biomarkers and molecular probes. *Marine Ecology Progress Series*, 153: 45–57
- Barbosa A. B., Galvao H. M., Mendes P. A., Alvarez-Salgado X. A., Figueiras F. G., Joint I. 2001. Short-term variability of heterotrophic bacterioplankton during upwelling off the NW Iberian margin. *Progress in Oceanography*, 51, 2: 339–359
- Benner R. H. 1998. Cycling of dissolved organic matter in the ocean. *Ecological Studies*, 133: 317–331
- Bochdansky A. B., Herndl G. J. 1992. Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the Northern Adriatic Sea. V. Role of fecal pellets in marine snow. *Marine Ecology Progress Series*, 87: 135–146
- Cade-Menun B.J. 2005. Characterizing phosphorus in environmental and agricultural samples by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Talanta*, 66: 359–371
- Cappiello A., Trufelli H., Familini G., Pierini E., Capellacci S., Penna A., Ricci F., Ingarao C., Penna N. 2007. Study on the oligosaccharides composition of the water-soluble

- fraction of marine mucilage by electrospray tandem mass spectrometry. *Water Research*, 41: 2911–2920
- Carman K. R. 1990. Mechanism of uptake of radioactive labels by meiobenthic copepods during grazing experiments. *Marine Ecology Progress Series*, 68: 71–83
- Cha H. J., Lee C. B., Kim B. S., Choi M. S., Ruttenger K. C. 2005. Early diagenetic redistribution and burial of phosphorus in the sediments of the south western East Sea (Japan Sea). *Marine Geology*, 216, 3: 127–143
- Chin E. R., Olson E. N., Yang Q., Humphries C., Shelton J. M., Wu H., Zhu W., Bassel-Duby R., Williams S. 1998 a. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes and Development*, 12: 2499–2509
- Chin W. C., Orellana M. V., Verdugo P. 1998 b. Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature*, 391: 568–572
- Cho B. C., Azam F. 1988. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature*, 332: 441–443
- Chrost R. J. 1992. Significance of bacterial ectoenzymes in aquatic environment. *Hydrobiologia*, 230: 1–10
- Chrost R. J., Gajewski A. J. 1995. Microbial utilization of lipids in lake water. *Microbial Ecology*, 18: 45–50
- Ciglenečki I., Čosović B., Vojvodić V., Plavšić M., Furie K., Minacci A., Baldi F. 2000. The role of reduced sulfur species in the coalescence of polysaccharides in the Adriatic Sea. *Marine Chemistry*, 71: 233–249
- Danovaro R., Armeni M., Corinaldesi C., Mei M. L. 2003. Viruses and marine pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 301–304
- Das A. K., Guardia M., Cervera M. L. 2001. Literature survey of on-line elemental speciation in aqueous solutions. *Talanta*, 55, 1: 1–28
- De Philippis R., Faraloni R., Sili C., Vincenzini M. 2005. Populations of exopolysaccharide-producing cyanobacteria and diatoms in the mucilaginous benthic aggregates of the Tyrrhenian Sea (Thucan Archipelago). *Science of the Total Environment*, 353: 360–368
- De Souza M-J. B. D., Nair S., Chandramohan D. 2000. Phosphate solubilizing bacteria around Indian peninsula. *Indian Journal of Marine Sciences*, 29: 48–51
- De Vittor C., Paoli A., Umani S. F. 2008. Dissolved organic carbon variability in a shallow coastal marine system (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 78: 280–290
- Decho A W., Moriarty D. J. W. 1990. Bacterial exopolymer utilization by a harpacticoid copepod: A methodology and result. *Limnology and Oceanography*, 35: 1039–1049
- Decho A. W. 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography Marine Biology Annual Review*, 28: 73–153
- Deflaun M. V., Paul J. H., Jeffrey W. H. 1987. Distribution and molecular weight of dissolved DNA in subtropical estuarine and oceanic environments. *Marine Ecology Progress Series*, 38: 65–73
- Degobbi D., Fonda Umani S., Franco P., Malej A., Precali R., Smolaka N. 1995. Changes in the northern Adriatic ecosystem and the hypertrophic appearance of the gelatinous aggregates. *Science of the Total Environment*, 165: 43–58
- Degobbi D., Malej A., Fonda Umani S. 1999. The mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea, a critical review of the present scientific hypothesis. *Annali dell'Istituto*

