

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Romina KOFOL

**ENCIMSKA RAZGRADNJA LIPIDOV V MORSKIH
MAKROAGREGATIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Romina KOFOL

**ENCIMSKA RAZGRADNJA LIPIDOV V MORSKIH
MAKROAGREGATIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LIPIDS IN MARINE
MACROAGGREGATES**

GRADUATION THESIS
University study

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Morski biološki postaji 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 recenzentko prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Mentor: prof. dr. Jadran FAGANELI

Somentorica: doc. dr. Nives KOVAČ

Recenzentka: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

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

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Romina Kofol

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.68 + 574.5: 547.91/.96: 577.15: 543.631 (043) = 863
- KG morska mikrobiologija/ morski makroagregati/ severni Jadran/ encimi/ lipaze/
encimska razgradnja/ ogljikovi hidrati/ proteini/ lipidi/ spektrofotometrične metode/
FTIR
- AV KOFOL, Romina
- SA FAGANELI, Jadran (mentor)/KOVAČ, Nives (somentorica)/MANDIĆ MULEC,
Ines (recenzentka)
- KZ SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2007
- IN ENCIMSKA RAZGRADNJA LIPIDOV V MORSKIH MAKROAGREGATIH
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 62 str., 17 sl., 4 pril., 97 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Preučevali smo proces razgradnje morskih makroagregatov iz Tržaškega zaliva z encimom lipazo. Osredotočili smo se na strukturne spremembe posameznih komponent, ki so v naravi predmet mikrobne razgradnje. Ključne komponente matriksa makroagregatov, ki predstavljajo organsko snov so ogljikovi hidrati, proteini in lipidi. Gostota populacije mikrobov v makroagregatih je bistveno večja kot v okolni vodi, saj imajo tu mikrobi vse potrebne nutiente za rast in razvoj. Medsebojna povezava strukturnih komponent ter mehanizem nastanka in mikrobne razgradnje makroagregatov sta še vedno neznanki. Izvedli smo laboratorijski poskus z inkubacijo vzorca v pogojih, ki so bili čimbolj podobni naravnim pogojem na mestu vzorčenja. Vzorcju smo dodali določeno koncentracijo encima lipaze ter v enakih časovnih intervalih spektrofotometrično določali koncentracije lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov med eksperimentom. Sestavo in strukturne spremembe izbranega vzorca pred in po encimski razgradnji smo spremljali tudi s pomočjo infrardeče (FTIR) spektroskopije. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je razgradnja makroagregatov mikrobno vodena ter da poteka že med njihovim razvojem in sedimentacijo v razslojenem vodnem stolpcu. Ugotovili smo, da avtohtona mikrobna združba aktivno hidrolizira zamrežene dele matriksa in hitreje porablja molekule z manjšo molekulsko maso, kot npr. enostavne sladkorje, šele nato molekule z večjo molekulsko maso. Analize narejene s pomočjo FTIR spektroskopije, pred in po dodatku encima lipaze, nam pokažejo, da v zamreženi strukturi makroagregatov obstajajo predvsem povezave med lipidi, ogljikovimi hidrati in minerali, manj s proteini. Zato sklepamo, da gre v pretežni meri najbrž za glikolipide bakterijskih in fitoplanktonskih celic, ki so v veliki meri odporni na hidrolizo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 579.68 + 574.5: 547.91/.96: 577.15: 543.631 (043) = 863
- CX marine microbiology/ marine macroaggregates/ northern Adriatic Sea/ enzymes/
lipase/ enzymatic hydrolysis/ carbohydrates/ proteins/ lipids/ spectrophotometric
methods/ FTIR
- AU KOFOL, Romina
- AA FAGANELI, Jadran (supervisor)/KOVAČ, Nives (co-advisor)/MANDIĆ MULEC,
Ines (reviewer)
- PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
- PY 2007
- TI ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LIPIDS IN MARINE MACROAGGREGATES
- DT Graduation thesis (University study)
- NO X, 62 str., 17 sl., 4 pril., 97 vir.
- LA sl
- AL sl/en
- AB We studied the enzymatic hydrolysis of macroaggregates from the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea) using lipase with special reference to structural transformations due to microbial activity. The key organic components of macroaggregates are carbohydrates, proteins and lipids. The density of microbial population within macroaggregates is several times higher compared to marine waters due to high nutrient content. However, macroaggregates are quite stable marine organic matter. The linkage of structural components, mechanism of formation and microbial degradation of macroaggregates are still rather unknown. We performed a laboratory experiment incubating macroaggregate samples at in situ conditions. The enzyme was added to samples and the concentrations of lipids, carbohydrates and proteins were measured colorimetrically at different time intervals. The composition and structural transformations before and after enzymatic hydrolysis were followed using infrared (FTIR) spectroscopy. The results show that the natural degradation is microbially driven and proceeds during the macroaggregate maturation and sedimentation in stratified water column. We found that the autochthonous microbial community actively hydrolyses the crosslinked macroaggregate components consuming lower molecular weight compounds, i.e. oligo- and monosaccharides, and later those with higher molecular weight. FTIR analyses of macroaggregates before and after the lipase attack showed that in the crosslinked structure the links mainly between lipids, carbohydrates and minerals exist and less with proteins. Therefore, we propose that the glycolipids from bacterial and phytoplankton cells are the most important components resistant towards enzymatic hydrolysis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 POJAV SLUZENJA V RAZLIČNIH MORJIH.....	4
2.1.1 Pojav sluzenja v Jadranu (nastanek in razgradnja)	5
2.2 HIPOTEZE O NASTANKU SLUZI.....	7
2.2.1 Spremenjen vnos nutrientov in neravnovesje N/P razmerja	7
2.2.2 Presežek nepopašene primarne produkcije	8
2.2.3 Večja stopnja virusnih infekcij in posledično izločanje DOM	8
2.2.4 Akumulacija DOC in mikrobna zanka	8
2.2.5 Pogoji v okolju (geografski, meteorološki in hidrološki dejavniki)	10
2.2.6 Sladkovodni in drugi vnosi	10
2.3 KEMIJSKA SESTAVA MORSKIH MAKROAGREGATOV	11
2.4 BIOLOŠKA SESTAVA MORSKIH MAKROAGREGATOV	13
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 ORIS PODROČJA RAZISKAVE.....	16
3.2 VZOREC	18
3.2.1 Vzorčenje	18
3.2.2 Priprava vzorca	19
3.3 EKSPERIMENT IN METODE.....	21
3.3.1 Potek eksperimenta	21
3.3.2 Določanje lipidov v makroagregatih	25
3.3.3 Določanje ogljikovih hidratov v makroagregatih	25
3.3.4 Določanje proteinov v makroagregatih	26
3.3.5 Analiza vzorcev s FT-IR spektroskopijo	26
3.3.6 Ostanek po sežigu	27
4 REZULTATI.....	29
4.1 OPIS NEOBDELANEGA VZORCA	29

4.2	SPREMEMBE KONCENTRACIJ LIPIDOV MED ENCIMSKO RAZGRADNJO Z LIPAZO	30
4.3	SPREMEMBE KONCENTRACIJ OGLJIKOVIH HIDRATOV MED ENCIMSKO RAZGRADNJO Z LIPAZO	33
4.4	SPREMEMBE KONCENTRACIJ PROTEINOV MED ENCIMSKO RAZGRADNJO Z LIPAZO	34
4.4	SPEKTROSKOPSKE FTIR ANALIZE.....	37
4.4.1	Spektri FTIR vzorca pred encimsko razgradnjo	37
4.4.1.1	Spektri FTIR sedimenta	37
4.4.1.2	Spektri FTIR vodotopne frakcije	39
4.4.2	Spektri FTIR vzorca po encimski razgradnji	40
4.4.2.1	Spektri FTIR sedimenta	40
4.4.2.2	Spektri FTIR vodotopne frakcije	41
5	RAZPRAVA.....	43
5.1	RAZGRADNJA LIPIDOV, OGLJIKOVIH HIDRATOV IN PROTEINOV V MORSKIH MAKROAGREGATIH Z LIPAZO	43
6	SKLEPI	48
7	POVZETEK.....	49
8	VIRI	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Mikrobna zanka (Herndl in Weinbauer, 2003)	10
Slika 2: Velikosti ključnih suspendiranih in raztopljenih organskih konstituent v morskem okolju (Simon in sod., 2002)	15
Slika 3: Geografska lega Tržaškega zaliva v Jadranskem morju (foto: arhiv MBP)	18
Slika 4: Lokacija mesta vzorčenja v Tržaškem zalivu	19
Slika 5: Shema priprave vzorca	20
Slika 6: Katalitična aktivnost lipaze	22
Slika 7: Shema poteka eksperimenta	24
Slika 8: Mikroskopski posnetek gostega in želatinoznega makroagregata; 200-kratna povečava (foto: Mozetič P.).....	29
Slika 9: Spreminjanje koncentracije lipidov v odvisnosti od časa v supernatantu in sedimentu vzorca obdelanega z encimom lipazo ter v kontrolnih vzorcih supernatanta in sedimenta.....	30
Slika 10: Odstotek znižanja koncentracije lipidov v sedimentu vzorca obdelanega z encimom lipazo in sočasni dvig odstotka koncentracije lipidov v supernatantu vzorca obdelanega z encimom lipazo v časovnem obdobju treh tednov	31
Slika 11: Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa v supernatantu kontrolnega vzorca in vzorca obdelanega z encimom lipazo.....	33
Slika 12: Spreminjanje koncentracije proteinov v odvisnosti od časa delovanja encima lipaze v supernatantu vzorca.....	35
Slika 13: Spremembe koncentracij proteinov, ogljikovih hidratov in lipidov v supernatantu vzorca v eksperimentalnem časovnem obdobju treh tednov; prikaz odstotkov povišanja oziroma padca koncentracij lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov po encimskem delovanju glede na začetno vrednost le-teh.....	36
Slika 14: FT-IR spektri usedlin neobdelanega (kontrolnega) vzorca, analiziranih takoj po pričetku eksperimenta, po pripravi vzorčnih raztopin iz vode in posušenega vzorca sluzi (kontrola ₁), dveh tednih (kontrola ₂) in treh tednih (kontrola ₃) trajanja eksperimenta.....	37

Slika 15: FT-IR spektri supernatantov neobdelanega vzorca, analiziranih takoj po pričetku eksperimenta (kontrola ₁), dveh tednih (kontrola ₂) in treh tednih (kontrola ₃) trajanja eksperimenta.....	39
Slika 16: Spektri FTIR za sediment obdelanega vzorca z encimom za čas t ₁ in t ₇	40
Slika 17: Spektri FTIR za supernatant kontrolnega vzorca kontrola ₁ (takoj po mešanju sluzi in vode) ter obdelanega z encimom za čas t ₁ in t ₇	41

KAZALO PRILOG

- Priloga A 1: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije lipidov
- Priloga A 2: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije ogljikovih hidratov
- Priloga A 3: Umeritvena krivulja za določanje koncentracij proteinov
- Priloga B: Tabela glavnih signalov/absorpcijskih trakov določenih v FT-IR spektrih makroagregatov severnega Jadrana (Kovač in sod., 1998; Kovač in sod 2002; Kovač in sod 2004; Kovač in sod 2006)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DOM	-	raztopljena organska snov
DOC	-	raztopljeni organski ogljik
DON	-	raztopljeni organski dušik
DOP	-	raztopljeni organski fosfor
FTIR	-	infrardeča spektroskopija (ang. Fourier transform infrared spectroscopy)
N/P razmerje	-	razmerje med dušikom in fosforjem
Corg/N	-	razmerje med organskim ogljikom in dušikom
NMR	-	jedrska magnetna rezonanca
psu	-	praktična enota slanosti (ang. practical salinity unit)
konc.	-	koncentracija
ogljik. hidrati	-	ogljikovi hidrati
MBP	-	Morska biološka postaja v Piranu
EC 3.1.1.3	-	sprejeto ime za triacilglicerol lipaze
dest. voda	-	destilirana voda
LOI	-	Loss on ignition metoda (ostanek po sežigu)
v.f.	-	vodotopna frakcija

1 UVOD

Opise sluzastih mas, ki so preplavile obalne vode, najdemo v kronikah severno jadranskih mest že v 18. in 19. stoletju. Pojav sluzenja morja je bil opažen tudi ob obalah Grčije, Dalmacije, Tirenskega morja in Sicilije. Sluzenje je bilo v zadnjih dvajsetih letih najbolj intenzivno v poletjih 1988, 1989, 1991 in 1997. V letu 1989 je sluz prekrila 9000 km² površine morja, vključno z obalnim območjem. Ponovilo se je v poletjih let 1997, 2000 in v nekoliko manjšem obsegu tudi v letih 2001, 2002 in 2004. Nekateri opisujejo problem kot lokalni, drugi omenjajo široko razširjenost sluzastih makroagregatov v celotnem severnem Jadranu. V letih od 1927 do 2000 je bilo lokalno pojavljanje sluzastih makroagregatov zabeleženo 15-krat in sluzenje morja večje razširjenosti 11-krat (projects.mbss.org/monitoring/Bio-Parametri.html, 2003). Pojav sluzenja morja je v območju severnega Jadrana praviloma omejeno na pozno pomladansko in poletno obdobje. Leta 1997 je pojav trajal dlje (od začetka junija do začetka septembra) kot leta 2000 (od začetka junija do sredine julija).

Različni mikroorganizmi prispevajo k organski vsebini sluzastih agregatov, ki se oblikujejo pozno pomladi-poleti v severnem Jadranu: diatomeje, dinoflagelati, cijanobakterije in bakterije. Težko je označiti pomen posameznega organizma, agregati oblikujejo mikrohabitat v katerem bogatenje z raztopljeno organsko snovjo (dissolved organic matter-DOM) in nutrienti pospešuje rast fitoplanktona in bakterij. Zaradi lepljive narave osnovnega organskega matriksa, se nanje ujamejo različni delci in organizmi iz okolne morske vode. Le- ti lahko nadalje prispevajo k tvorbi večjih makroagregatov.

Sluzasti makroagregati so različnih barv (mlečno beli, rožnati, rumeni, zeleno-rjavi, rjavi) in oblik (drobni sluzasti kosmiči, nitke, zavese, mrežasti spleti, kometi, oblaki, površinske odeje). Njihov izgled in prostorska razporeditev je odvisna od hidrometeoroloških značilnosti vodnega stolpca, biološke in kemijske sestave makroagregatov (povezane z »razvojno« stopnjo agregatov) ter drugih pogojev okolja. Zaradi različnih presnovnih procesov v sluzi (npr. nastanek plinastih produktov) ter segrevanja morske vode (preko dneva), se gostota sluzastih mas čez dan spreminja. To opažamo kot določeno vertikalno

gibanje sluzastih makroagregatov v vodnem stolpcu. Poletni maestral in plimovanje površinske mase sluzi potiska proti obali, kjer se lahko zgostijo v debelejše mase. Pomembno vlogo pri celotnem procesu ima tudi tokovanje. Kopičenje sluzi povezujemo tudi z zmanjšano izmenjavo severno jadranskih vod s srednjim Jadranom v poletnem času, kar omogoča ohranjanje in kopičenje sluzastih mas v severnem Jadranu.

Pojav sluzenja v severnem Jadranu ima pomemben negativen vpliv na turizem, ribolov in povzroča ekološko škodo. V začetnem obdobju, ko je sluz omejena na vodni stolpec, so posledice pojava odvisne predvsem od njegove prostorske razširjenosti. Prizadene predvsem lebdeče organizme, ki so slabo gibljivi (zooplankton) in se sluzastim mrežam in oblakom ne morejo izogniti. Zlasti hude so lahko posledice za nekatere vrste rib, ki se razmnožujejo v toplem delu leta, saj v sluzastih masah jajčeca in mladi stadiji rib zelo težko preživijo. Ko se sluz posede na dno mehansko prekrije organizme, ki živijo na ali v dnu in onemogoči normalne fiziološke procese. Oteženo je predvsem njihovo dihanje in premikanje. Močno so prizadeti predvsem filtratorski organizmi (spužve in plaščarji), pa tudi nekateri drugi npr. ožigalkarji. Pod sedimentirano sluzjo pogosto pride do popolnega pomanjkanja kisika, kar dodatno ogroža pridnene živali, ki se iz vplivnega območja sluzi ne morejo umakniti.

Kljub temu, da raziskave na tem področju potekajo že vrsto let, fenomen in vzrok sluzenja morja še ni v celoti razjasnjen. Večina znanstvenikov se strinja, da gre za kompleksen pojav, katerega razvoj vključuje sovpadanje različnih dejavnikov in pogojev okolja. Prav zato je le delno znana narava tega pojava in njegove posledice na okolje. Prevladuje mnenje, da so sluzasti makroagregati v osnovi naravni pojav (ki ni direktno povezan z onesnaževanjem), njihov nastanek pa je povezan s fiziologijo fitoplanktona oziroma z njihovo hiperprodukcijo fotosintetskih (polisaharidnih) ekstracelularnih izločkov. Raziskave na tem področju kažejo na povečano izločanje polisaharidnih izločkov v stresnih razmerah kot je npr. pomanjkanje fosforja ali dušika. Izločanje celičnih površinskih polisaharidov prispeva k oblikovanju želatinoznih struktur. Tako alge, kot tudi bakterije v severnem Jadranu izločajo površinsko sluz.

Rezultati različnih kemijskih in spektroskopskih analiz potrjujejo zapleteno in zamreženo strukturo sluzastih makroagregatov, sestavljeno predvsem iz organosilicijevih spojin, dolgih alkilnih verig, ki so vezane preko amidnih in esterskih vezi na osnovno heteropolisaharidno strukturo (iz organosilicijevih spojin, lipidne, sladkorne in mineralne komponente). Vsebnost aromatskih spojin in proteinov je majhna. Poleg organske frakcije je v makroagregatih prisotna še mineralna frakcija, ki ima pomembno vlogo v razvoju pojava in pri stabilnosti makrogelne strukture.

1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Cilj diplomske naloge je bil s pomočjo spektroskopskih analiz spremljati proces encimske razgradnje z lipazo morskih sluzastih makroagregatov. Poudarek je bil na strukturnih spremembah posameznih komponent, ki so v naravi predmet mikrobne razgradnje. Ogljikovi hidrati, proteini in lipidi so pomembne sestavine makroagregatov. Rezultati predhodnih študij kažejo, da ogljikovi hidrati prevladujejo v bolj svežih vzorcih, lipidna komponenta pa se skozi naravno razgradnjo (med sluzenjem morja) kopiči oziroma ohranja. Vzrok je v mikrobni razgradnji »sveže« frakcije, kjer se lažje razgradljive komponente, ogljikovi hidrati in proteini hitreje razgrajujejo. Lipidna frakcija je sodeč po dosedanjih raziskavah mikrobno najbolj odporna in vprašanje je, v kakšni obliki se poseda na morsko dno.

Ker medsebojna povezava osnovnih strukturnih komponent in mehanizem postopne mikrobne razgradnje sluzastih makroagregatov nista popolnoma pojasnjena je bil cilj diplomskega dela prispevati k poznavanju te problematike s pomočjo rezultatov postopne encimske razgradnje lipidne komponente. Pri tem se sproščajo še druge komponente (proteini, ogljikovi hidrati...) osnovnega matriksa, kar nakazuje na medsebojno povezanost posameznih sestavin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POJAV SLUZENJA V RAZLIČNIH MORJIH

Pojavi podobni želatinoznim makroskopskim agregatom so bili opazovani v Severnem morju, na različnih delih Sredozemlja in v Rokavskem prelivu.

V **Severnem morju** vsako pomlad, zlasti v dneh močnih vetrov se vzdolž obal pojavi rjavkasta in lepljiva pena, ki je produkt cvetenja alge *Phaeocystis sp.*. Ta pojav, zlasti ekologijo alge, opisuje Lancelot (1995). Matriks sluzi, ki poveže celice v kolonije in povzroča peno, je viden ob obalah. Sestavljen je iz kondenziranih verig karbonatnih in sulfonatnih polisaharidov, ki jih povezujejo kalcijevi in magnezijevi mostički. Produkcija sluzastega matriksa je pomembna, tako za energijske rezerve, kot za nabiranje in koncentriranje nutrientov prisotnih v zelo majhnih količinah in elementov v sledovih (mangan). Cvetenje je povezano s pomankanjem nitrata, ki ga alga *Phaeocystis* lahko uporablja kot vir dušika (Lancelot, 1995; Manganelli in Funari, 2003). Različne koncentracije monomerov, ki sestavljajo polisaharide, kažejo na različne razgradne značilnosti nastale sluzi (van Rijssel in sod., 2000). Razgradnja naj bi bila visoka in je povezana z razpoložljivimi nutrienti, prisotnostjo inhibitornih snovi in sestavo bakterijske združbe (Janse in sod., 1999; Manganelli in Funari, 2003).

V **Rokavskem prelivu** je opaženi pojav sluzenja posledica cvetenja neavtohtone diatomeje (*Coscinodiscus wailesii*), ki je tu našla ugodne pogoje za rast. Celice izločajo sluzasto snov, ki med tonjenjem na morsko dno nabira iz okolne vode različne delce planktonskih organizmov in mineralnih delcev, s čimer se povečuje lastna teža in volumen sluzi. Pokritje morskega dna s to sivkasto sluzjo povzroča škodo ribičem, saj poškoduje in raztrga mreže, ki jih ribiči vlečejo po morskem dnu (Manganelli in Funari, 2003). V letu 1987 je bila ta vrsta diatomej prisotna v angleških vodah, kjer je predstavljala večinsko vrsto v zimski združbi fitoplanktona (Manganelli in Funari, 2003).

Tudi na različnih predelih **Tirenskega morja** so opazili prisotnost sluzastih agregatov. Opisana sta bila dva tipa sluzi, z značilno mikrobno združbo in porazdelitvijo. Prvi, bentoški tip, je karakteriziran s prisotnostjo filamentoznih kolonijskih alg (*Tribonema marinum* in *Acinetospora crinita*), ki niso nikoli bile opažene v Jadranu. Drugi, pelagični tip, predstavlja bolj revno mikrobno združbo, ki vsebuje le diatomeje vrste *Nitschia* sp. (Innamorati, 1995; Manganelli in Funari, 2003). Različni elementi kažejo, da je sluz produkt v agregatu prisotnih organizmov. Biocenoza znotraj sluzastih skupkov se razlikuje od tiste v okolni vodi. V sluzastih skupkih, kjer je biocenoza zimsko-pomladnega tipa, se le-ta ne spreminja z letnimi časi, medtem ko je v vodnem stolpcu opazna sukcesija vrst, ki je odvisna od letnih časov. Sluzaste agregacije predstavljajo poseben mikrohabitat, v katerem lahko celice povečajo volumen sluzi za tri velikostne razrede v primerjavi z okolono vodo. Z avtoradiografijo je bilo opaženo, da vrste znotraj matriksa agregacij producirajo sluz, ki jih obdaja. S pojavom sluzenja je bilo opaženo nekoliko višje razmerje N/P, ki kaže na nekoliko nižjo koncentracijo fosforja. Zato nekatere vrste fitoplanktona povečajo produkcijo eksudatov (Myklestad, 1977; Myklestad in sod., 1989 cit. po Manganelli in Funari, 2003), kar pa ni zadosten pogoj za nastanek sluzi (Innamorati, 1995; Manganelli Funari, 2003).

Ob **obalah Grčije** so tudi bili opaženi pojavi umazanega morja (« mare sporco»), vendar znani podatki nam ne omogočajo, da bi lahko izpeljali kakršnekoli zaključke in primerjave o pojavu sluzi v tem delu Sredozemlja (Gotsis-Skretas, 1995; Manganelli in sod., 2003).

2. 1. 1 Pojav sluzenja v Jadranu (nastanek in razgradnja)

Večje mase sluzi so bile prisotne v severnem Jadranu v letih 1988, 1989, 1991, 1992, 1997, 1998, 2000, 2001 in 2004. V letih 1992, 1998 in 2001 pojav sluzenja ni bil opažen v slovenskem obalnem morju.

Severni Jadran je s treh strani obdan s kopnim in je zelo plitek, kar nakazuje, da sta tako geografski položaj, kot tudi hidrogrfski pogoji, ugodni za nastanek makroagregatov (Manganelli in sod., 2003). Prevladujoči morski tok se premika ob slovenski obali v smeri

proti Trstu, kjer se obrača in zavija ob italijanski obali proti jugu. Zaradi majhnih globin je smer in hitrost morskih tokov odvisna tudi od vremena, še posebej od vetra. Na dinamiko vodnih mas priobalnega pasu vplivajo tudi sladkovodni pritoki z nutrienti bogate sladke vode. Ta vnos je velik pozno pomladi in poleti. Tedaj se oblikujejo posebne razmere, ki ločijo severni Jadran od ostalega Jadrana in ni prej omenjene cirkulacije. Zato se ob povečanem dotoku hranil, določeni temperaturi morja in ustreznih hidrografskih dejavnikih prekomerno namnožijo zlasti kremenaste alge diatomeje, v manjši meri tudi enocelične dinoflagelatne alge (Turk, 2003). Po mnenju nekaterih avtorjev je prekomerna namnožitev fitoplanktonskih celic in povečano izločanje zunanjih izločkov glavni prekurzor nastanka makroagregatov. Fitoplanktonske celice izločajo na svoji površini večje količine lepljivih, sluzastih eksopolimerov. V morju se pojavi velika količina raztopljenih molekul, ki nadalje tvorijo koloide, ki so predpogoj za nastanek makroagregatov.

Makroagregati se pojavljajo v različnih oblikah: manjši in večji kosmiči, nitke, trakovi, sluzaste površinske oddeje, prevleke s heterogeno razporeditvijo in akumulacijo znotraj stratificiranega vodnega stolpca (Kovač in sod., 2004). Ključno vlogo, poleg eksopolimerov fitoplanktonskih celic, naj bi imele tudi bakterije, ki izločajo svoje mukopolisaharide in s tem kontrolirajo nadaljni razvoj in strukturo makroagregatov (Azam in sod., 1999). Najpogosteje se formirajo na stičnih površinah kot so: fazna meja morska površina-zrak, stične površine vodnih mas (npr. piknoklina) in fazna meja sediment-morska voda (Mohar, 2006). Sluzasti makroagregati so izjemno obstojni v vodnem stolpcu. Za njihovo razgradnjo so najpomembnejši mikrobni procesi. Kljub temu pa k njihovi razgradnji prispevajo še fotokemične reakcije, ki so predvsem pomembne v plitvem obalnem morju, kjer je svetlobe dovolj. Mikrobna presnova makroagregatov poteka zlasti med njihovim posedanjem v vodnem stolpcu in potem, ko potonejo na morsko dno. Hitrost teh pretvorb je zopet odvisna od hidrografskih in ekoloških dejavnikov (Turk, 2003).

2. 2 HIPOTEZE O NASTANKU SLUZI

Kljub intenzivnim raziskavam pojava sluzenja morja, ki so se začele po letu 1988 (ko so bili sluzasti makroagregati spet prisotni v severnem Jadranu v zelo velikem obsegu), vsi mehanizmi in sam razvoj sluzenja morja še niso povsem poznani. Čeprav je malo znanega o mehanizmu nastanka makroagregatov v severnem Jadranu, obstajajo številne hipoteze, ki poudarjajo pomen določenih abiotskih in biotskih dejavnikov.

2. 2. 1 Spremenjen vnos nutrientov in neravnovesje N/P razmerja

Jadransko morje je zadnjih nekaj desetletij izpostavljeno eutrofikaciji. K povečanemu vnosu fosforja in dušika v morje prispeva agrikultura, industrija, odpadne vode (Justic, 1987; Graneli in sod., 1999), sezonska nihanja rečnih vnosov in obilne padavine. Posledično pride do sprememb v koncentraciji fitoplanktonskih celic in primarne produkcije (Ryther in Dunstan, 1971; Howarth, 1988; Graneli in sod., 1990; Oviatt in sod., 1995; Graneli in sod., 1999). Za večino obalnih morij velja, da je dušik limitni nutrient fitoplanktonske produkcije, vendar za severni Jadran velja, da je limitni faktor fitoplanktonske primarne produkcije fosfor. N/P razmerje je v večini glavnih morskih bazenov ustaljeno na vrednosti 14,7. To razmerje je posledica bioloških procesov in ne obratno. 80% anorganskega N/P razmerja izvira iz površinskih vod, zaradi česar se predpostavlja, da je fosfor limitni element fitoplanktonske rasti. Biotesti so potrdili porast fitoplanktonske rasti po dodatku fosforja (Graneli in sod., 1999). Za severni Jadran je značilno višje N/P razmerje, glede na Redfieldovo razmerje, kjer je $N/P = 16$. Degobbis in sod. (2005) menijo, da znatna redukcija vnosa fosforja v reko Pad sovpada s ponovnim pojavljanjem sluzenja v severnem Jadranu, vendar menijo tudi, da poleg koncentracij hranil in njihovih razmerij, npr. N/P, le-ti sami ne izzovejo sluzenja, ampak imajo pomebno vlogo v kombinaciji z drugimi fizikalnimi in biološkimi dejavniki pri razvoju sluzenja.

2. 2. 2 Presežek nepopašene primarne produkcije

Paša igra pomembno vlogo pri širjenju pojava makroagregatov. Opazovanja kažejo, da je začetna pomladna zaloga kopepodov lahko prenizka za nadziranje hitro rastočih diatomej. Le-te hitro rastejo zaradi sladkovodnih vnosov hranil in izjemno ugodnih okoljskih razmer (mirno morje, zmanjšana sladkovodna redčitev). Pritisk paše je lahko zmanjšan zaradi svarilnega učinka produkcije izločkov v prehodni mirujoči fazi fitoplanktonske rasti. Sluz ima negativen vpliv na mlajšo kopepodno populacijo, medtem ko je starejša kopepodna populacija v severnem Jadranu nesposobna hranjenja s fitoplanktonom morskega snega. Analize zooplanktonskih maščobnih kislin kažejo, da so med pojavom makroagregatov živali drastično stradale in porabljale lastne rezervne maščobe (Degobbis in sod., 1999).

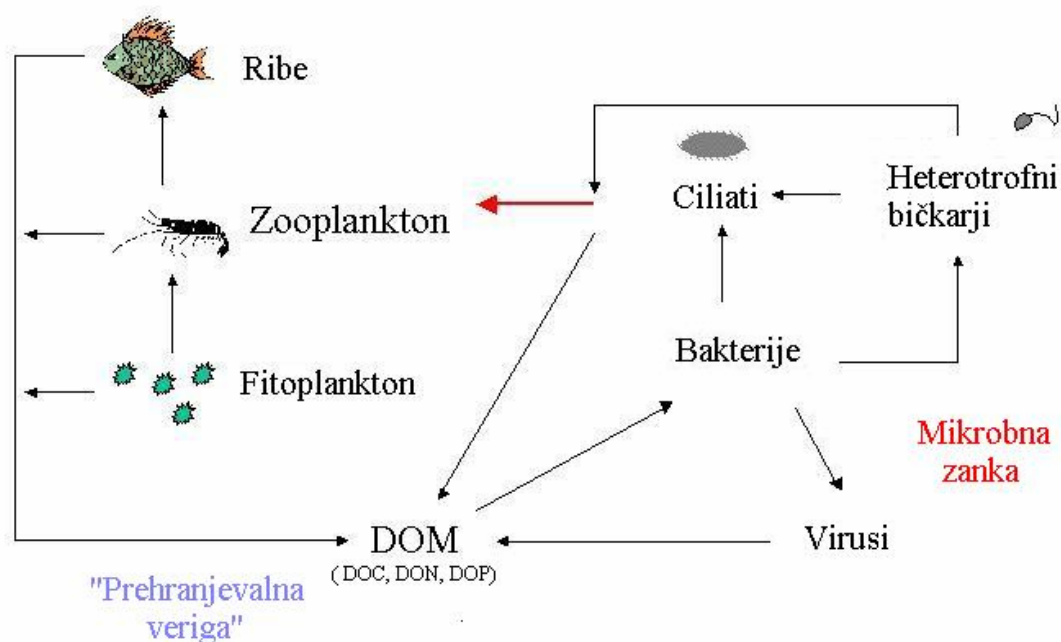
2. 2. 3 Večja stopnja virusnih infekcij in posledično izločanje DOM

Virusne infekcije in liza fitoplanktonskih celic lahko tudi prispevajo k kopičenju polisaharidov. Posamezne komponente v makroagregatih nakazujejo lizo fitoplanktonskih celic in prisotnost virusov. Pri prenosu virusov so pomembne bakterije (ki naseljujejo tudi agregate) (Simon in sod., 2002). Virusne infekcije bakterij so lahko povezane tudi s spremembami okolja (meteorološke in oceanografske spremembe) (Degobbis in sod., 1999).

2. 2. 4 Akumulacija DOC in mikrobna zanka

Raztopljen organski snov (DOM) je v morju produkt večinoma morske primarne produkcije (Williams in Gordon, 1970; Mague in sod., 1980; Carlson in Ducklow, 1995; Aluwihare in Repeta, 1999). K rezervoarju DOM prispevajo: direktno izločanje fitoplanktona, heterotrofov, indirektna produkcija preko izgub pri prehranjevanju (»sloopy feeding«), razkroj in raztapljanje fekalnih peletov, morskega snega in ostalih morskih agregatov ter liza celic (Aluwihare in Repeta, 1999). Raztopljeni organski ogljik (DOC), ki je del DOM, vstopa v prehranjevalno verigo s pomočjo bakterij. DOC nastaja zaradi

razbitja in raztapljanja organskih delcev. Fitoplanktonski izločki predstavljajo glavni vir ogljika za bakterije v morskih sistemih. Mikrobno zanko oblikujejo fitoplanktonske celice, bakterije, hetero- in miksotrofni protisti in virusi (Herndl in Weinbauer, 2003) (Slika 1). Protisti in virusi nadzorujejo število bakterijskih in fitoplanktonskih celic (Fuhrman, 1999; Herndl in Weinbauer, 2003). Količina bakterioplanktona je povezana z fitoplanktonsko biomaso. Fitoplankton lahko uporabi anorganske nutrienete z remineralizacijo organskega materiala, v mikrobni prehranjevalni verigi. Heterotrofni bakterioplankton lahko tekmuje z fitoplanktonom za anorganski vir nutrientov (Kirchman in Wheeler, 1998; Herndl in Weinbauer, 2003), kar nakazuje direktno povezavo med fito- in bakterioplanktonom (Herndl in Weinbauer, 2003). Produktivnost sistema je odvisna od raznolikosti tako producentov, kot porabnikov (tj. bakterij) (Naeem in sod., 2000; Herndl in Weinbauer, 2003). Sistem, ki vsebuje eno vrsto alg in več bakterijskih vrst kaže nižjo produktivnost s strani alg in bakterij. Bakterije predstavljajo največji del celotne biomase v tem sistemu. Sistem z visoko fitoplanktonsko diverzitetijo teži k večji produkciji. Biomasa alg je visoka, biomas bakterij je nižja, bakterijska diverzitetija je manj pomembna. Bakterije v sistemu z višjo produktivnostjo lahko uporabljajo različne vire ogljika, kot tiste bakterije iz sistemov z nižjo produktivnostjo. Sposobnost bakterij, da uporabljajo različne vire ogljika, ni odvisna samo od števila prisotnih bakterijskih vrst, ampak tudi od naraščajoče pestrosti alg (Herndl in Weinbauer, 2003).