- Superiore di Sanita, 35: 373–381
- Degobbis D., Precali R., Ferrari C. R., Djakovac T., Rinaldi A., Ivancic I., Gismondi M., Smodlaka N. 2005. Changes in nutrient concentrations and ratios during mucilage events in the period 1999–2002. *Science of the Total Environment*, 353: 103–114
- Del Negro P., Crevatin E., Larato C., Ferrari C., Totti C., Pompei M., Giani M., Berto D., Umani S. F. 2005. Mucilage microcosms. *Science of the Total Environment*, 353: 258–269
- Devescovi M., Iveša L. 2007. Short term impact of planktonic mucilage aggregates on macrobenthos along the Istrian rocky coast (Northern Adriatic, Croatia). *Marine Pollution Bulletin*, 54: 887–893
- Ding Y.-X., Chin W.-C., Rodriguez A., Hung C.-C., Santschi P. H., Verdugo P. 2008. Amphiphilic exopolymers from *Sagittula stellata* induce DOM self-assembly and formation of marine microgels. *Marine Chemistry*, 112: 11–19
- Doi M., Edwards S. F. 1984. *The theory of polymer dynamics*. Oxford, Oxford University Press: 408 str.
- Dubois M., Gilles A., K., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determining of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350–356
- Faganeli J. 2008. *Osnove geomikrobiologije in mikrobne biogeokemije: Zapiski s predavanj pri predmetu geomikrobiologija*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 175 str.
- Faganeli J., Herndl G.J. 1991. Dissolved organic matter in the waters of the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *Thalassia Jugoslavica*, 23: 51–63
- Faganeli J., Kovac N., Leskovsek H., Pezdič J. 1995. Sources and fluxes of particulate organic matter in shallow coastal waters characterized by summer macroaggregate formation. *Biogeochemistry*, 29: 71–88
- Faganeli J., Mohar B., Kofol, R., Pavlica V., Marinšek T., Rozman A., Kovač N., Šurca Vuk A. 2010. Nature and lability of northern Adriatic macroaggregates. *Marine Drugs*, 8: 2480–2492
- Faganeli J., Ogrinc N., Kovač N., Kukovec K., Falnoga I., Mozetič P., Bajt O. 2009. Carbon and nitrogen isotope composition of particulate organic matter in relation to mucilage formation in northern Adriatic Sea. *Marine Chemistry*, 114: 102–109
- Fanuko N., Rode J., Drašler K. 1989. Microflora from the Adriatic mucous aggregations. *Biološki Vestnik*, 37: 27–34
- Flander Putrle V., Terzić S., Malej A., Ahel M. 2000. Effects of mucilage event on the distribution of summer phytoplankton as reflected by phytoplankton pigments. *Periodicum Biologorum*, 102: 169–177
- Flander Putrle V. 1999. *Biološke sestavine sluzi v Severnem Jadranu*, Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 96 str.
- Flander Putrle V., Malej V. 2003. Phytoplankton biomarker pigments as an indicator of the trophic state of the coastal sea. *Periodicum Biologorum*, 105: 359–365
- Flander Putrle V., Terzić S., Malej A., Ahel M. 2000. Effects of mucilage event on the distribution of summer phytoplankton as reflected by phytoplankton pigments. *Periodicum Biologorum*, 102: 169–177
- Flander Putrle V., Malej A. 2008. The evolution and phytoplankton composition of mucilaginous aggregates in the northern Adriatic Sea. *Harmful Algae*, 7: 752–761
- Fogg G. E. 1995. Some speculation on the nature of the pelagic mucilage community of the Northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 165, 1–3: 59–63

- Fonda-Umani S., Ghirardelli E., Specchi M. 1989. Gli episodi di »mare sporco« nell' Adriatico dal 1729 ai nostri giorni. Trieste, Regione autonoma Friuli – Venezia Giulia, Direzione regionale dell' ambiente. Cit. po : Turk V., Hagström Å., Kovač N., Faganelli J. 2010. Composition and function of mucilage macroaggregates in the northern Adriatic. *Aquatic Microbial Ecology*, 61: 279–289
- Fowler S. W., Knauer G. A. 1986. Role of large particles in the transport of elements and organic compounds through the oceanic water column. *Progress in Oceanography*, 16: 147–194
- Fuks D., Radić J., Radić T., Najdek M., Blažina M., Degobbi D., Smodlaka N. 2005. Relationships between heterotrophic bacteria and cyanobacteria in the northern Adriatic in relation to the mucilage phenomenon. *Science of the Total Environment*, 353: 178–18
- Funari E., Ade P. 1999. Human health implications associated with mucilage in the northern Adriatic Sea. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanita*, 35, 3: 421–435
- Giani M., Berto D., Zangrando V., Castelli S., Sist P., Urbani R. 2005. Chemical characterisation of different typologies of mucilaginous aggregates in the Northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353: 232–246
- Gordon D. C. 1970. A microscopic study of organic particles in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research*, 17: 175–185
- Grasshoff K., Ehrhard M., Kremling K. 1983. *Methods of seawater analysis*. Weinheim, Verlag Chemie: 419 str.
- Grilli F., Marini M., Degobbi D., Ferrari C. R., Fornasiero P., Russo A., Gismondi M., Djakovac T., Precali R., Simonetti R. 2005a. Circulation and horizontal fluxes in the Northern Adriatic sea in the period June 1999–July 2002. Part II: Nutrients transport. *Science of the Total Environment*, 353, 1-3: 115–125
- Grilli F., Paschini E., Precali R., Russo A., Supić N. 2005b. Circulation and horizontal fluxes in the Northern Adriatic sea in the period June 1999–July 2002. Part I: Geostrophic circulation and current measurements. *Science of the Total Environment*. 353, 1–3: 57–67
- Guo L., Santshi P. H. 1997. Composition and cycling of colloids in marine environments. *Reviews of Geophysics*, 35: 17–40
- Hama T., Yanagi K. 2001. Production and neutral aldose composition of dissolved carbohydrates excreted by natural marine phytoplankton populations. *Limnology and Oceanography*, 45: 1945–1955
- Hanrahan G. Salmassi T. M., Khachikian C. S., Foster K. L. 2005. Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: Significance, speciation and determination. *Talanta*, 66, 2: 435–444
- Hedges J. I. 1992. Global biogeochemical cycles: Progress and problems. *Marine Chemistry*, 39, 1–3: 67–93
- Herndl G. J. 1992. Marine snow in the Northern Adriatic Sea: Possible causes and consequences for a shallow ecosystem. *Marine Microbial Food Webs*, 6: 149–172
- Horiuchi T. 1959. RNA degradation and DNA and protein synthesis of *E. coli* in phosphate deficient medium. *Biochemical Journal*, 46: 1467–1480
- Innamorati M. 1995. Hyperproduction of mucilages by micro and macroalgae in the Tyrrhenian Sea. *Science of the Total Environment*, 165, 1–3: 65–81
- Ishiwatari R. R. 1992. Macromolecular materials (humic substances) in the water column and sediments. *Marine Chemistry*, 39, 1–3: 151–166