Slika 1: Mikrobna zanka (Herndl in Weinbauer, 2003)

2. 2. 5 Pogoji v okolju (geografski, meteorološki in hidrološki dejavniki)

Zaradi lege, plitvosti in majhnega volumna morja so tu meteorološke značilnosti zelo pomembne. Posamezni dejavniki, kot so smer in hitrost vetra, časovna porazdelitev padavin, temperaturne razmere atmosfere, lahko neposredno vplivajo na hidrografske razmere in s tem na organske procese v morju (Degobbis in sod., 1999).

2. 2. 6 Sladkovodni in drugi vnosi (Danovaro in sod., 2005)

V severnem Jadranu je sladkovodni vnos povezan predvsem z velikimi severnoitalijanskimi rekami (Pad, Adiža, Piave), največji dotok sladke vode v Tržaški zaliv predstavlja reka Soča. Manjšo količino sladke vode doprinesejo v Tržaški zaliv še reke Timav, Rižana in Dragonja. Sezonskemu nihanju rečnih vnosov in obilnejšim padavinam sledi tudi koncentracija hranilnih snovi. Ponavljajoči in nenadni vnosi hranilnih snovi v Tržaški zaliv neposredno vplivajo na skokovito naraščanje in upadanje fitoplanktonske biomase in primarne produkcije (Kovač, 1999).

Te hipoteze se medsebojno ne izključujejo, lahko se celo dopolnjujejo.

2.3 KEMIJSKA SESTAVA MORSKIH MAKROAGREGATOV

Rezultati gravimetričnih analiz makroagregatov kažejo, da vsebujejo velik delež vode (več kot 95%), kar je povezano s samo gelsko naravo makroagregatov. Gelska narava makroagregatov je pogojena tudi z izredno visoko povprečno molekulsko maso, kar dodatno prispeva k netopnosti makroagregatov v vodi. Delež suhe snovi v makroagregatih sega od 0,44 do 5,11 %, delež organske snovi od 18% do 57%. Vsebnost organskega ogljika znaša od 5,6 do 34,7 %, celotnega dušika znaša od 0,4 do 3,4% in vodika znaša od 1,5 do 6,1%. Za makroagregate je značilno relativno visoko atomsko razmerje organskega ogljika in celotnega dušika (Corg/N), tj. od 11,2 do 28,7, kar je odraz kemične sestave makroagregatov, tj. visoke vsebnosti ogljikovih hidratov in razgradnje dušika vezanega v agregatih.

Podrobnejše kemijske analize kažejo, da so sestavljeni pretežno iz heteropolisaharidov, ki so v vodi slabo topni in odporni na kislinsko hidrolizo. Vodotopni ogljikovi hidrati predstavljajo 12 do 34 % celotne suhe snovi. Analiza nevtralnih monosaharidov kaže prevladujočo vsebnost glukoze (60%), deleži ostalih monosaharidov si sledijo v sledečem padajočem zaporedju: manoza, fruktoza, galaktoza, arabinoz, riboza, ksiloza in fukoza. Marchetti in sodelavci (1989) navajajo večjo vsebnost galaktoze (49--58%) v makroagregatih, kar je verjetno posledica drugačne analize in narave vzorcev. Ti podatki nakazujejo, da gre večinoma za monosaharide, ki sestavljajo strukturne polisaharide fitoplanktonskih celičnih sten. Nekateri avtorji menijo, da je ta monosaharidna sestava značilna tudi za sluz fitoplanktona. Visoka vrednost razmerja C/N lahko odraža tudi večjo vsebnost suspendiranega materiala oziroma visoko razvojno stopnjo makroagregatov. Površinski makroagregati vsebujejo tudi dokaj majhen delež lipidov, tj. 0,07-1,1%. Določili so tudi vsebnost silicija. Celotni silicij obsega 6,5% suhe teže makroagregatov, kar nakazuje kopičenje diatomejskih frustul, saj so koncentracije suspendiranega silicija (reaktivnega silicija) v morski vodi majhne (ponavadi ne presegajo nekaj $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) (Kovač, 2005).

Rezultati dosedanjih spektroskopskih analiz (FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) kažejo prevladujočo vsebnost heteropolisaharidov. V vodi netopna frakcija makroagregatov je večinoma sestavljena iz alifatskih sestavin, mineralnih delcev in organosilicijevih spojin, ogljikovi hidrati so prisotni v manjšem deležu. Le-ti so v večji meri zastopani v vodotopni frakciji makroagregatov, vsebnost alifatskih spojin pa je manjša glede na v vodi netopno frakcijo makroagregatov (Kovač, 2005).

Lipidna komponenta

Maščobne kisline predstavljajo ključno komponento lipidov pri bakterijah in evkariontih. Enostavni lipidi (maščobe) predstavljajo maščobne kisline vezane na C_3 alkohol glicerol. Enostavli lipidi so triacilgliceridi, zato ker so tri maščobne kisline vezane na molekulo glicerola. Kompleksni lipidi so enostavni lipidi, ki vsebujejo dodane elemente, kot so fosfor, dušik, žveplo ali majhne hidrofilne ogljikove komponente kot npr. sladkorji, etanolamin, serin ali holin. Lipidi s fosfatno skupino, imenovani fosfolipidi, igrajo pomembno strukturno vlogo v citoplazemski membrani.

Zaradi kemijske zgradbe lipidov so le-ti pomembna strukturna komponenta membran. So amfifilne (kažejo tako hidrofobne kot hidrofilne lastnosti). Lipidi so z ogljikom bogate komponente z visoko energijsko vrednostjo (Parrish in sod., 2000). Številne študije v morskem okolju opisujejo pomembnost dveh lipidnih skupin, in sicer triacilglicerolov in fosfolipidov, ki sta biokemijsko sorodni skupini. Triacilgliceroli predstavljajo pomembne zaloge energije in se uporabljajo kot značilni indeks za morsko favno (Parrish in sod., 2000). Fosfolipidi so pomembne komponente membran, kjer si delijo strukturno funkcijo s steroli. V molekuli imajo hidrofobne in hidrofilne skupine in tvorijo v vodnem mediju urejeno strukturo (micele/ lamele) (Boyer, 2005). Fosfolipidi se uporabljajo za določanje sveže biosintetizirane organske snovi (Derieux in sod., 1998; Parrish in sod., 2000) in posamezni se lahko uporabljajo za razlikovanje bakterij in fitoplanktona (Parrish in sod., 2000). Encimi, ki cepijo fosfolipide, kjer so esterske vezi karboksilnih kislin in fosforne kisline, so fosfolipaze (Boyer, 2005). Posebno vlogo imajo tudi glikolipidi. So spojine, ki so sestavljene iz lipidov in ogljikovih hidratov, kjer predstavlja zadnji del molekule

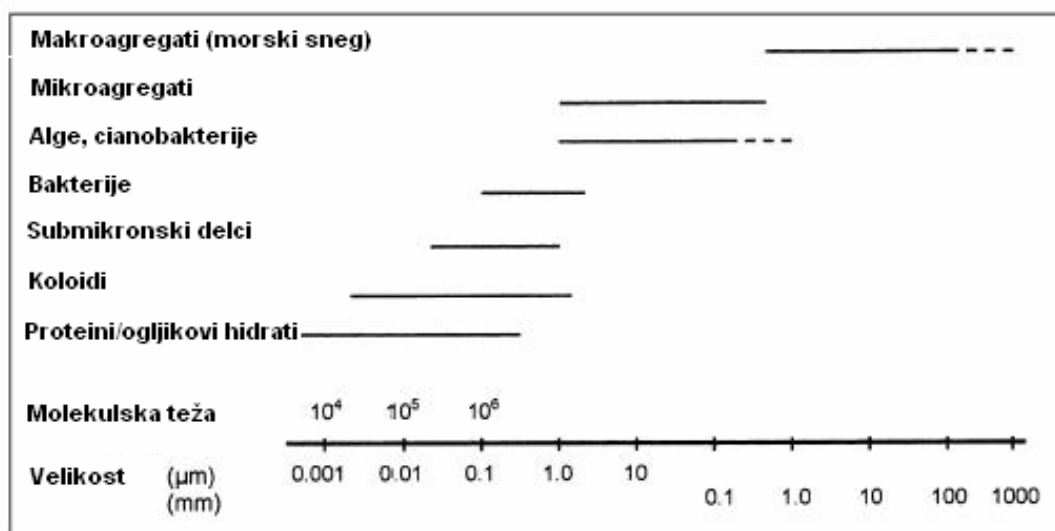
»hidrofilni« del (Boyer, 2005). Lipidi so pomembni za preživetje živali in njihovo rast, (Hazel, 1991; Parrish in sod., 2000).

2.4 BIOLOŠKA SESTAVA MORSKIH MAKROAGREGATOV

V makroagregatih se oblikuje mikrookolje z visoko specializiranimi populacijami in trofičnimi interakcijami, kar poveča biodiverzitetu oligotrofnih pelaških vod. Makroagregati so sestavljeni iz živih, starajočih se in mrtvih alg, predvsem diatomej, kokolitoforidov, cist dinoflagelatov, filamentoznih cijanobakterij, fitodetrита, frustul diatomej, bakterij, protozojev, zooplanktona, zapuščenih hišic larv, mrež pteropodov, fekalnih peletov, detrita makrofitov, glinenih in muljastih mineralov, apnenca in ostalih delcev iz okoliške vode (Alldredge in Silver, 1988; Alldredge in Gotschalk, 1990; Riebesell, 1991; Herndl, 1992; Kaltenbock in Herndl, 1992; Grossart in Simon, 1993; Lampitt in sod., 1993; Grossart in sod., 1997; Alldredge in sod., 1998; Kiorboe in sod., 1998; Zimmermann- Timm in sod., 1998; Simon in sod., 2002). Populacije organizmov, ki so zastopane v makroagregatih se razlikujejo, glede na starost oz. stopnjo razvitosti makroagregata. V svežih vzorcih prevladujejo žive celice nad delno razgrajenimi in njihovimi anorganskimi ostanki npr. frustulami (Kovač in sod., 2005). Število organizmov v makroagregatih je 10^8 do 10^9 celic/ml, kar je 100- do 10000 krat več kot v okoliški vodi (Kiorboe, 2000; Ploug in sod., 1999, Ploug in Grossart, 2000; Schweitzer in sod., 2001; Gram in sod., 2002). Tako je zelo težko napovedati pomembnost prispevkov posameznih organizmov (Giani in sod., 2005). **Zooplankton** (bičkarji, migetalkarji, ličinke rakcev...), ki je v večji meri zastopan v starejših sluzastih makroagregatih (Mohar, 2006), se aktivno hrani z morskim snegom. Hranjenje makrozooplanktona in rib z makroagregati predstavlja direktno povezavo med mikrobno zanko in višjimi trofičnimi nivoji prehranjevalne verige. Te živali dosežejo bakterije povezane v agregate, ki jih ne morejo zaužiti kot prosto suspendirane pikoplanktonske celice. Bakterije obsegajo 50% proteinov makroagregatov (Simon in sod., 2002) in so hkrati hrana za makrozooplankton, poleg fitoplanktonskih alg. Zooplankton lahko igra pomembno vlogo v zmanjšanju produkcije izločene iz evfotične cone zaradi fragmentacije, porabe in mineralizacije agregatov (Banse 1990; Lampitt in sod., 1990; Dilling in sod., 1998; Dilling in Alldredge, 2000; Graham in sod., 2000;

Kiorboe, 2000; Simon in sod., 2002). **Fitoplankton** vključuje različne vrste mikroalg med katerimi so najbolj pogoste diatomeje ali kremenaste alge iz vrst *Cylindriotheca sp.*, *Rhizosolenia sp.*, *Chaetocheros sp.*, *Cyclotella sp.* Prisotni so tudi nekateri dinoflagelati, med katerimi so najpogostejši *Prorocentrum sp.*, *Heterocapsa sp.* in *Gymnodinium sp.* Prisotni so tudi kokolitoforidi, kot npr. *Calyptrosphaera sp.*, *Emiliana sp.*, *Rhabdosphaera sp.*, *Syracosphaera sp.* in še nekatere neidentificirane vrste (Kovač in sod., 2005; Kovač in sod., 2006). **Bakterije** predstavljajo pomembno biološko komponento sluzi. Vlogo bakterij v sluzi lahko primerjamo z vlogo bakterij v morskem snegu. Veliko študij je pokazalo, da je morski sneg gosto poseljen z mikrobi (Simon in sod., 2002; Grossart in sod., 2006). Mikrobna aktivnost lahko zmanjša in spremeni morski sneg (Azam in Long, 2001; Grossart in sod., 2006). Bakterijske celice običajno niso enakomerno porazdeljene po agregatu, ampak oblikujejo mikrokolonije (Logan in sod., 1994; Grossart in Simon, 1998; Grossart in Ploug, 2000, Simon in sod., 2002). Število bakterij v agregatu je povezano z velikostjo agregata. V mikroagregatih (1,0 μm - 1,0 mm) je število bakterij <100 (Passow in Alldredge, 1994; Berger in sod., 1996; Brachvogel in sod., 2001; Knoll in sod., 2001; Simon in sod., 2002) in >10⁶ bakterij za makroagregate velikosti >10 mm. Volumen bakterij v agregatih je večja v primerjavi z volumnom prostoživečih bakterij v okoliški vodi; je v mejah med 0,01 in 1 μm^3 na celico (Slika 2) (Alldredge in sod., 1986; Simon, 1987; Herndl, 1988; Alldredge in Gotschalk, 1990; Simon in sod., 2002), kar pomeni, da so 2 do 3 krat večje od prostoživečih bakterij. To je posledica lažjega dostopa do hranil v makroagregatih kot v okliški vodi. Visoka hidrolizna encimska aktivnost heterotrofnih bakterij lahko razbije morski sneg in s tem zmanjša vertikalni tok organskega materiala (Smith in sod., 1992; Grossart in sod., 2001; Grossart in sod., 2006). V nasprotju pa lahko heterotrofne bakterije povečajo agregacijo delcev/partiklov in stabilizirajo obstoječe agregate s produkcijo eksopolimerov (Decho, 1990; Heissenberger in Herndl, 1994; Grossart in sod., 2006). Opisani so bili 3 funkcijski tipi bakterij (Rieman in sod., 2000; Kirchman, 2002; Grossart in sod., 2005; Grossart in sod., 2006): bakterije ki so specializirane v kolonizaciji partiklov, prostoživeče bakterije in bakterije, ki lahko rastejo v suspenziji, kot tudi na/v partiklih. Prevlada enega funkcijskega tipa bakterij je lahko pokazatelj specifičnih interakcij med bakterijskimi združbami in združbami alg med fitoplanktonskim cvetenjem. Heterotrofne bakterije so pomembne za agregacijo

fitoplanktonskih celic, zlasti diatomej (Simon in sod., 2002, Grossart in sod., 2006). Študije (Decho, 1990; Griebe, 1991; Heissenberger in Herndl, 1994; Grossart in sod., 2006) kažejo, da bakterije ki kolonizirajo diatomeje proizvajajo večje količine eksopolimernih substanc, kar poveča lepljivost in s tem agregacijo fitoplanktonskih celic (Grossart in sod., 2006). Za severni Jadran je značilna močna poletna stratifikacija in zmanjšana turbolenca, kar vpliva, da so prosto živeče **cijanobakterije** (npr. *Synechococcus sp.*, *Cyanothece sp.*) ujete v mukoidne makroagregate. V tem primeru so lahko cijanobakterije pomembni producenti organskega materiala v morskem snegu (Kaltenbock in Herndl, 1992). Med poletno stratifikacijo morja lahko cijanobakterijska produkcija prevlada nad eukariotsko primarno produkcijo (Joint in Pomeroy, 1983; Howard in Joint, 1989; Jochem, 1989; Kaltenbock in Herndl, 1992). V času zatona cvetenja morja se sproščajo molekule z visoko molekulsko maso (Lancelot 1983; Kaltenbock in Herndl, 1992). Sproščeni material koagulira in postane mukoidni suspendirani material, v katerega so ujete prostoživeče cijanobakterije (Alldredge in Gotschalk, 1990; Alldredge in sod., 1991; Kaltenbock in Herndl, 1992).



Slika 2: Velikosti ključnih suspendiranih in raztopljenih organskih konstituent v morskem okolju (Simon in sod., 2002)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ORIS PODROČJA RAZISKAVE

Jadransko morje leži v smeri jugovzhod-severozahod in sega na jugu od 40°, na severu pa do 45° 45' severne geografske širine (Slika 3). Severni del morja je zelo plitke, med južno obalo Istre in Riminijem redko preseže globino 50 m. Najsevernejši in najplitkejši del Jadrana je Tržaški zaliv. Omejen je z linijo, ki povezuje na jugu Savudrijski rt ter na severozahodu izliv reke Soče. Severozahodni del je plitvejši od jugovzhodnega in največja globina osrednjega dela ne preseže 30 m, medtem ko je dobra petina zaliva plitkejša od 10 m. Površina Tržaškega zaliva meri okoli 600 km², njegova prostornina pa 9,5 km³.

Značilnosti vodnih mas Tržaškega zaliva so v veliki meri odvisne od pritokov večjih in manjših rek. Največji sladkovodni vnosi so v severozahodnem delu zaliva. Vnosi na slovenski strani v jugovzhodnem delu so mnogo manjši. Najpomembnejša reka Tržaškega zaliva je reka Soča, katere povprečni pretok je 204 m³/s in je tudi glavni vir N, P in Si v Tržaškem zalivu. Pretoki slovenskih vodotokov Rižane, Badaševice, Dragonje in Drnice letno v povprečju ne presežejo 10 m³/s, vendar pa je zaradi njihove hudourniške narave pretok močno pogojen s padavinami; tako se lahko pretok ob nevihtah poveča za več kot deset krat. Sezonske variacije rečnih dotokov in pojav vetra (burja in jugo) vplivajo na cirkulacijski režim celotnega severnega Jadrana in s tem Tržaškega zaliva in poteka v nasprotni smeri urinega kazalca.

Slanost in njena porazdelitev po zalivu sta odvisni od pretokov rek, vendar le v površinskem sloju, kjer se vrednosti gibljejo od 32 do 38.5 PSU in na dnu od 36 do 39 PSU. Te razlike so v globljih slojih veliko manjše, vrednosti pa dokaj stabilne, saj tu vpliv rek ni več zaznaven. Razpon temperature površinskega sloja vode je v Tržaškem zalivu širok: od okoli 6 °C februarja do okoli 26 °C avgusta. V pridnenem sloju vode temperatura niha med 6 °C in 20 °C. Struktura vodnega stolpca kaže izrazito sezonsko dinamiko- za

zimsko in zgodnje pomladansko obdobje so značilne premešane vodne mase, v poletnem obdobju pa se vzpostavi termoklina, ki se zaradi občasnih močnih neviht lahko tudi poruši.

Tudi vnos hranilnih snovi v Tržaški zaliv, še posebej nitrata in silikata, je odvisen od sezonske spremenljivosti sladkovodnih pritokov in obilnejših padavin (Malej in sod., 1995), zato so koncentracije hranil v vodi lahko zelo spremenljive. Koncentracija hranilnih snovi je najvišja v površinskem sloju spomladi in jeseni ter poleti v pridnenem sloju pod termoklino- posledica procesov regeneracije. Ponavljajoči se in nenadni vnosi hranilnih snovi v Tržaški zaliv neposredno vplivajo na skokovito naraščanje in upadanje fitoplanktonske biomase in primarne produkcije. Količina klorofila *a*, kot ocena fitoplanktonske biomase, se giblje od vrednosti značilnih za oligotrofna območja (< 0,5 µg/l) pa do evtrofnih razmer (okoli 15 µg/l). Velika sezonska spremenljivost se kaže tudi v taksonomski strukturi fitoplanktonske združbe. To področje naseljujejo neritične združbe mikroflagelatno-diatomejskega tipa, kjer v večjem delu leta prevladujejo mikroflagelati. Občasno se pojavijo izraziti diatomejski viški, ki so omejeni na krajša časovna obdobja in največkrat predstavljajo tudi absolutne viške celotne fitoplanktonske združbe. Praviloma so ti viški sezonsko omejeni na pomlad in jesen, kar je značilno za obalna morja zmernege pasu, vendar je bliskovit porast diatomej v Tržaškem zalivu povezan tudi s kratkotrajnimi poletnimi nevihtami, povečanim vnosom hranilnih snovi in premešanjem razslojenega vodnega stolpca (Malej in sod., 1997). Takšne nenadne spremembe lahko spremenijo sestavo in gostoto fitoplanktona. V zimskih mesecih so številčni tudi kokolitoforidi. Dinoflagelati so vedno prisotni, a je njihov delež manj pomemben kot pa delež, ki ga dosegajo pri celotni biomasi fitoplanktona. Silikoflagelati so prisotni jeseni in pozimi in še tedaj v zelo majhnem številu (Izvajanje monitoringa, 2004).

Dejavniki kot so temperatura zraka, porazdelitev padavin, smer in hitrost vetra, prispevajo k raznolikosti procesov pri nastajanju pojava sluzenja ter s tem neposredno vplivajo na razlike v sestavi sluzi in na kompleksnost strukture sluzi.



Slika 3: Geografska lega Tržaškega zaliva v Jadranskem morju (foto: arhiv MBP)

3.2 VZOREC

3.2.1 Vzorčenje

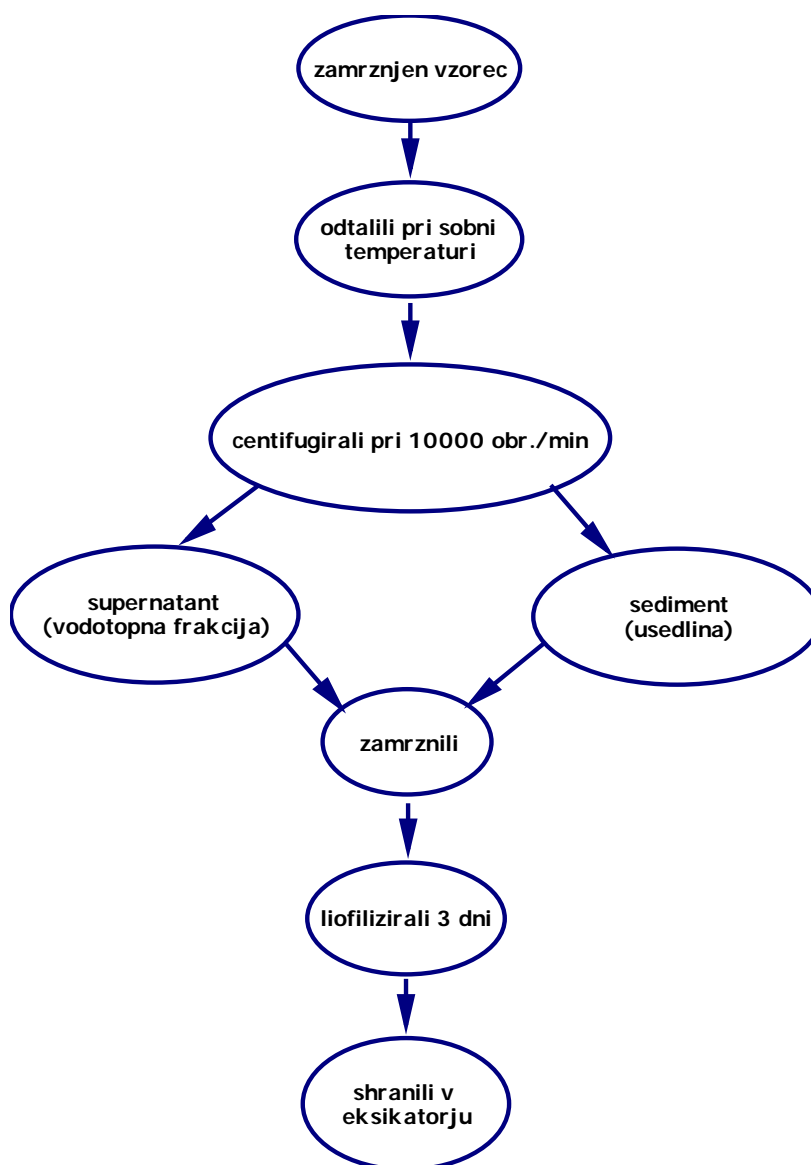
Vzorec je bil odvzet 1. 7. 2004 na morski površini pred Morsko biološko postajo v Piranu (Slika 4). Vzorec je bil odvzet ročno s polietilensko posodo, zaradi kompaktnosti samih makroagregatov je pri tem bila zajeta minimalna količina okoliške morske vode. Temperatura morja je bila 26 °C. Vzorec je bil sivkaste barve, zelo kompakten in sluzast. Vseboval je nekaj makrofitov.



Slika 4: Lokacija mesta vzorčenja v Tržaškem zalivu

3. 2. 2 Priprava vzorca

Do začetka eksperimentalnega dela je bil vzorec shranjen v posodi v hladilniku pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorec smo najprej odtalili na sobni temperaturi ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ter po centrifugiranju vzorca ločili sediment (usedlina) od supernatanta (vodotopna frakcija). Posamezne podvzorce supernatanta in sedimenta smo razdelili v posodice, jih zamrznili ter nadalje liofilizirali. Sol, ki je ostala na liofiliziranih vzorcih sedimenta služi, smo odstranili s spiranjem z destilirano vodo. Vzorec smo nato ponovno posušili. Liofilizirane vzorce smo pri nadaljnem delu hranili v eksikatorju (Slika 5).



Slika 5: Shema priprave vzorca

3.3 EKSPERIMENT IN METODE

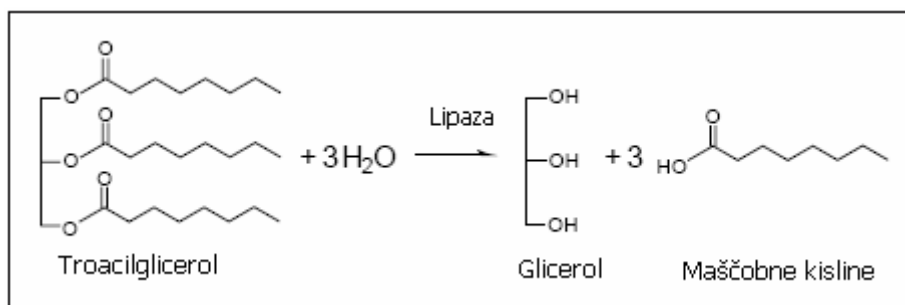
3.3.1 Potek eksperimenta

Eksperiment smo si zamislili, kot ponazoritev bakterijske razgradnje morskih makroagregatov. Želeli smo pridobiti več informacij o bakterijski razgradnji makroagregatov ter o strukturnih povezavah med posameznimi komponentami makroagregatov. Ker smo se želeli čimbolj približati dejanskim pogojem v morju, v času sluzenja, smo pri izbiri encima za razgradnjo sluzi morali upoštevati (Dell' Anno in sod., 2000):

- strukturo in kemično sestavo makroagregatov;
- hidrografske pogoje v morju;
- spekter encimov morskih bakterij, ki so prisotne pri razgradnji sluzi.

Sluzasti makroagregati imajo zapleteno in zamreženo strukturo, sestavljeno predvsem iz organosilicijevih spojin, dolgih alkilnih verig, vezanih preko amidne in esterske vezi na osnovno heteropolisaharidno strukturo. V manjši meri so v makroagregatih prisotni še proteini, lipidi in aromatske spojine (Kovač, 2005). Zaradi kemične sestave in spektra bakterijskih encimov smo kot glavni encim za razgradnjo lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov izbrali encim lipazo.

Lipaze so hidrolaz triacilglicerol estrov (EC 3.1.1.3) in hidrolizirajo dolgoverižne estre maščobnih kislin glicerola, pri čemer se sprosti mono- in diglicerol in proste maščobne kisline (Slika 6). Pomembna lastnost lipaz je delovanje na fazni meji slika-lje-voda, katere prisotnost poveča encimsko aktivnost (medfazna aktivnost). Postale so tudi biotehnološko pomembni encimi, ki se uporabljajo za prečiščevanje hrane, kot aditivi v pralnih praških in tudi kot diagnostični encimi. Uporabljene lipaze so običajno glivnega ali bakterijskega izvora, s *Pseudomonasom* kot najbolj pomembnim bakterijskim rodom (Jaeger in sod., 1993).



Slika 6: Katalitična aktivnost lipaze

Eksperimentalne pogoje smo določili s pomočjo predeksperimenta in literature. Zato smo se poslužili 3- tedenskega obdelovanja vzorca z encimom, kjer smo k 280 mg liofilizirane sluzi dodali 210 ml destilirane vode ter 42 mg/7 ml encima lipaze (Slika 7). Pri tem smo v različnih časovnih intervalih vzeli podvzorce in merili količino sproščenih lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov. Encim smo izbrali tako, da ima optimum delovanja pri temperaturi inkubacije, torej s temperaturnim optimumom okoli 25 – 27 °C, ter da za njegovo delovanje niso nujno potrebni posebni pufri. Vzorca (obdelan z encimom in neobdelan) smo inkubirali v komori na stresalniku (zelo rahlo stresanje) pri temperaturi 27 °C. Eksperimentalne pogoje, tj. temperaturo 27 °C, odsotnost pufrov, rahlo stresanje smo izbrali zato, da smo se čimbolj približali dejanskim pogojem v morju.

Merili smo količino lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov, glede na čas delovanja encima v časovnem obdobju 3 tednov. Izbrali smo 7 različnih časov:

- t_1 = takoj ko smo dodali encim;
- t_2 = pri 20 min;
- t_3 = pri 60 min;
- t_4 = pri 24 ur;

- t_5 = pri 1 tednu;
- t_6 = pri 2 tednih in
- t_7 = pri 3 tednih po dodatku encimov.

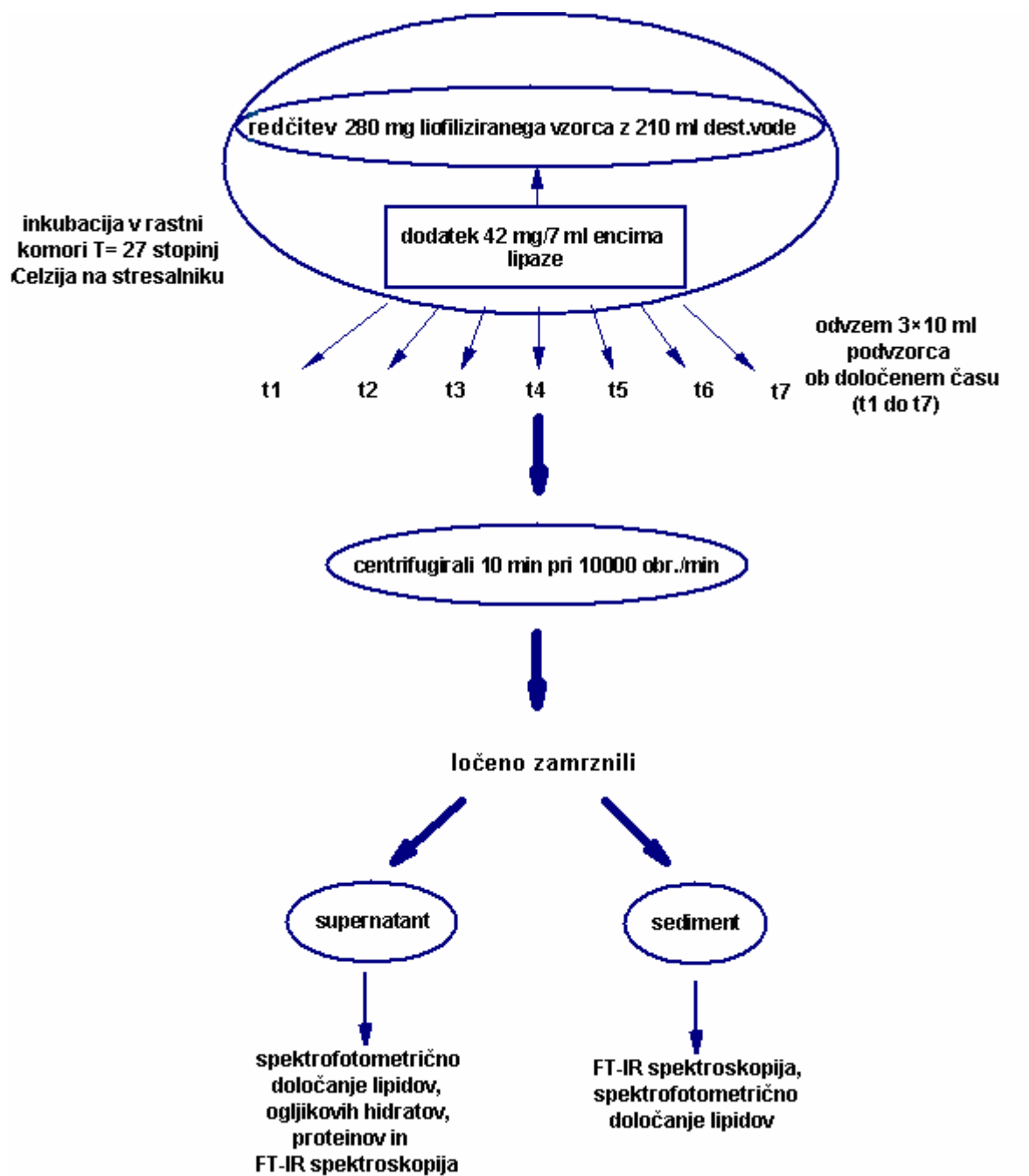
Merili smo tudi količino lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov v neobdelanem (kontrolnem) vzorcu tj. vzorcu kateremu nismo dodali encima lipaze. Izbrali smo 3 različne čase:

- kontrola₁ = takoj po mešanju sluzi in vode (začetek eksperimenta);
- kontrola₂ = po 2 tednih;
- kontrola₃ = po 3 tednih.