- Jansson M., Olsson H., Pettersson K. 1988. Phosphatases: Characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia*, 170: 157–175
- Karl D. M., Bailiff M. D. 1989. The measurement and distribution of dissolved nucleic acids in aquatic environments. *Limnology and Oceanography*, 34: 543–558
- Kepkay P. 1994. Particle aggregation and the biological reactivity of colloids. *Marine Ecology Progress Series*, 109: 293–304
- Kiorboe T., Hansen J. L. S. 1993. Phytoplankton aggregate formation: Observations of patterns and mechanisms of cell sticking and the significance of exopolymeric material. *Journal of Plankton Research*, 15: 993–1018
- Kobori H., Taga N. 1979. Phosphatase activity and its role in mineralization of organic phosphorus in coastal sea water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 36: 23–39
- Kolowitz L.C., Ingall E.D., Benner R. 2001. Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnology and Oceanography*, 46: 309–320
- Koroleff F. 1977. Simultaneous persulphate oxidation of phosphorus and nitrogen compounds in water. V: Report of the Baltic Intercalibration Workshop, Annex. Grasshoff K. (ed.). Kiel, Interim Commission for the Protection of the Environment of the Baltic Sea: 52–53
- Kovač N., Bajt O., Faganeli J., Sket B., Orel B. 2002. Study of macroaggregate composition using FT-IR and ¹H-NMR spectroscopy. *Marine Chemistry*, 78: 205–215
- Kovač N., Faganeli J., Bajt O. 2008. Mucous macroaggregates in the northern Adriatic. V: *Geochemistry research advances*. Stefansson O. (ed.). New York, Nova Science Publishers: 119–141
- Kovač N., Mozetič P., Trichet J. Defarge C. 2005. Phytoplankton composition and organic matter organization of mucous aggregates by means of light and cryo-scanning electron microscopy. *Marine Biology*, 147: 261–271
- Leppard G. G. 1995. The characterisation of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 165, 1–3: 103–131
- Leppard G. G. 1999. Structure/function/activity relationships in marine snow: Current understanding and suggested thrusts. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita*, 35: 389–395
- Logan B. E., Passow U., Alldredge A. L., Grossart H-P., Simont M. 1995. Rapid formation and sedimentation of large aggregates is predictable from coagulation rates (half lives) of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep-Sea Research Part II*, 42, 1: 203–214
- Malej A., Mozetič P., Malačič V., Terzić S., Ahel M. 1995. Phytoplankton response to freshwater inputs in a small semi-enclosed gulf (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Marine Ecology Progress Series*, 120: 111–121
- Malej A., Mozetič P., Malačič V., Turk V. 1997. Response of summer phytoplankton to episodic meteorological events (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Marine Ecology*, 28: 273–288
- Mari X., Burd A. 1998. Seasonal size spectra of transparent exopolymeric particles (TEP) in a coastal sea and comparison with those predicted using coagulation theory. *Marine Ecology Progress Series*, 163: 63–76
- Mari X. 1999. Carbon content and C:N ratio of transparent exopolymeric particles (TEP) produced by bubbling exudates of diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, 183: 59–71