Pri vsakem izmed časov za z encimom obdelan vzorec in kontrolni vzorec smo odvzeli 3 × 10 ml podvzorca, ga centrifugirali 5 min pri 11000 obratov/ min, zato da smo ločili supernatant od sedimenta ter ločeno zamrznili. Sediment smo uporabili za spektrofotometrično določanje lipidov v vzorcu in za študij strukturnih sprememb s FT-IR spektroskopijo. Medtem ko smo spremembe v koncentraciji lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov, s spektrofotometrično analizo vzorca, spremljali v supernatantu.

Strukturne spremembe zaradi encimske razgradnje smo proučevali tudi s FT-IR spektroskopijo. Pri tem smo analizirali izbrani vzorec pred encimsko razgradnjo (brez encimov: celoten vzorec, sediment vzorca in supernatant vzorca) ter vzorec, ki je bil obdelan z encimom (po encimski razgradnji: sediment vzorca in supernatant vzorca). FT-IR spektri so nam dali informacijo o strukturnih spremembah komponent v makroagregatih po encimski razgradnji, ter vpogled v način razgradnje. Zaradi majhnih količin encimov uporabljenih za pripravo raztopin encimov, ki smo jih prav tako v majhnih količinah dodali vzorcem makroagregatov, smo prispevek strukture samih encimov k spektru vzorca zanemarili.

Vzorec za FT-IR analizo smo pripravili tako, kot za spektrofotometrično analizo. Ustrezno količino vzorca smo centrifugirali 5 min pri 11000 obratov/ min, ločili supernatant in sediment, oboje zamrznili, tako supernatant kot tudi sediment liofilizirali.



Slika 7: Shema poteka eksperimenta

3. 3. 2 Določanje lipidov v makroagregatih

Za določanje celotnih lipidov smo uporabili sulfo-fosfo-vanilinsko metodo (Bligh in Dyer, 1959; rahla modifikacija Barnes in Blackstock, 1973). Iz supernatanta (obdelanega z encimom in kontrolnega) za izbrani čas smo odvzeli 3 ml podvzorca, prelili v stekleno epruveto ter mu dodali po 3 ml kloroform metanola (2:1 v/v) in mešali 1 min na vorteks mikserju. Merili smo tudi količino lipidov v sedimentu. Zatehtali smo 3 mg vzorca ter mu dodali 3 ml kloroform metanola (2:1 v/v), homogenizirali in 15 min centrifugirali. 0,5 ml ekstrakta (supernatanta, kot tudi sediment obdelanega in kontrolnega vzorca); za izbrani čas smo prenesli v epruvete in dodali 0,5 ml 95-97% H₂SO₄, dobro pretresli in pokrili. Sledilo je 10 minutno segrevanje na 100 °C, nato smo vzorčne raztopine ohladili v hladni kopeli. Z mikropipeto smo prenesli 0,1 ml te tekočine v suhe epruvete in dodali 2,5 ml vanilinskega reagenta in dobro premešali; po 30-60 min inkubacije na sobni temperaturi se je razvilo svetlo rožnato obarvanje. Nato smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini $\lambda = 490$ nm na Philips spektrofotometru. Kot slepo probo (vrednost 0) smo uporabili 0,5 ml destilirane vode z 0,5 ml 95--97% H₂SO₄ in jo obdelali po že opisanem postopku za določanje celotnih lipidov. Za izdelavo umeritvene krivulje (priloga A1) smo kot standard uporabili holesterol (proizvajalec "Sigma", ZDA).

3. 3. 3 Določanje ogljikovih hidratov v makroagregatih

Za določanje celotnih ogljikovih hidratov smo uporabili nekoliko modificirano spektrofotometrično metodo po Duboisu in sod. (1956). 1 ml podvzorca supernatanta (obdelanega z encimom in kontrolnega) za izbrani čas smo prelili v stekleno epruveto ter dodali 1 ml 5% fenola in 5 ml 95--97% H₂SO₄. Po 20 min se je razvilo rumeno-oranžno obarvanje, saj med ogljikovimi hidrati in H₂SO₄ pride do dehidracije, kjer iz pentoz nastane furfural, iz heksoz pa hidroksifurfural. Nastali furfurali (aldehidi) tvorijo pri reakciji s fenolom značilno rumeno-oranžno obarvanje. Raztopino smo za tem dobro premešali ter izmerili absorbanco v 1 cm kiveti pri valovni dolžini $\lambda = 490$ nm. Za pripravo slepe probe smo uporabili 1 ml destilirane vode z dodanimi reagenti: 1 ml 5% fenola in 5 ml 95--97% H₂SO₄. Za izdelavo umeritvene krivulje (priloga A2) smo kot standard uporabili različne koncentracije β -D-glukoze (proizvajalec "Sigma", ZDA).

3.3.4 Določanje proteinov v makroagregatih

Količino proteinov smo določali s Coomassie Brilliant Blue Plus (»Bradford assay«). Gre za spektrofotometrično metodo za določanje koncentracije proteinov. 1 ml podzorca supernatanta (obdelanega z encimom in kontrolnega) za izbrani čas smo prelili v stekleno epruveto ter mu dodali po 1 ml Coomassie Blue reagenta, dobro premešali. Po 10 min inkubacije na sobni temperaturi se je razvilo svetlo plavo do modro obarvanje, saj se zunanje kisle sulfonske skupine reagenta Coomassie Brilliant Blue vežejo na bazične in aromatske zunanje skupine aminokislin v proteinih, spremenijo absorpcijski maksimum barvila z $\lambda = 465$ nm na $\lambda = 595$ nm, ter povzročijo modro obarvanje. Nato smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini $\lambda = 595$ nm na spektrofotometru Philips. Kot slepo probo (vrednost 0) smo uporabili 1 ml destilirane vode z dodanim 1 ml Coomassie Blue reagenta. Za izdelavo umeritvene krivulje (priloga A3) smo kot standard uporabili BSA protein (proizvajalec "Sigma", ZDA).

3.3.5 Analiza vzorcev s FT-IR spektroskopijo

Infrardeča spektroskopija FT-IR se uporablja za določanje kemične sestave in strukture določene snovi. Temelji na fotonih infrardeče svetlobe z valovnimi dolžinami 2,5-50 μm , ki imajo zadostno energijo za vzbujanje nihanj atomov v molekulah. Pri tem pride do spremembe dolžine vezi med posameznimi atomi ali do spremembe valenčnega kota med temi vezmi. Jakost absorpcije infrardeče svetlobe je sorazmerna spremembi dipolnega momenta skupine (polarnosti vezi), ki absorbira. V določenih primerih so vezi tako malo polarne, da absorpcije ne opazimo. Le-to lahko zabeležimo v obliki spektra FT-IR, pri čemer dobimo absorpcijske trakove posameznih tipov vezi (funkcionalnih skupin), ki so prisotne v analiziranem vzorcu. V določenih območjih IR spektra se pojavlja zelo veliko število absorpcijskih trakov, kot posledica različnih funkcionalnih skupin, tako da je njihova določljivost večkrat težavna. Prav zato se za natančnejše določanje strukture snovi uporablja kombinacija različnih spektroskopskih (FT-IR, NMR, UV-VIS) in drugih

analitskih metod (plinska in tekočinska kromatografija, rentgenska analiza, mikroskopske tehnike...) (Kovač, 2005).

Infrardeče spektre FT-IR (Fourier transform-infrared spectroscopy) liofiliziranih vzorcev supernatanta in sediment (glej poglavje 3. 2. 2) smo posneli s spektrometrom Perkin-Elmer Spectrum One z uporabo KBr. Uporabili smo 5% zmes KBr in suhega homogeniziranega vzorca.

3. 3. 6 Ostanek po sežigu

Za določanje deleža organske in karbonatne faze v vzorcu uporabljamo sekvenčni sežig pri določenih temperaturah (LOI- Loss-on-ignition metoda). V prvi stopnji oksidiramo organsko snov pri 550 °C v ogljikov dioksid, pri čemer je delež mase sorazmeren deležu organske snovi v vzorcu. Pri segrevanju je pomembno, da ne presežemo 550 °C, ker lahko pri višjih temperaturah pride do izgube hlapnih soli, anorganskega ogljika in strukturne vode pri glinenih materialih. Trajanje sežiga je odvisno od mase vzorca in koncentracije organske snovi v vzorcu. Ponavadi traja analiza 2 uri, pri vzorcih z višjo koncentracijo tudi 4 ure.

Delež organske snovi izračunamo po enačbi:

$$LOI_{550} = ((DW_{105} - DW_{550}) / DW_{105}) * 100 \quad (1)$$

LOI₅₅₀...LOI pri 550 °C

DW₁₀₅...masa suhega vzorca pred sežigom

DW₅₅₀... masa suhega vzorca po sežigu na 550 °C

Delež karbonata v vzorcu določimo v drugi stopnji, kjer se pri temperaturi 950 °C razgradijo karbonati v ogljikov dioksid in preostali oksid. Pri tem ne moremo določiti, kateri mineral je prisoten, ker različni karbonati razpadejo pri temperaturah od 700 do 850 °C.

Delež karbonata izračunamo po enačbi:

$$LOI_{950} = ((DW_{550} - DW_{950}) / DW_{105}) * 100 \quad (2)$$

LOI₉₅₀...LOI pri 950 °C

DW₉₅₀... masa suhega vzorca po sežigu na 950 °C

Sorazmernostno konstanto dobimo iz razmerja molskih mas za ogljikov dioksid in karbonat po enačbi:

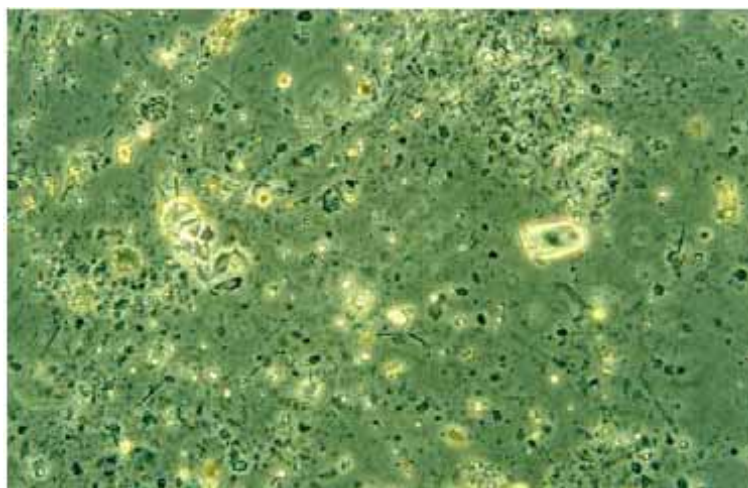
$$M(CO_3^{2-})/M(CO_2) = 60/44 = 1,36 \quad (3)$$

$$M(CaCO_3)/M(CO_2) = 100/44 = 2,27 \quad (4)$$

4 REZULTATI

4.1 OPIS NEOBDELANEGA VZORCA

Vzorec, ki je bil odvzet dne 1.7.2004 na morski gladini pred Morsko biološko postajo v Piranu, je bil sivkaste barve zelo kompakten in sluzast. S svetlobnim mikroskopom smo opazili, da so v vzorec ujeti različni organski in anorganski delci, kot so: zooplankton, fitoplankton, bakterije, fekalne peletke in ličinke zooplanktona. Poleg tega so v sluzasto omrežje ujeti tudi hitinski oklepi rakcev, prazne frustule diatomej, detritni material odmrlih celic in delci makrofitskih alg (Slika 8).



Slika 8: Mikroskopski posnetek gostega in želatinoznega makroagregata; 200-kratna povečava (foto: Mozetič P.)

Z določanjem organske snovi v vzorcu po metodi LOI je ostanek vzorca po sežigu pri 550 °C znašal 69,7%, kar kaže da je v vzorcu bilo 30,3% organske snovi (1). V drugi stopnji, kjer smo določali delež karbonata se je le-ta pri temperaturi 950 °C razgradil v ogljikov dioksid in preostali oksid. Po sežigu pri 950 °C je ostanek znašal 55,4% (2). Zmanjšanje organske snovi za 14,3%, odpade na karbonat.

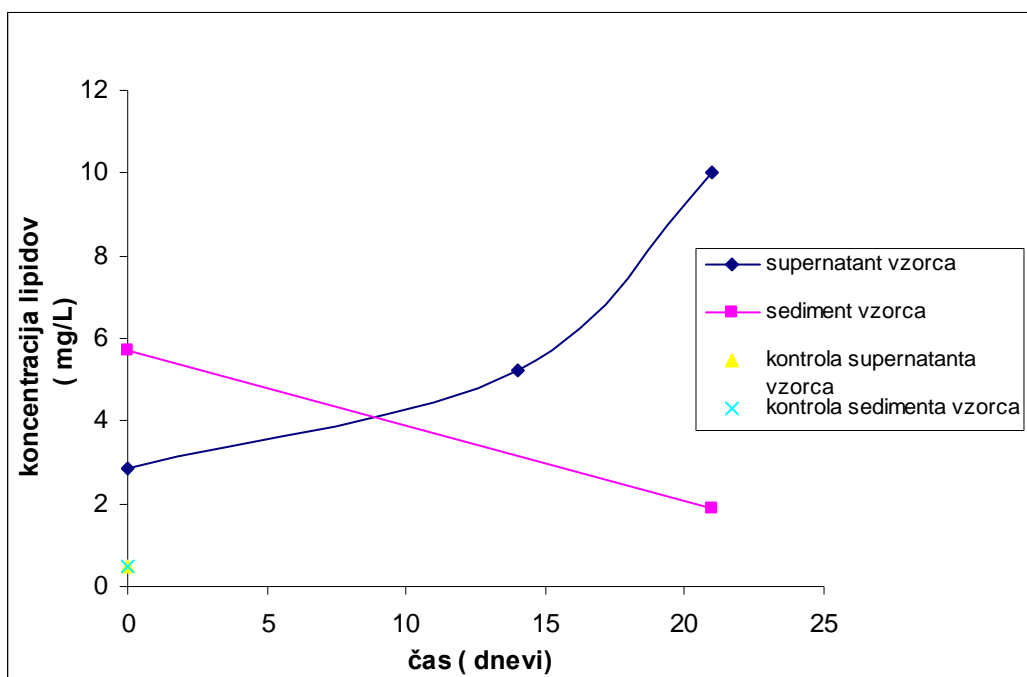
V vzorcu sta vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ znašali $-19,00\text{ ‰}$ ter $+4,90\text{ ‰}$. Določena vrednost $\delta^{13}\text{C}$ je značilna za morski fitoplankton oziroma s podobno vrednostjo je bilo označeno

naravno cvetenje in cvetenje kultur diatomej (stacionarna faza rasti), flagelatov, dinoflagelatov iz Tržaškega zaliva. Dobljena vrednost $\delta^{15}\text{N}$ je značilna za plankton in raztopljeni nitrat (Kovač, 1999).

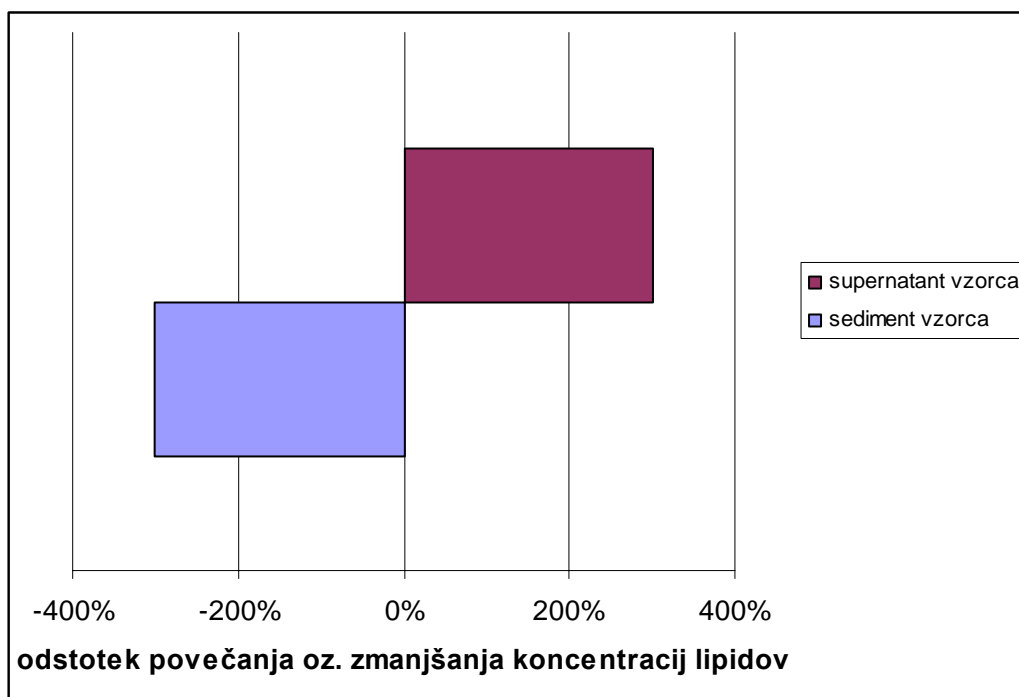
FT-IR spektri analize izhodnega vzorca se ujemajo z dosedanjimi rezultati v smislu prisotnosti glavnih komponent matriksa makroagregatov. Pri encimski razgradnji pride do razgradnje osnovne strukture, kar vodi do sproščanja posameznih komponent, ki smo jih merili, v vodno fazo.

4.2 SPREMEMBE KONCENTRACIJ LIPIDOV MED ENCIMSKO RAZGRADNJO Z LIPAZO

Študirali smo encimsko razgradnjo lipidov v morskih makroagregatih. Pri tem smo spremljali spremembe koncentracij lipidov v supernatantu in v sedimentu vzorca obdelanega z encimom ter v supernatantu in sedimentu kontrolnega vzorca, tj. v vzorcu, kjer nismo dodali encima.



Slika 9: Spreminjanje koncentracije lipidov v odvisnosti od časa v supernatantu in sedimentu vzorca obdelanega z encimom lipazo ter v kontrolnih vzorcih supernatanta in sedimenta



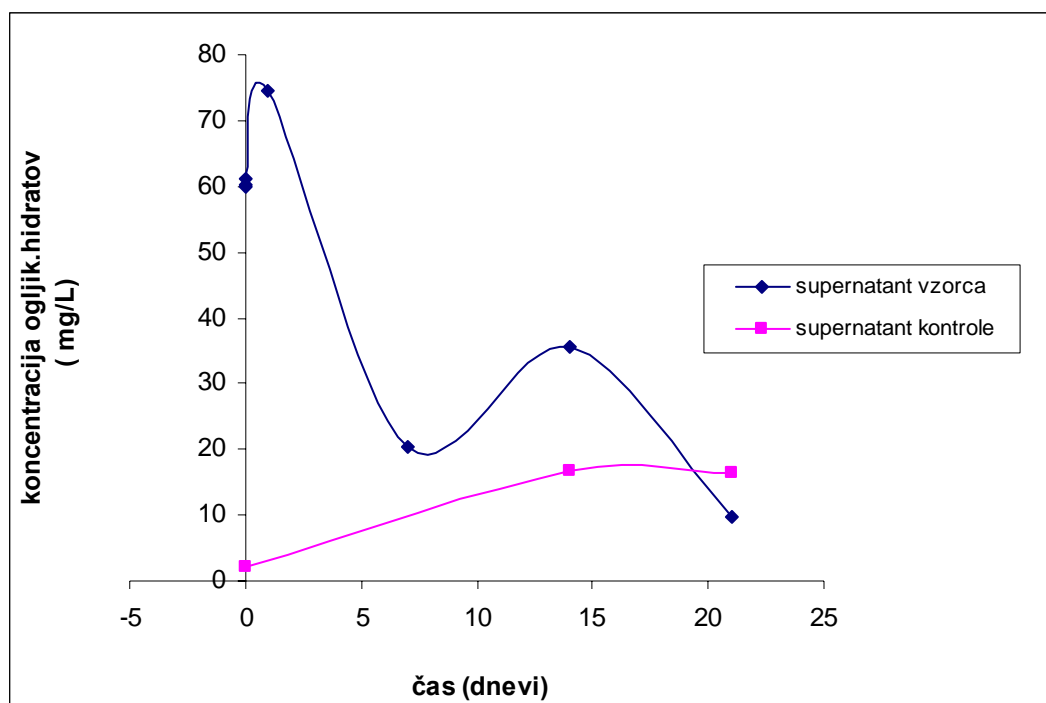
Slika 10: Odstotek znižanja koncentracije lipidov v sedimentu vzorca obdelanega z encimom lipazo in sočasni dvig odstotka koncentracije lipidov v supernatantu vzorca obdelanega z encimom lipazo v časovnem obdobju treh tednov

Koncentracija lipidov se takoj po dodatku encima v supernatantu vzorca poveča za 3 krat glede na koncentracijo lipidov v kontrolnem vzorcu supernatanta (v istem času t_1). V nadaljevanju eksperimenta koncentracija lipidov narašča in najvišjo vrednost doseže ob koncu eksperimenta, tj. po treh tednih. V prvih dveh tednih eksperimenta se je koncentracija lipidov počasi in bolj enakomerno povečevala, v naslednjem tednu pa smo opazili bolj strmo rast koncentracije lipidov. Izmerjena koncentracija lipidov ob koncu eksperimenta je bila ≈ 3 krat večja od vrednosti koncentracije lipidov v začetku eksperimenta. Nasproten trend smo opazili za sediment vzorca, kjer smo takoj po dodatku encima izmerili približno 6 krat večjo koncentracijo kot v kontrolnem neobdelanem sedimentu. Ob koncu eksperimenta smo izmerili za 2 krat nižjo vrednost v koncentraciji lipidov kot v začetku eksperimenta. Višja vrednost v koncentraciji lipidov (v *sedimentu*) takoj po dodatku encima je verjetno posledica sprememb v sami strukturi osnovnega matriksa makroagregatov, saj verjetno zaradi delovanja encima pride do večje dostopnosti vezavnih mest za reagent s katerim določamo lipide.

Kolorimetrična metoda, ki smo jo izbrali za dokazovanje prisotnosti in s tem tudi spremembe v koncentraciji lipidov se je izkazala kot manj primerna metoda za dokazovanje lipidov v naših vzorcih. Zaradi zelo nizke vsebnosti lipidne komponente, bi morali alifatsko/lipidno komponento analizirati z uporabo plinske kromatografije, kar pa v okviru danega diplomskega dela ni bilo možno izpeljati. Kljub temu pa dobljeni rezultati kažejo na porast v koncentraciji lipidov v supernatantu v času poteka poskusa (Slika 9). Medtem ko rezultati analize sedimenta vzorca kažejo na sproščanje in razgradnjo lipidov v vodno fazo skozi eksperiment, zaradi delovanja encima na substrat sedimenta. Najnižjo koncentracijo lipidov smo izmerili po treh tednih, saj se jih je ob delovanju encima nekaj sprostil v vodno fazo (supernatant) (Slika 9).

4.3 SPREMEMBE KONCENTRACIJ OGLJIKOVIH HIDRATOV MED ENCIMSKO RAZGRADNJO Z LIPAZO

Da bi dobili podrobnejši vpogled v medsebojno povezanost osnovnih komponent makroagregatov, smo spremljali tudi spremembe koncentracij ogljikovih hidratov, zaradi encimske razgradnje osnovnega matriksa z lipazo. Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v vzorčni raztopini supernatanta prikazuje slika 11. Koncentracije ogljikovih hidratov smo izračunali iz vrednosti absorbanc.



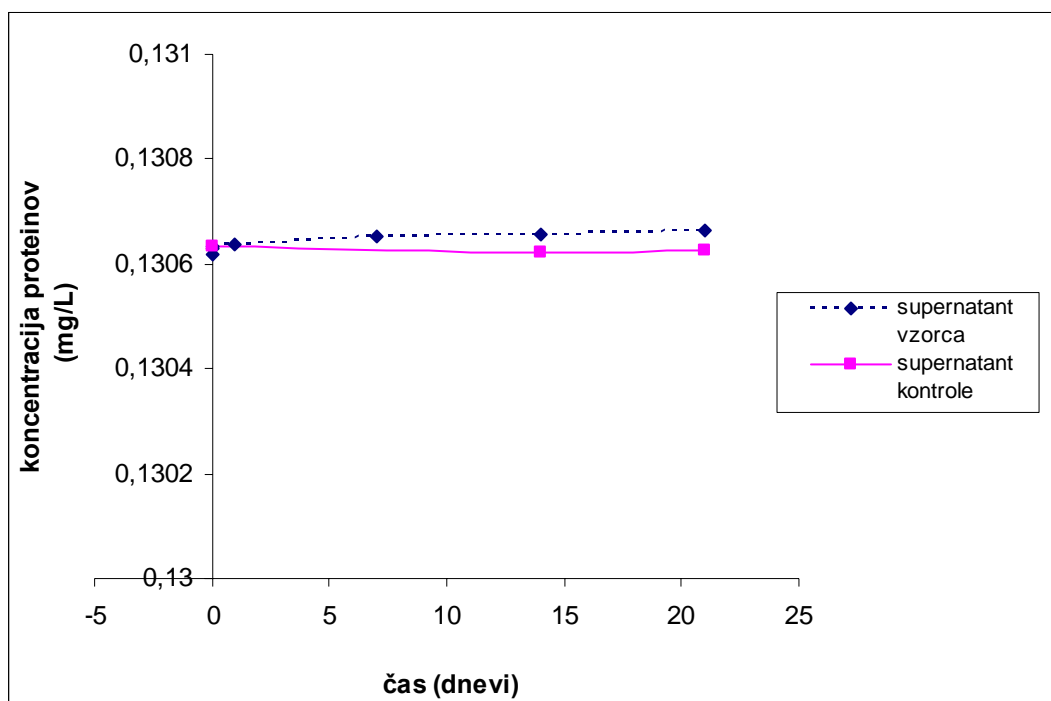
Slika 11: Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa v supernatantu kontrolnega vzorca in vzorca obdelanega z encimom lipazo

Spremljali smo tudi spremembe koncentracije ogljikovih hidratov v kontrolnem vzorcu v katerega nismo dodali encima (Slika 11). S kontrolnimi vzorci smo lahko potrdili prisotnost bakterijskih encimov, ki so avtohtoni v makroagregatih. Koncentracija ogljikovih hidratov v vzorcu obdelanem z encimom, takoj po dodatku encima (t_1) naraste za 66 krat glede na koncentracijo ogljikovih hidratov v kontrolnem vzorcu ob istem času.

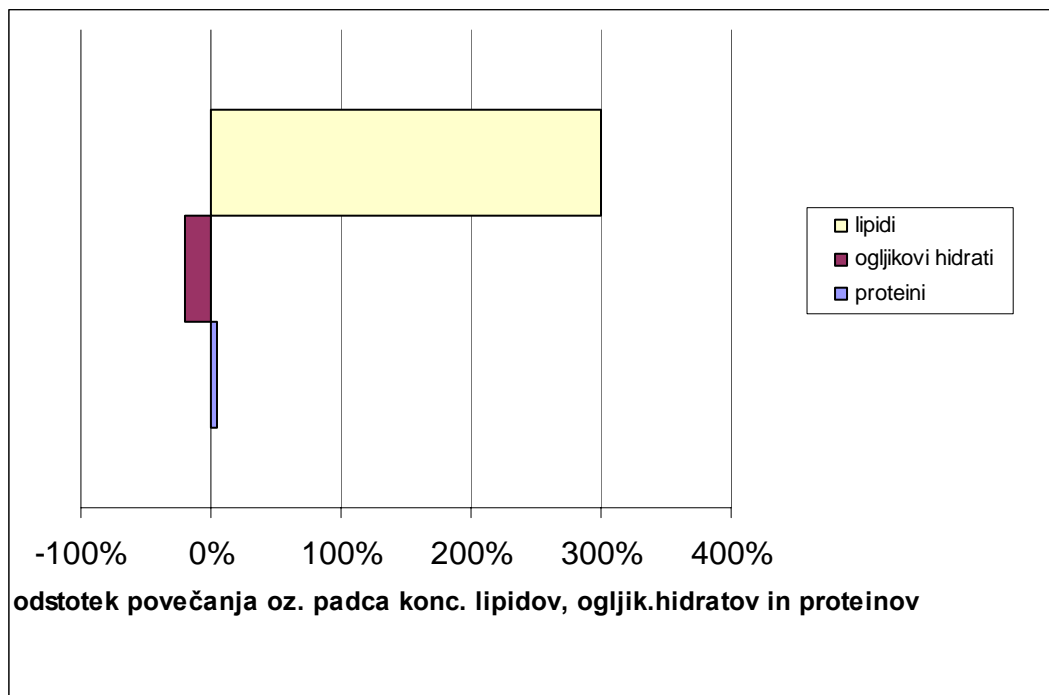
Eksperimentalni rezultati tritedenskega obdelovanja morske sluzi z encimom lipazo, kažejo na spremembe v koncentraciji ogljikovih hidratov, ki smo jo določili v vodni fazi. Takoj po dodatku encima (čas t_1) je koncentracija ogljikovih hidratov sunkovito narastla. Padec je sledil po enem tednu obdelovanja vzorca z encimom. Koncentracija ogljikovih hidratov je bila takrat ~25 mg/L. Po dveh tednih smo ponovno izmerili porast koncentracije ogljikovih hidratov, ki mu je sledil ponovni padec koncentracije ogljikovih hidratov z najnižjo vrednostjo določeno ob koncu eksperimenta. Koncentracijo, ki smo jo izmerili ob koncu eksperimenta (po treh tednih) smo primerjali s koncentracijo, ki smo jo v enakem času določili v kontrolnem vzorcu. Končna koncentracija ogljikovih hidratov (ob koncu eksperimenta tj. po treh tednih) je bila nižja kot v kontrolnem vzorcu. Le-ta je v kontrolnem vzorcu znašala 16 mg/L, kar je 1,7 krat več kot v obdelanem vzorcu. V primeru kontrolnega vzorca nismo opazili večjih nihanj v koncentraciji ogljikovih hidratov. Koncentracija je počasi naraščala v prvih dveh tednih nato pa se ni več bistveno spreminjala (Slika 11). Iz slike 11 je razvidno bolj neenakomerno in hkrati bolj intenzivno sproščanje ogljikovih hidratov med eksperimentom v primeru encimsko obdelanega vzorca.

4. 4 SPREMEMBE KONCENTRACIJ PROTEINOV MED ENCIMSKO RAZGRADNJO Z LIPAZO

Poleg spremljanja sprememb koncentracij ogljikovih hidratov smo želeli spremljati tudi koncentracije proteinov v vzorčnih raztopinah, tj. v vodni fazi. Koncentracije smo izračunali iz vrednosti absorbanca proteinov. V času eksperimenta nismo izmerili bistvenih sprememb v koncentraciji proteinov niti v vzorčni raztopini supernatanta niti v kontrolnih vzorcih. Izmerjene vrednosti v vodni fazi so bile podobne vrednosti slepe probe, kar kaže na nizko vrednost proteinov v sluzi. O nizkih vrednostih proteinov v vzorcih poroča tudi Mohar (2006), ob uporabi različnih encimov (proteaza, proteinaza K, α -amilaza, β -glukozidaza in pankreatin).



Slika 12: Spreminjanje koncentracije proteinov v odvisnosti od časa delovanja encima lipaze v supernatantu vzorca



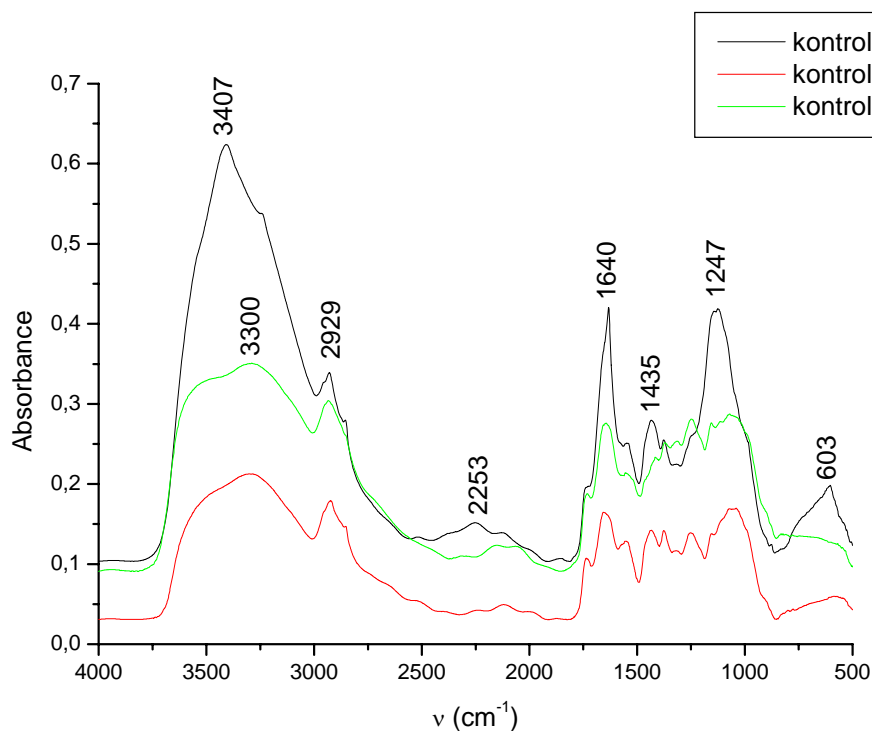
Slika 13: Spremembe koncentracij proteinov, ogljikovih hidratov in lipidov v supernatantu vzorca v eksperimentalnem časovnem obdobju treh tednov; prikaz odstotkov povišanja oziroma padca koncentracij lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov po encimskem delovanju glede na začetno vrednost le-teh

4. 4 SPEKTROSKOPSKE FTIR ANALIZE

S pomočjo spektroskopije FTIR smo analizirali sestavo sluzastih makroagregatov pred in po encimski razgradnji.