- Mari X., Dam H. G. 2004. Production, concentration, and isolation of transparent exopolymeric particles using paramagnetic functionalized microspheres. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2: 13–24
- Mari X., Kiørboe T. 1996. Abundance, size distribution and bacterial colonization of transparent exopolymeric particles (TEP) during spring in the Kattegat. *Journal of Plankton Research*, 18, 6: 969–986
- Mari X., Rochelle-Newall E., Torretton J.P., Pringault O., Jouon A. 2007. Water residence time: A regulatory factor of the DOM to POM transfer efficiency. *Limnology and Oceanography*, 52, 2: 808–819
- Marinšek T. 2008. Frakcionacija morskih makroagregatov med mikrobno razgradnjo, Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 84 str.
- Martinez J., Smith D. C., Steward G. F., Azam F. 1996. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 10: 223–230
- Mecozzi M., Acquistucci R., DiNoto V., Pietrantonio E., Amici M., Cardarilli D. 2001. Characterization of mucilage aggregates in Adriatic and Tyrrhenian Sea: Structure similarities between mucilage samples and the insoluble fractions of marine humic substance. *Chemosphere*, 44: 709–720
- Mecozzi M., Pietrantonio E., Di Noto V., Papai Z. 2005. The humin structure of mucilage aggregates from the Adriatic and Tyrrhenian sea: Hypothesis about the reasonable cause of mucilage formation. *Marine Chemistry*, 95, 3–4: 255–269
- Mecozzi M., Pietroletti M., Conti E. M. 2008. The complex mechanisms of marine mucilage formation by spectroscopic investigation of the structural characteristics of natural and synthetic mucilage samples. *Marine Chemistry*, 112: 38–52
- Mecozzi M., Pietroletti M., Gallo V., Conti M. E. 2009. Formation of incubated marine mucilages investigated by FTIR in UV-VIS spectroscopy and supported by two-dimensional correlation analysis. *Marine Chemistry*, 116: 18–35
- Miner R. A. 1972. Characterization of naturally occurring of dissolved organophosphorous compounds. *Environment Science and Technology*, 6: 431–437
- Mingazzini M., Thake B. 1995. Summary and conclusions of the workshop on marine mucilages in the Adriatic sea and elsewhere. *Science of the Total Environment*, 165: 9–14
- Mohar B. 2006. Encimska razgradnja morskih makroagregatov, Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 81 str.
- Mopper K., Stubbins A., Ritchie J.D., Bialk H.M., Hatcher P.G. 2007. Advanced instrumental approaches for characterization of marine dissolved organic matter: Extraction techniques, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Reviews*, 107: 419–442
- Mozetič P., France J., Makovec T. 2006. Škodljiva cvetenja alg v slovenskem morju: Naravoslovne terenske tablice MBP. 1. izd. Piran, Nacionalni Inštitut za Biologijo-Morska Biološka Postaja Piran: 2 str.
- Müller W. E. G., Riemer S., Kurelec B., Smoldaka N., Puskaric S., Jagic B., Müller-Niklas G., Queric N. V. 1998. Chemosensitizers of the multixenobiotic resistance in amorphous aggregates (marine snow): Etiology of mass killing on the benthos in the Northern Adriatic? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 6: 229–238
- Murphy J., Riley J. B. 1962. A modified single solution method for determination of

- phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry*, 27: 31–36
- Myklesstad S. M. 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of the Total Environment*, 165: 155–164
- Najdek M., Degobbi D., Mioković D., Ivančič I. 2001. Fatty acid and phytoplankton compositions of different types of mucilaginous aggregates in the northern Adriatic. *Journal of Plankton Research*, 24, 5: 429–441
- Ogrinc N., Faganeli J. 2006. Phosphorus regeneration and burial in near-shore marine sediments (the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67: 579–588
- Orhanović S., Pavela-Vrančič M. 2000. Alkaline phosphatase activity in seawater: Influence of reaction conditions on the kinetic parameters of ALP. *Croatica Chemica Acta*, 73, 3: 819–830
- Orlando Bonaca M., Lipej L., Bajt O., Kovač N. 2009. Analiza prevladujočih pritiskov in vplivov v skladu z Okvirno direktivo o morski strategiji (Marine Strategy Framework Directive) v letu 2009 – 2. faza. Fazno poročilo. Piran, Nacionalni inštitut za biologijo Morska biološka postaja Piran: 146 str.
- Packard T., Chen W., Blasco D., Slavenkoff C., Vézina A. T., Tian R., St-Amand I., Roy S. O., Lovjoy C., Klein B., Therriault J. C. Legendre I., Ingram R. G. 2000. Dissolved organic carbon in the Gulf of St. Lawrence. *Deep-Sea Research Part II*, 47: 435–459
- Parsons T. R., Takahashi M., Hargrave B. 1984. *Biological oceanographic processes*. 3rd ed. Oxford, Pergamon International Library: 330 str.
- Passow U. 2000. Formation of transparent exopolymer particles, TEP, from dissolved precursor material. *Marine Ecology Progress Series*, 192: 1–11
- Passow U. 2002. Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 236: 1–12
- Passow U., Alldredge A. L. 1994. Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymeric particles (TEP) in the ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 113: 185–198
- Penna A., Berluti S., Penna N., Magnani M. 1999. Influence of nutrient ration on the in vitro extracellular polysaccharides production by marine diatoms from the Adriatic Sea. *Journal of Plankton Research*, 21: 1681–1690
- Penna N., Berluti S., Penna A., Ridolfi F. 2000. Study and monitoring of mucilage in Adriatic Sea. *Water Science and Technology*, 42: 299–304
- Penna N., Capellacci S., Ricci F., Kovac N. 2003. Characterization of carbohydrates in mucilage samples from the northern Adriatic Sea. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 4: 436–439
- Penna N., Kovač N., Ricci F., Penna A., Capellacci S., Faganeli J. 2009. The role of dissolved carbohydrates in the northern Adriatic macroaggregate formation. *Acta Chimica Slovenica*, 56, 2: 305–314
- Pettine M., Puddu A., Totti C., Zoppini A., Artegiani A., Pagnotta R. 1993. Caratterizzazione chimica e biologica di mucillagini. *Biologia Marina Mediterranea*, 1: 39–42
- Pistocchi R., Cangini M., Totti C., Urbani R., Guerrini F., Romagnoli T., Sist P., Palamidesi S., Boni L., Pompei M. 2005 a. Relevance of the dinoflagellate *Gonyaulax fragilis* in mucilage formations of the Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353: 307–316
- Pistocchi R., Trigari G, Serrazanetti G., Taddei P., Monti G., Palamidesi S., Guerrini F.,

- Bottura G., Serratore P., Fabbri M., Prini M., Ventrella V., Pagliarani A., Boni L., Borgatti A. R. 2005 b. Chemical and biochemical parameters of cultured phytoplankton and bacteria from the Adriatic Sea as possible biomarkers of mucilage production. *Science of the Total Environment*, 353, 1–3: 287–299
- Ploug H., Grossart H. P. 2000. Bacterial growth and grazing on diatom aggregates: Respiratory carbon turnover as a function of aggregates sizes and sinking velocity. *Limnology and Oceanography*, 45: 1467–475
- Pomeroy L. R. 1980. Detritus and its role as a food source. V: *Fundamentals of aquatic ecosystems*. Barnes, R. K., Mann, K. H. (eds.). Oxford, Blackwell Science Publications: 84–102
- Porrello S., Tornassetti P., Manzueto L., Finoia M. G., Persia E., Mercatali P., Stipa P. 2005. The influence of marine cages on the sediment chemistry in the Western Mediterranean Sea. *Aquaculture*, 249, 1–4: 145–158
- Posedel N., Faganeli J. 1991. Nature and sedimentation of suspended particulate matter during density stratification in shallow coastal waters (Gulf of Trieste, northern Adriatic). *Marine Ecology Progress Series*, 77: 135–145
- Pucher-Petkovic T., Marasović I. 1987. Contribution a la connaissance d'une pousse extraordinaire d'algues unicellulaires (Adriatique Septentrionale). *Centro*, 1, 1: 33–44
- Pugnetti A., Armeni M., Camatti E., Crevatin E., Dell'Anno A., Del Negro P., Milandri A., Socal G., Fonda Umani S., Danovaro R. 2005. Imbalance between phytoplankton production and bacterial carbon demand in relation to mucilage formation in the Northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*. 353, 1–3: 162–177
- Revelante N., Gilmartin M. 1991. The phytoplankton composition and population enrichment in gelatinous »macroaggregates« in northern Adriatic during the summer of 1989. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 146, 2: 217–233
- Ribeiro D. C., Martins G., Nogueira R., Cruz J. V., Brito A. G. 2008. Phosphorus fractionation in volcanic lake sediments (Azores-Portugal). *Chemosphere*, 70, 7: 1256–1263
- Rinaldi A., Vollenweider R. A., Montanari G., Ferrari C. R., Ghetti A. 1995. Mucilages in Italian seas: The Adriatic and Tyrrhenian seas during 1988–1991. *Science of the Total Environment*, 165, 1–3: 165–183
- Rivkin R. B., Anderson M. R. 1997. Inorganic nutrient limitation of oceanic bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 42, 4: 730–740
- Ruiz-Calero V., Galceran M. T. 2005. Ion chromatographic separation of phosphorus species: A review. *Talanta*, 66, 2: 376–410
- Russo A., Maccaferri S., Djakovac T., Precali R., Degobbi D., Deserti M., Paschini E., Lyons D. M. 2005. Meteorological and oceanographic conditions in the northern Adriatic Sea during the period June 1999–July 2002: Influence on the mucilage phenomenon. *Science of the Total Environment*, 353: 24–38
- Ruttenberg K.C. 2004. The global phosphorus cycling. V: *Treatise on geochemistry*. Holland H.D., Turekian K.K. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 585–643
- Santinelli C., Gasparini G. P., Nannicini L., Seritti A. 2002. Vertical distribution of dissolved organic carbon (DOC) in Western Mediterranean Sea in relation to the hydrological characteristics. *Deep-Sea Research Part I*, 49: 2203–2219
- Santschi P. H., Lenhart J. J., Honeyman B. D. 1997. Heterogeneous process affecting trace contaminant distribution in estuaries: The role of natural organic matter. *Marine Chemistry*, 58: 99–125