4. 4. 1 Spektri FTIR vzorca pred encimsko razgradnjo

4. 4. 1. 1 Spektri FTIR sedimenta



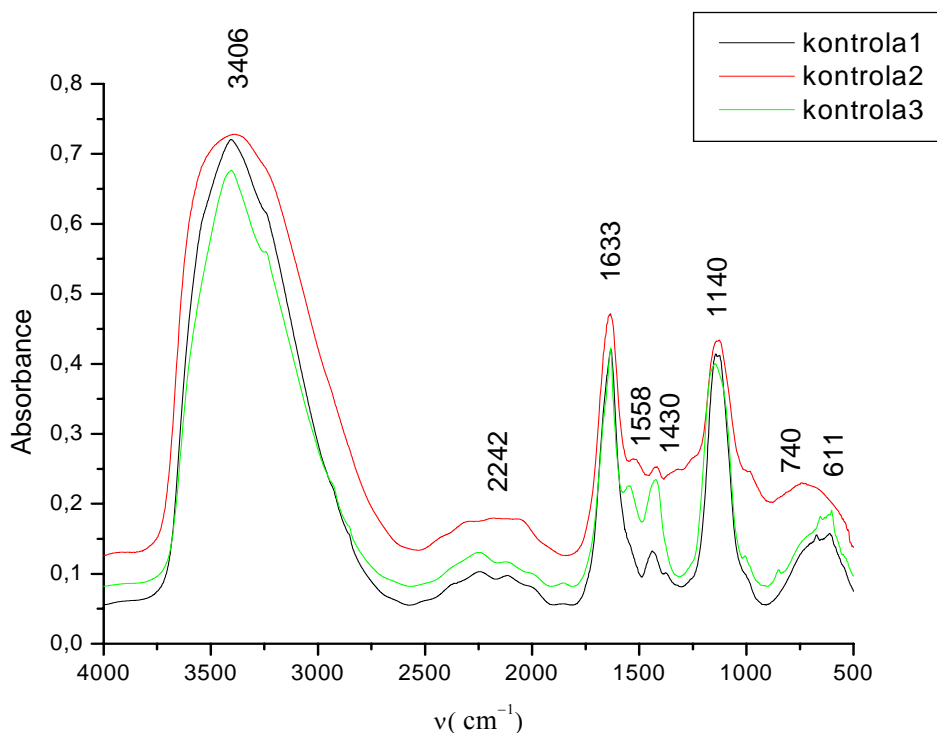
Slika 14: FT-IR spektri usedlin neobdelanega (kontrolnega) vzorca, analiziranih takoj po pričetku eksperimenta, po pripravi vzorčnih raztopin iz vode in posušenega vzorca sluzi (kontrola₁), dveh tednih (kontrola₂) in treh tednih (kontrola₃) trajanja eksperimenta

FT-IR spektri sedimenta neobdelanih (kontrolnih) vzorcev (Slika 14) kažejo spremembe osnovnega matriksa makroagregatov kot posledico naravne razgradnje vzorca. Širok trak oz. signal v območju 3600-3000 cm⁻¹ je rezultat vibracij O-H in N-H skupin. Vrhova pri 2929 in 2857 cm⁻¹ kažeta na prisotnost alifatskih C-H metilnih in metilenskih skupin. Nekoliko manjši trak pri 1737 cm⁻¹ lahko pripišemo C=O vibracijam karbonilnih skupin

karboksilnih kislin, estrov ali ketonov. Amidom (C=O vibracije; amid I) proteinske frakcije verjetno delno pripada vrh 1640 cm^{-1} , v tem območju pa se nahajajo tudi signali vode. Prav tako pa se lahko k traku okoli 1650 cm^{-1} prispevajo še aromatske in olefinske C=C skupine. Signali pri 1557 in 1539 cm^{-1} (N-C=O vibracije; amid II) so zelo majhni. Nekoliko ožji trak pri valovnem številu 1435 cm^{-1} je lahko posledica deformacijskih vibracij CH_3 in CH_2 skupin. Kot posledica C-O-C esterskih vibracij in C-O vibracij nastane trak pri 1247 cm^{-1} . Vrhovi, ki se pojavljajo v območju $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ so značilni za polisaharidne in druge C-O vezi, ter tudi za silikatne minerale in organosilicijeve spojine ($900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$). Signali okoli $\leq 600\text{ cm}^{-1}$ verjetno pripadajo vibracijam v mineralih.

Spektra kontrolnih vzorcev vzorčenih v času kontrola₂ (po dveh tednih) in kontrola₃ (po treh tednih) kažeta podobnost s spektrom kontrolnega vzorca kontrola₁ (dan pričetka eksperimenta). Vidna razlika kaže na relativni porast lipidne komponente (trakovi pri $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$). Ta rezultat kaže na porast vsebnosti snovi, ki absorbirajo pri zgoraj omenjenih valovnih številih ob vzporedni razgradnji ogljikovih hidratov in pretvorbah proteinske komponente. Razgradnja ogljikovih hidratov je razvidna iz relativnega zmanjšanja traku med 1000 in 1300 cm^{-1} . Njihovo sproščanje v vodno fazo potrjujejo tudi spektrofotometrične analize supernatanta.

4. 4. 1. 2 Spektri FTIR vodotopne frakcije



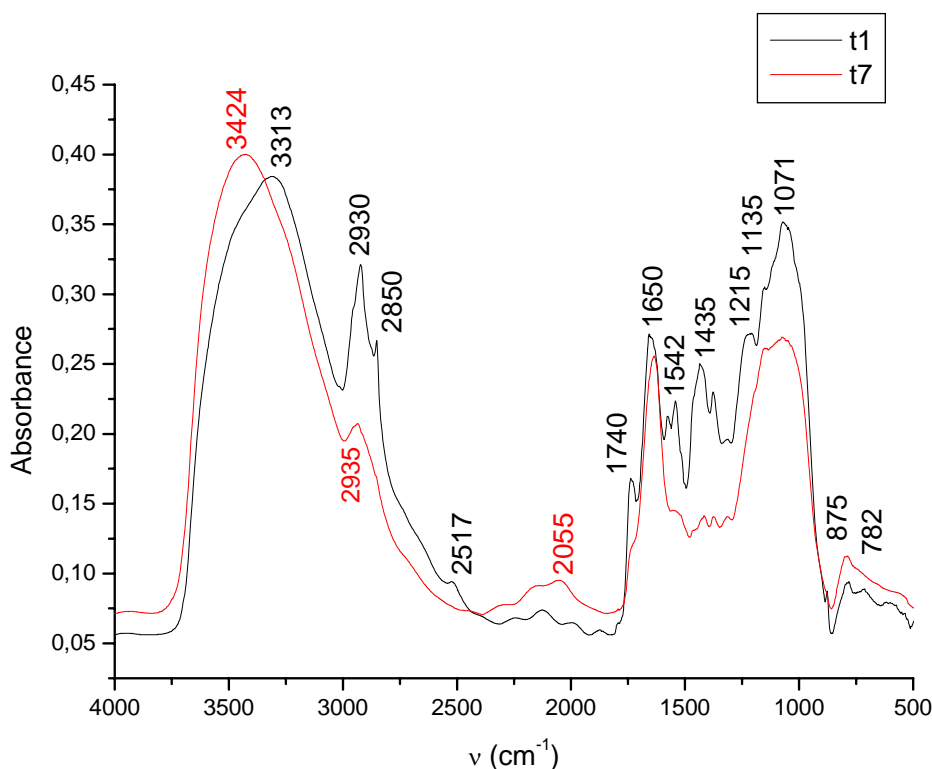
Slika 15: FT-IR spektri supernatantov neobdelanega vzorca, analiziranih takoj po pričetku eksperimenta (kontrola₁), dveh tednih (kontrola₂) in treh tednih (kontrola₃) trajanja eksperimenta

Pri FT-IR spektrih (Slika 15) supernatantov je kot v FT-IR spektrih usedlin opazen širok trak med 3600 in 3000 cm^{-1} , ki pripada vibracijam O-H in N-H skupin. V tem območju (okoli 3400 cm^{-1}) ter pri valovnem številu $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ se pojavljajo signali vode. Sicer pa bi signale pri valovnem številu 1633 cm^{-1} lahko pripisali tudi amidom (C=O vibracije; amid I) oziroma proteinski frakcije. Podobno, tudi absorpcijski vrh pri 1558 cm^{-1} je značilen za proteine (N-C=O vibracije, amid II) in je bolj izrazit v kontrol₂, kar kaže na spremembe. Glede na spektrofotometrične rezultate, tj. nizko vsebnost proteinov ter majhno spremenljivost koncentracije proteinov med eksperimentov, lahko sklepamo da k tem signalom prispeva v večji meri sama voda. Vrh pri 1430 cm^{-1} je verjetno posledica deformacijskih vibracij CH₃ in CH₂ skupin. Vrhovi, ki se pojavljajo v območju 1000-1300

cm^{-1} so značilni za polisaharidne in druge C-O vezi, ter tudi za silikatne minerale in organosilicijeve spojine ($900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$). Valovno število 740 cm^{-1} pripada H-vezem OH vibracij karboksilnih skupin. Signali pod 699 cm^{-1} verjetno pripadajo vibracijam mineralov in soli.

4. 4. 2 Spektri FTIR vzorca po encimski razgradnji

4. 4. 2. 1 Spektri FTIR sedimenta



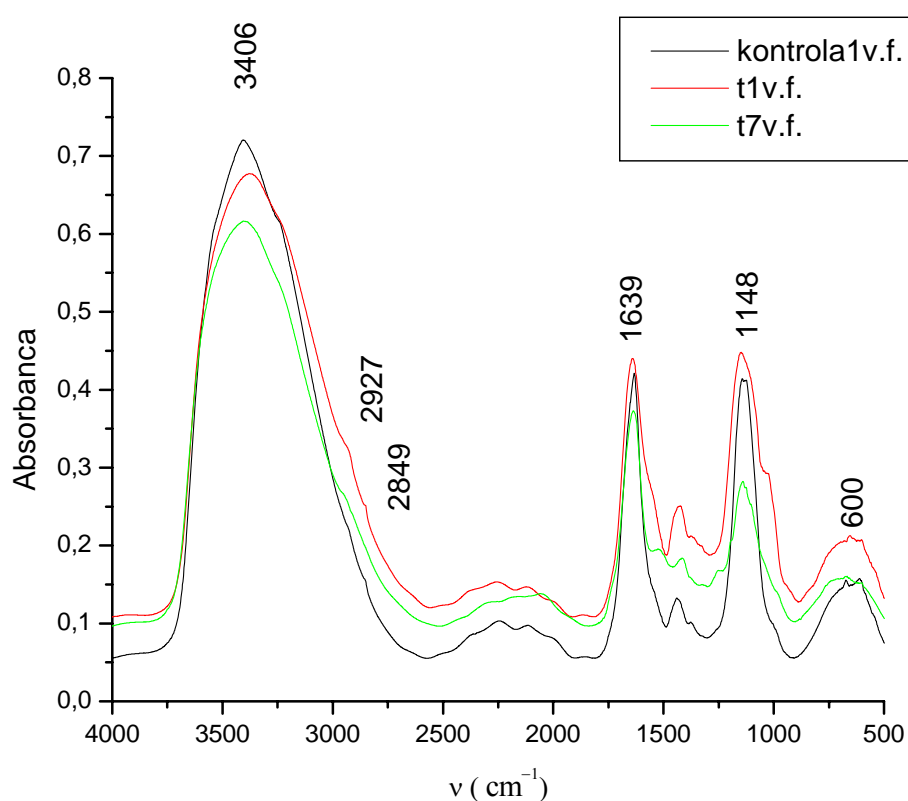
Slika 16: Spektri FTIR za sediment obdelanega vzorca z encimom za čas t_1 in t_7

Spektri sedimenta (Slika 16), vzorčenih v posameznih eksperimentalnih časih (t_1 - t_7), kažejo podobne glavne trakove (priloga B), kot smo jih določili v sedimentu neobdelanega vzorca.

V FT-IR spektrih je opazno zmanjšanje trakov pri valovnih številih 2930, 2850, 1740 in 1435 cm^{-1} , za sediment obdelanega vzorca z encimom, kažejo na razgradnjo alifatske/lipidne komponente. Spremembe so najbolj vidne na sliki 16, ki prikazuje sestavo

sedimenta takoj po dodatku encima lipaze (t_1) in po encimski razgradnji (t_7). Pri tem opazimo tudi relativno zmanjšanje trakov, značilnih za proteinsko komponento (1650 in 1542 cm^{-1}) in komponento ogljikovih hidratov (900 - 1200 cm^{-1}). Po koncu tri tedenskega poskusa (t_7) je opazno tudi zmanjšanje signalov, ki pripadajo kalcitu (2517 in 875 cm^{-1}), kar kaže na njegovo sproščanje ob razgradnji organskega matriksa.

4. 4. 2. 2 Spektri FTIR vodotopne frakcije



Slika 17: Spektri FTIR za supernatant kontrolnega vzorca kontrola₁ (takoj po mešanju sluzi in vode) ter obdelanega z encimom za čas t_1 in t_7

Spektri raztopin supernatanta vzorca sluzi, ki smo jih vzorčili in analizirali za posamezen čas (t_1 - t_7) ne kažejo bistvenih sprememb. V splošnem so podobni spektrom (v smislu glavnih trakov) kontrolnih vzorcev za raztopine supernatanta. Spektra obravnavanega vzorca, odvzetega pri prvem (t_1) in zadnjem času (t_7), kažeta relativno zmanjšanje absorpcijskih trakov v območju med 3600 - 3000 cm^{-1} , 1650 - 1600 cm^{-1} in 1160 - 1000 cm^{-1} ,

kar je verjetno posledica razgradnje ogljikovih hidratov in proteinske komponente ter drugih sestavin, ki absorbirajo pri prej omenjenih valovnih številih. Kljub temu pa spremembe niso tako vidne kot v primeru sedimenta encimsko obdelanih vzorcev.

5 RAZPRAVA

5.1 RAZGRADNJA LIPIDOV, OGLJIKOVIH HIDRATOV IN PROTEINOV V MORSKIH MAKROAGREGATIH Z LIPAZO

Razgradnja substrata v kontrolnem vzorcu (tj. v vzorcu, ki ni obdelan z encimom) ter z lipazo obdelanem vzorcu vodi do sproščanja posameznih komponent oz. sestavin organskega matriksa makroagregatov v vodno fazo (supernatant). Ključne sestavine matriksa makroagregatov, katerih prisotnost in koncentracije smo določali v vodni fazi in sedimentu so lipidi, ogljikovi hidrati in proteini.

Relativna velikost trakov v spektrih FT-IR, ki pripadajo lipidni komponenti, se je med naravno razgradnjo v sedimentu neobdelanega vzorca povečala. To kaže na ohranjenje lipidne komponente med naravno razgradnjo v času eksperimenta. V skladu s tem v FT-IR spektrih supernatanta nismo opazili večjih sprememb v relativni velikosti prej omenjenih trakov, saj se lipidi v glavnem niso sproščali v vodno fazo kontrole med poskusom.

V vzorcu obdelanem z encimom lipazo so spektrofotometrične analize pokazale, da se je v času poskusa koncentracija lipidov v vodni fazi večala. Skladno s tem se je koncentracija lipidov v sedimentu manjšala, saj so se med encimsko razgradnjo lipidne komponente sedimenta le-ti sproščali v vodno fazo. Spremembe, ki smo jih opazili v FT-IR spektrih vzorca obdelanega z lipazo so posledica tako encimske kot naravne razgradnje vzorca makroagregata. Zmanjšanje trakov pri 2930, 2850, 1740 in 1435 cm^{-1} v sedimentu obdelanega vzorca z encimom kaže na razgradnjo alifatske/lipidne komponente. To potrjuje učinkovito delovanje dodanega encima, saj razgradnje lipidne komponente nismo ugotovili pri kontrolnem vzorcu. Nekoliko manj izraziti vrhovi lipidne komponente so vidni po koncu eksperimenta, kar kaže na razgradnjo lipidne frakcije v vodni fazi, posebno še v zadnji fazi eksperimenta. Spremembe so bile tako najbolj vidne (Slika 17) v primeru encimske razgradnje sedimenta, tj. takoj po dodatku encima ter ob koncu eksperimenta. Zaradi heterogene narave vzorca, razpoložljivosti substrata za delovanje lipaze in sočasne mikrobne aktivnosti smo zaznali porast koncentracije lipidov v vodni fazi. Med encimsko

razgradnjo lipidne komponente v sedimentu pa so se v vodno fazo sproščali, poleg lipidov, tudi ogljikovi hidrati (Mohar in sod., 2007).