- Sellner, K.G., Fonda-Umani S. 1999. Dinoflagellate blooms and mucilage production. V: Ecosystems at the land-sea margin: Drainage basin to coastal sea. Malone T. C., Malej A., Harding, L. W. Jr., Smodlaka N., Turner R. E. (eds.). Washington D. C., American Geophysical Union: 173–206
- Shimeta J. 1993. Diffusional encounter of submicrometer particles and small cells by suspension feeders. *Limnology and Oceanography*, 38: 456–465
- Simon M., Grossart H. P., Schweitzer B., Ploug H. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*, 28: 175–211
- Skoog A., Alldredge A., Passow U., Dunne J., Murray J. 2008. Neutral aldoses as source indicators for marine snow. *Marine Chemistry*, 108: 195–206
- Smith D. C., Simon M., Alldredge A., Azam F. 1992. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature*, 359: 139–142
- Søndergaard M., Jensen J. P., Jeppesen E. 2003. Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes. *Hydrobiologia*, 506-509, 1–3: 135–145
- Søndergaard M., Williams P. J. L., Cauwet G., Riemann B., Robinson C., Terzic S., Woodward E. M. S., Worm J. 2000. Net accumulation and flux of dissolved organic carbon and dissolved organic nitrogen in marine plankton communities. *Limnology and Oceanography*, 45: 1097–1111
- Søndergaard M., Worm J. 2001. Measurement of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) in lake water with a bioreactor. *Water Research*, 35: 2505–2513
- Stachowitsch M., Fanuko N., Richter M. 1990. Mucus aggregates in the Adriatic Sea: an overview of stages and occurrences. *Marine Ecology*, 11, 4: 327–350
- Stordal M. C., Santschi P. H., Gill G. A. 1996. Colloidal pumping: Evidence for the coagulation process using natural colloids tagged with ^{203}Hg . *Environmental Science and Technology*, 30, 11: 3335–3340
- Strickland J. D. H., Parsons T. R. 1968. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, 167: 71–75
- Stumm W., Morgan J. J. 1996. *Aquatic Chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters*. 3rd ed. New York, John Wiley and Sons: 1022 str.
- Sutherland I. W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, 8: 143–213
- Tanaka T. 1992. Phase transitions of gels. *ACS Symposium Series*, 480: 1–21
- Thingstad T. F., Rassoulzadegan F. 1995. Nutrient limitations, microbial food webs, and biological C-pumps – suggested interactions in a P-limited Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 117: 299–306
- Thingstad T. F., Zweifel U. L., Rassoulzadegan F. 1998. P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean. *Limnology and Oceanography*, 43: 88–94
- Toriani A. 1960. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. *Biochimica Biophysica Acta*, 38: 460–479
- Totti C., Cangini M., Ferrari C., Kraus R., Pompei M., Pugnetti A., Romagnoli T., Vanucci S., Socal G. 2005. Phytoplankton size-distribution and community structure in relation to mucilage occurrence in the northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*. 353, 1–3: 204–217
- Tranvik C. J., Sherr E. B., Sherr B. F. 1993. Uptake and utilization of "colloidal DOM" by heterotrophic flagellates in seawater. *Marine Ecology Progress Series*, 92: 301–309

- Turk V., Hagström Å., Kovač N., Faganeli J. 2010. Composition and function of mucilage macroaggregates in the northern Adriatic. *Aquatic Microbial Ecology*, 61: 279–289
- Verdugo P., Alldredge A. L., Azam F., Kirchman D. L., Passow U., Santaschi P. H. 2004. The oceanic gel phase: A bridge in the DOM-POM continuum. *Marine Chemistry*, 92: 67–85
- Verdugo P., Santaschi P.H., 2010. Polymer dynamics of DOC networks and gel formation in seawater. *Deep-Sea Research Part II*, 57: 1486–1493
- Viviani R., Boni L., Cattani O., Milandri A., Pirini M., Poletti R., Pompei M. 1995. Fatty acids, chlorophylls and total silicon in mucilaginous aggregates collected in a coastal area of the Northern Adriatic Sea facing Emilia-Romagna in August 1988. *Science of the Total Environment*, 165: 193–201
- Volterra V. 1995. Comments on some health and ecotoxicological features of Adriatic mucilages. *Science of the Total Environment*, 165, 1–3: 225–228
- Waiser M. J., Robarts R. D. 1995. Microbial nutrient limitation in prairie saline lakes with high sulfate concentration. *Limnology and Oceanography*, 40: 566–574
- Wang S., Jin X., Zhou H., Zhou X., Wu F. 2006. Effect of organic matter on the sorption of dissolved organic and inorganic phosphorus in lake sediments. *Engineering Aspects*, 297, 1–3: 154–162
- Weinbauer M. G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 127–181
- Weiss M. S., Abele J., Weckesser W., Welte W., Schultz E., Schulz G. E. 1991. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science*, 254: 1627–1630
- Wells M. L., Goldberg E. 1994. The distribution of colloids in the North Atlantic and Southern Oceans. *Limnology and Oceanography*, 39, 2: 286–302
- Wetz M. S., Hales B., Wheeler P. A. 2008. Degradation of phytoplankton-derived organic matter: Implications for carbon and nitrogen biogeochemistry in coastal ecosystems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 77: 422–432
- Worsfold P. J., Gimbert L. J., Mankasingh U., Omaka O. N., Hanrahan G., Gardolinski P. C. F. C., Haygarth P. M., Turner B. L., Keith-Roach M. J., McKelvie I. D. 2005. Sampling, sample treatment and quality assurance issues for the determination of phosphorus species in natural waters and soils. *Talanta*, 66, 2: 273–293
- Worsfold P. J., Monbet P., Tappin A. D., Fitzsimons M. F., Stiles D. A., McKelvie J. D. 2008. Characterization and quantification of organic phosphorus and organic nitrogen components in aquatic systems: A review. *Analytica Chimica Acta*, 624: 37–58
- Zaccone R., Carus G., Cal C. 2002. Heterotrophic bacteria in the northern Adriatic Sea: Seasonal changes and ectoenzyme profile. *Marine Environment Research*, 54: 1–19
- Zaporozhest L. S., Zin'ko L. S., Kachan I. A. 2007. Solid phase-spectrophotometric and test determination of simultaneously present phosphorus forms (phosphorus speciation) in water. *Journal of Analytical Chemistry*, 12, 62: 1146–1150
- Zohary T., Robarts R. D. 1998. Experimental study of microbial P limitation in the eastern Mediterranean. *Limnology and Oceanography*, 43: 387–395
- Zoppini A., Puddu A., Fazi S., Rosati M., Sist P. 2005. Extracellular enzyme activity and dynamics of bacterial community in mucilaginous aggregates of the northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment* 353: 270–286
- Žutić V., Svetličić V. 2000. Interfacial processes. *Marine Chemistry*, 5: 149–164

ZAHVALA

Najlepša hvala staršem in Deanu za vso podporo in razumevanje, ki so mi ga nudili tekom mojega študija. Hkrati pa bi se iz srca zahvalila tudi prof. dr. Jadranu Faganeliju in doc. dr. Nives Kovač za ves čas, trud in nasvete, ki sta mi jih namenila.

PRILOGE

Priloga A

Priloga A1. Vrednosti P_{anorg} pri analizi njegovega sproščanja v vzorcu matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo

t(min)	$\mu\text{g } P_{\text{anorg}} / \text{g osnovnega vzorca (z encimom)}$	$\mu\text{g } P_{\text{anorg}} / \text{g osnovnega vzorca (brez encima)}$
0	63	68
5	188	55
10	59	58
15	82	55
20	69	85
30	85	71
40	88	53
50	72	50
60	64	58
95	98	55

Priloga A2. Vrednosti P_{anorg} pri analizi njegovega sproščanja v vzorcu intersticijske vode-G med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo

t(min)	$\mu\text{g } P_{\text{anorg}} / \text{g osnovnega vzorca (z encimom)}$	$\mu\text{g } P_{\text{anorg}} / \text{g osnovnega vzorca (brez encima)}$
0	1,77	0,00
5	0,00	0,00
10	0,00	0,00
15	0,00	0,00
20	0,00	0,00
30	5,31	7,92
40	0,00	7,92
50	0,00	5,28
60	0,00	0,00
95	0,00	0,00

Priloga A3. Vrednosti P_{anorg} pri analizi njegovega sproščanja v vzorcu matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo s proteinazo K

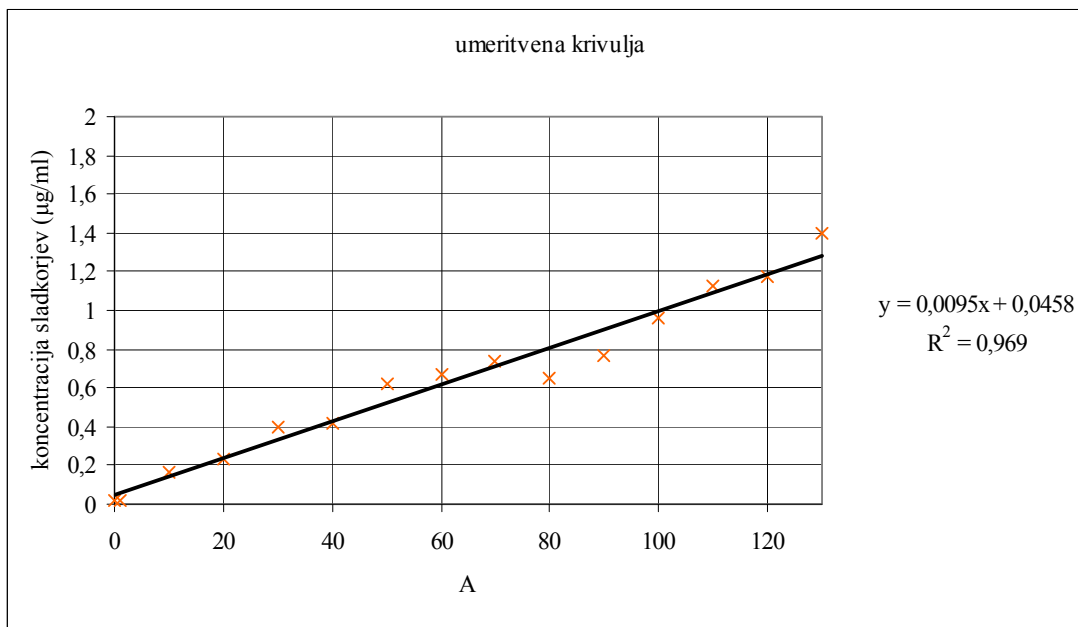
t(min)	$\mu\text{g } P_{\text{anorg}} / \text{g osnovnega vzorca (z encimom)}$	$\mu\text{g } P_{\text{anorg}} / \text{g osnovnega vzorca (brez encima)}$
0	45	48
5	39	83
10	24	114
15	32	112
20	35	48
30	136	90
40	0	146
50	77	16
60	0	0
120	40	98
180	117	35
240	61	5

Priloga A4. Vrednosti P_{anorg} pri analizi njegovega sproščanja v vzorcu matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo s pankreatinom

t(min)	$\mu\text{g } P_{\text{anorg}} / \text{g osnovnega vzorca (z encimom)}$	$\mu\text{g } P_{\text{anorg}} / \text{g osnovnega vzorca (brez encima)}$
0	61	41
5,5	188	100
10	29	44
15	21	41
20	265	65
30	260	41
40	831	140
50	109	103
60	109	142
120	88	70
180	0	26

Priloga B

Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije ogljikovih hidratov



Priloga C

Priloga C: Vrednosti koncentracij ogljikovih hidratov, sproščenih iz matriksa sluzi-G med encimsko razgradnjo z alkalno fosfatazo

t (minute)	µg ogljikovih hidratov/g osnovnega vzorca (z encimom)	µg ogljikovih hidratov/g osnovnega vzorca (brez encima)
0	22,9	23,0
5	23,0	23,0
15	23,2	23,1
60	23,1	23,1
1440	24,2	23,8
2880	24,0	24,5
4320	24,2	24,9
5760	24,7	25,0

Priloga D

Priloga D1: Vrednosti vsebnosti P_{cel} (grami P_{cel} na 100 g vzorca) v komponentah morskih makroagregatov med mikrobnou razgradnjo

Čas vzorčenja	UF1/F (%)	UF1/O (%)	UF2/F (%)	UF2/O (%)	UF3/F (%)	UF3/O (%)
Začetek inkubacije	0,142026	0,128576	0,290095	0	0	0
Prvi teden	0	0,207233	0,280563	0,408431	0,237224	0,510491
Drugi teden	0	0	4,05562	0,356481	0,34	0,24075
Tretji teden	0,522385	0,095796	1,450599	0,442222	0	1,523483
Četrty teden	0	0,143323	1,487462	0,867185	0	1,964657

Priloga D2: Vrednosti P_{cel} , C_{org} , N_{cel} (grami P_{cel} , C_{org} ali N_{cel} na 100 g vzorca) v komponentah morskih makroagregatov med mikrobnou razgradnjo

Čas vzorčenja	frakcija	% P_{cel}	Čas vzorčenja	frakcija	% P_{cel}	Čas vzorčenja	frakcija	% P_{cel}
Začetek inkubacije	UF1/F	0,00142	Prvi teden	UF1/F	0	Četrty teden	UF1/F	0
Začetek inkubacije	UF1/O	0,001286	Prvi teden	UF1/O	0,002072	Četrty teden	UF1/O	0,001433
Začetek inkubacije	UF2/F	0,002901	Prvi teden	UF2/F	0,002806	Četrty teden	UF2/F	0,014875
Začetek inkubacije	UF2/O	0	Prvi teden	UF2/O	0,004084	Četrty teden	UF2/O	0,008672
Začetek inkubacije	UF3/F	0	Prvi teden	UF3/F	0,002372	Četrty teden	UF3/F	0
Začetek inkubacije	UF3/O	0	Prvi teden	UF3/O	0,005105	Četrty teden	UF3/O	0,019647

Čas vzorčenja	frakcija	% C_{org}	Čas vzorčenja	frakcija	% C_{org}	Čas vzorčenja	frakcija	% C_{org}
Začetek inkubacije	UF1/F	0,18	Prvi teden	UF1/F	0,08	Četrty teden	UF1/F	0,03
Začetek inkubacije	UF1/O	0,15	Prvi teden	UF1/O	0,09	Četrty teden	UF1/O	0,05
Začetek inkubacije	UF2/F	1,01	Prvi teden	UF2/F	0,16	Četrty teden	UF2/F	0,06
Začetek inkubacije	UF2/O	0,15	Prvi teden	UF2/O	0,06	Četrty teden	UF2/O	0,08
Začetek inkubacije	UF3/F	0	Prvi teden	UF3/F	0	Četrty teden	UF3/F	0
Začetek inkubacije	UF3/O	0,84	Prvi teden	UF3/O	0,18	Četrty teden	UF3/O	0,12

Čas vzorčenja	frakcija	% N_{cel}	Čas vzorčenja	frakcija	% N_{cel}	Čas vzorčenja	frakcija	% N_{cel}
Začetek inkubacije	UF1/F	0,11	Prvi teden	UF1/F	0,07	Četrty teden	UF1/F	0,04
Začetek inkubacije	UF1/O	0,08	Prvi teden	UF1/O	0,09	Četrty teden	UF1/O	0,04
Začetek inkubacije	UF2/F	0,1	Prvi teden	UF2/F	0,08	Četrty teden	UF2/F	0,03
Začetek inkubacije	UF2/O	0,07	Prvi teden	UF2/O	0,08	Četrty teden	UF2/O	0,03
Začetek inkubacije	UF3/F	0	Prvi teden	UF3/F	0	Četrty teden	UF3/F	0
Začetek inkubacije	UF3/O	0,06	Prvi teden	UF3/O	0,07	Četrty teden	UF3/O	0,03