Porast koncentracij ogljikovih hidratov je opazen tudi iz rezultatov spektrofotometričnih analiz vodne faze (supernatanta) kontrolnega vzorca. Vzrok temu so v makroagregatu prisotne avtohtone mikrobne združbe, ki razgrajujejo matriks makroagregata, zaradi česar se v vodno fazo sprošča več ogljikovih hidratov. Izmerjene koncentracije so posledica metabolizma mikroorganizmov, ki so prisotni v makroagregatih. Mikroorganizmi so s svojimi hidroliznimi encimi sposobni razgrajevati polisaharide in hkrati porabljajo produkte, ki nastajajo po dodatku encima (Mohar, 2006). Poleg asimilacijske sposobnosti mikrobne populacije (odvisne od njihove zmožnosti produkcije potrebnih specifičnih ekstracelularnih encimov za razgradnjo polisheridov) pa k nihanju koncentracij ogljikovih hidratov lahko prispevajo še kemijske reakcije, ki potekajo med nastalimi produkti ter interakcije znotraj večjih molekul (Mohar, 2006). Najvišjo koncentracijo ogljikovih hidratov smo določili po dveh tednih (Slika 11), kar pomeni, da je bila mikrobna hidrolizna aktivnost tedaj največja. Mikrobna poraba substrata pri tem ni preseгла količine sproščenih ogljikovih hidratov zaradi mikrobne aktivnosti. Rahel padec v koncentraciji smo določili ob koncu eksperimenta. To je najverjetneje posledica zmanjšane mikrobne aktivnosti v makroagregatu, kot tudi zmanjšane »količine« substrata, ki je mikrobom na razpolago za razgradnjo. Posledično preide manj ogljikovih hidratov iz sedimenta v vodno fazo oziroma mikrobna poraba tega substrata je večja od njihovega sproščanja. Tudi iz FT-IR spektrov opazimo podoben trend, tj. relativna velikost traku, ki pripada tudi ogljikovim hidratom (med 900 in 1200 cm^{-1}) se je v sedimentu neobdelanega vzorca manjšala med eksperimentom, posledično pa se je velikost traku v spektru vodne faze nekoliko povečala. To potrjujejo tudi prej opisani rezultati spektrofotometričnih analiz.

Izrazitejša nihanja koncentracij ogljikovih hidratov smo opazili v vodni fazi vzorca po dodatku encima, kar nam še posebej pokaže primerjava med neobdelanimi in vzorci obdelanimi z encimom. Pri tem moramo upoštevati, da koncentracije spektrofotometričnih merjenih sestavin ne odražajo vedno dejansko vsebnost oz. količino sestavine, ki jo merimo. Trenutno izmerjena koncentracija je v veliki meri odvisna od kemijske sestave, strukture ter zamreženosti vzorca in s tem povezane trenutne dostopnosti substrata za

encime in nadalje aktivnih mest za vezavo barvila in tvorbe obarvanega kompleksa, ki je osnova določanja koncentracije merjene sestavine. Pri encimsko obdelanem vzorcu smo tako opazili, da količina ogljikovih hidratov sunkovito naraste takoj po dodatku encima. Iz tega lahko sklepamo, da predstavlja struktura makroagregatov na začetku eksperimenta za encim lipazo bolj razpoložljiv substrat (kvalitativno in kvantitativno) oziroma je v tem času prisotnih (na razpolago) več za razgradnjo prepoznavnih mest. Padeč, ki sledi po enem tednu delovanja encima, je najbrž posledica razgradnje lažje dostopne lipidne frakcije. Posledica tega je zmanjšanje aktivnosti samega encima oziroma aktivnih mest za razgradnjo. Po dveh tednih smo ponovno izmerili porast koncentracije ogljikovih hidratov, ki mu je sledil ponovni padeč z najnižjo vrednostjo določeno ob koncu eksperimenta, kar je verjetno posledica zmanjšane sproščanja ogljikovih hidratov v medij in sočasne mikrobne aktivnosti (porabe ogljikovih hidratov), saj se je večina ogljikovih hidratov v tem času že mikrobno razgradila in porabila. Glede na FT-IR spektre sedimenta, ki kažejo na znižanje vsebnosti ogljikovih hidratov oziroma sproščanje teh v vodno fazo, bi pričakovali relativno povečanje njihovih signalov v vodni fazi. Njihovo zmanjšanje ob koncu eksperimenta kaže na znižanje koncentracije/porabo ogljikovih hidratov zaradi razgradnje, ki verjetno poteče zaradi aktivnosti avtohtonih mikrobov prisotnih v naravnem substratu. To je razvidno tako iz spektrofotometričnih analiz, kjer se je koncentracija ogljikovih hidratov takoj po dodatku encima povečala in po treh tednih zmanjšala, kot tudi iz FT-IR spektrov (trak med $900-1200\text{ cm}^{-1}$). Koncentracija ob koncu eksperimenta je bila skoraj 2 krat nižja kot v kontrolnem vzorcu kar je verjetno posledica sočasnega poteka razgradnje ogljikovih hidratov v prisotnosti encima, in pa povečana aktivnost avtohtone mikrobne združbe v vzorcu z dodanim encimom (večja mikrobna poraba ogljikovih hidratov). Dodatni vzrok je lahko tudi heterogenost vzorca. Glede na dinamiko oziroma spremenljivost/nihanja koncentracij ogljikovih hidratov med eksperimentom pa lahko ocenimo, da se je med encimsko razgradnjo lipidne komponente (z lipazo) makroagregatov sprostilo v celoti več ogljikovih hidratov kot v primeru kontrolnih vzorcev. Ti rezultati kažejo tudi na tesne interakcije med lipidno komponento in ogljikovimi hidrati oziroma na zamreženost osnovnega matriksa makroagregatov.

V kontrolnem vzorcu smo izmerili relativno nizko koncentracijo proteinov (spektrofotometrično), ki se med poskusom ni bistveno spreminjala. Kljub temu smo v

času poskusa s pomočjo FT-IR spektroskopije opazili rahle spremembe signalov (1633, 1650 in 1542 cm^{-1}) značilnih za proteinsko komponento matriksa makroagregatov. Le-te so bile bolj izrazite v spektrih sedimenta kot pa v spektrih vodne faze. Ti rezultati nakazujejo, da encimska razgradnja z lipazo vodi do določenih sprememb same proteinske komponente makroagregatov. Razlaga teh pretvorb pa je bolj težavna kot v primeru ogljikovih hidratov, saj se v FT-IR spektrih v območju valovnih števil značilnih za proteinsko komponento nahajajo tudi signali aromatskih in drugih C=C skupin ter vode. Koncentracije proteinov v vzorcu obdelanem z lipazo, podobno kot v kontrolnem vzorcu, ne kažejo bistvenih razlik v času trajanja poskusa. Proteini so zamreženi v osnovni matriks makroagregatov, sestavljen iz lipidne, sladkorne in mineralne komponente. Ob razgradnji lipidne komponente organskega matriksa potekajo vzporedno tudi pretvorbe z njo povezanih sestavin, tj. tudi proteinske komponente. Glede na eksperimentalne rezultate lahko sklepamo, da ne gre za tesne povezave med lipidi in proteini (kot med lipidi in ogljikovimi hidrati). V nasprotnem primeru bi se ob cepitvi lipidne komponente, tj. ob sproščanju lipidov v vodno fazo, sproščali tudi proteini. Rezultati spektrofotometrične analize ter rezultati predhodnih študij sluzastih makroagregatov kažejo na majhno vsebnost proteinov, zato je lahko vzrok za majhne spremembe v proteinski komponenti relativno nizka vsebnost proteinov vzorca ter sama heterogenost vzorca.

Ob koncu poskusa smo opazili tudi zmanjšanje signalov, ki pripadajo kalcitu (2517 in 875 cm^{-1}), kar kaže na njegovo sproščanje ob razgradnji organskega matriksa. To nakazuje na povezanost organske komponente in mineralov oziroma da so mineralni delci na določen način ujeti in povezani v organski matriks, ki se lahko z njegovo razgradnjo sprostijo. Podobne rezultate, tj. prisotnost interakcij med ogljikovimi hidrati, ki so močnejše glede na povezave ogljikovih hidratov s proteinsko komponento kažejo tudi predhodne encimske razgradnje sluzastih makroagregatov (Mohar, 2006).

Z našimi rezultati smo potrdili, da je struktura (zgradba) oz. povezanost sestavin v organskem matriksu makroagregatov bistvena za dostopnost in sproščanje hidroliziranih sestavin in s tem za razgradnjo makroagregatov. Eksperiment encimske razgradnje lipidov z lipazo je potekal tri tedne (504 ure), medtem ko je eksperiment razgradnje ogljikovih hidratov z amilazo in glukozidazo (Mohar, 2006) in proteinov s pronazo in proteinazo K

(Mohar, 2006) potekal 6 ur. Zato lahko trdimo, da je encimska razgradnja lipidov z lipazo veliko počasnejši proces od razgradnje ogljikovih hidratov z amilazo in glukozidazo (Mohar, 2006) in proteinov s pronazo in proteinazo K (Mohar, 2006), kar ima velik pomen v morskem okolju. Pri tem sklepamo, da je povezava (interakcija) med lipidi in ogljikovimi hidrati v makroagregatih močnejša od interakcije med lipidi in proteini. Po vsej verjetnosti gre za glikolipide, ki predstavljajo pomembno komponento v morski organski snovi.

5.2 POMEN RAZGRADNJE LIPIDOV V MAKROAGREGATIH TRŽAŠKEGA ZALIVA

Makroagregati iz Tržaškega zaliva so v letu 2004 v povprečju vsebovali 13,5 % ogljikovih hidratov, 4,7 % proteinov in 2,2 % lipidov (Penna in sod., v pripravi). Če upoštevamo, da so z lipazo hidrolizirani lipidi razgradljivi približno 30% v obdobju po treh tednih in da razgradni produkti le-teh prehajajo v raztopino (morsko vodo), lahko sklepamo, da vsaj približno polovica lipidov sedimentira med počasno sedimentacijo v poletnem stratificiranem vodnem stolpcu. Pri tem se sproščajo in razgrajujejo tudi ogljikovi hidrati, a ne proteini. Nerazgrajeni lipidi se deponirajo v morskem sedimentu, kjer se dalje različne komponente selektivno razgrajujejo z različnimi hitrostmi. Vzrok je verjetno popolnoma drugačen spekter encimov bakterij v sedimentu (Arnosti, 2004). Tudi primerjava z razgradnjo lipidov, določeno iz spremembe kemijske sestave organske snovi med sedimentacijo v poletnem obdobju v stratificiranem vodnem stolpcu v Tržaškem zalivu ob prisotnosti makroagregatov (Posedel in Faganeli, 1991), pokaže, da se sprošča več ogljikovih hidratov in proteinov (80-85%) kot pa lipidov (74%). Povečani relativni delež lipidov (razmerja med alifatskimi komponentami in ogljikovimi hidrati) v sedimentiranih makroagregatih v Tržaškem zalivu so zasledili tudi Kovač in sod. (2004) z uporabo ¹H NMR spektroskopije.

6 SKLEPI

- Razgradnja makroagregatov z encimom lipazo je zelo počasen proces, ker je delež lipidov organskega matriksa makroagregatov relativno nizek in temu primerno je tudi število prepoznavnih mest za encim lipazo.
- Ob cepitvi lipidne komponente oziroma ob delovanju encima lipaze se sprošča bistveno več ogljikovih hidratov kot proteinov, kar nakazuje, da je povezava med lipidi in ogljikovimi hidrati v makroagregatih močnejša od povezave med lipidi in proteini. Lahko sklepamo, da gre po vsej verjetnosti za glikolipide in ne za lipoproteine. Rezultati spektroskopskih FTIR analiz z encimom lipazo so tudi pokazali, da razgradnjo organskega matriksa makroagregatov spremljajo sočasne pretvorbe oz. razgradnja/sproščanje ogljikovih hidratov in lipidov ter v manjši meri tudi proteinov. To nakazuje na različne interakcije, ki so možne med posameznimi sestavinami osnovnega matriksa makroagregatov. S pomočjo rezultatov FTIR spektroskopije smo tudi ugotovili, da obstajajo določene povezave med minerali in organskimi sestavinami makroagregatov.
- Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je organski matriks, ki predstavlja osnovno strukturo makroagregatov, sestavljen večinoma iz glikolipidov. V njem so po vsej verjetnosti prisotne različne povezave med lipidi, ogljikovimi hidrati, proteini in minerali. Struktura in povezave znotraj matriksa so verjetno pomembne za nastanek, razvoj in razgradnjo makroagregatov, kjer imajo bakterijski encimi ključno vlogo pri razgradnji kompleksne strukture makroagregatov.

7 POVZETEK

Severni Jadran in Tržaški zaliv imata specifične hidrografske in meteorološke pogoje, ki vplivajo na lastnosti vodnih mas. Velik vpliv na severni Jadran ima človek, ki s svojimi intenzivnimi posegi v okolje pospešuje eutrofikacijo rek in morja. Zato severni Jadran predstavlja idealen sistem za nastanek morskoga snega in sluzastih makroagregatov, ki se v tem delu Jadrana pojavljajo periodično v velikih količinah, različnih velikostih ter zajamejo izjemno velike morske površine. Dosedanje raziskave kažejo, da je mehanizem nastanka makroagregatov povezan z visokimi koncentracijami raztopljenih makromolekul fitoplanktonskega izvora, ki nato agregirajo. Organsko snov makroagregatov predstavljajo v največjem številu ogljikovi hidrati, nekoliko manj je lipidov in proteinov. Makroagregati predstavljajo mikrohabitat za številne populacije mikroorganizmov, ki imajo tu na voljo vse potrebne nutrinete za rast in razvoj. Makroagregati so dokaj obstojna formacija v morju. Komponente, ki sestavljajo makroagregate so zelo različne, spreminjajo se časovno in so podvržene vsem možnim zunanjim dejavnikom. Prisotnost makroagregatov v morju ima negativne posledice za turizem, marikulturo in ribištvo, zato je v zadnjem času vse več zanimanja za razumevanje njihovega nastanka, zgradbe in razgradnje. Zaradi še vedno slabega poznavanja makroagregatov je opredelitev njihove sestave, nastanka in procesov v katerih sodelujejo, težavna naloga.

Glavni namen diplomskega dela je bil študirati proces razgradnje vzorca morskih makroagregatov iz Tržaškega zaliva z encimom lipazo. Poudarek je bil na strukturnih spremembah posameznih komponent, ki so v naravi sicer predmet mikrobne razgradnje. Izvedli smo laboratorijski poskus z inkubacijo vzorca v pogojih, ki so čimbolj podobni naravnim pogojem na mestu vzorčenja. Vzorcju smo dodali določeno koncentracijo encima lipaze in v enakih časovnih intervalih spektrofotometrično določali koncentracije lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov med eksperimentom. Strukturne spremembe zaradi encimske razgradnje smo proučevali tudi s FT-IR spektroskopijo. Pri tem smo analizirali izbrani vzorec pred encimsko razgradnjo (brez encimov: celoten vzorec, sediment vzorca in supernatant vzorca) ter vzorec, ki je bil obdelan z encimom (po encimski razgradnji: sediment vzorca in supernatant vzorca). Ti rezultati kažejo strukturne spremembe

komponent v makroagregatih kot posledico encimske razgradnje, ter omogočajo vpogled v način razgradnje, ki naj bi potekala v naravi kot posledica delovanja mikroorganizmov.

Rezultati FTIR spektroskopije pred in po dodatku encima lipaze nam pokažejo sočasne pretvorbe lipidne, sladkorne in proteinske frakcije makroagregatov. To nakazuje na obstoj povezav med posameznimi organskimi sestavinami. Ob cepitvi lipidne komponente oziroma ob delovanju encima lipaze se sprošča bistveno več ogljikovih hidratov kot proteinov, kar nakazuje, da je povezava med lipidi in ogljikovimi hidrati v makroagregatih močnejša od povezave med lipidi in proteini. Pri tem lahko sklepamo, da predstavljajo glikolipidi pomembno komponento v morski organski snovi.

Rezultati eksperimenta kažejo, da je razgradnja makroagregatov mikrobno vodena. V makroagregatih je prisotna avtohtona mikrobna združba, ki aktivno hidrolizira matriks makroagregatov in porablja pri tem nastale nižjemolekularne produkte. Mikrobna aktivnost ima pomembno vlogo za pojav sluzenja morja.

8 VIRI

Allredge A.L., Cole J.J., Caron D.A. 1986. Production of heterotrophic bacteria inhibiting macroscopic marine aggregates (marine snow) from surface waters. *Limnology and Oceanography*, 31: 68-78.

Allredge A.L., Silver M.L. 1988. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Progress in Oceanography*, 20: 41-82.

Allredge A.L., Gotschalk C. 1990. The relative contribution of marine snow of different origin to biological processes in coastal waters. *Continental Shelf Research*, 10:41-58.

Allredge A.L., Passow U., Logan B.E. 1993. The abundance and significance of a class of a large, transparent organic particles in the ocean. *Deep- Sea Research*, 140: 1131-1140.

Allredge A.L., Passow U., Haddock H.D. 1998. The characteristics and transparent exopolymer particle (TEP) content of marine snow formed from thecate dinoflagellates. *Journal of Plankton Research*, 20: 393-406.

Aluwihare L.I., 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.

Arnosti C. 2004. Speed bumps and barricades in the carbon cycle: substrate structural effects on carbon cycling. *Marine Chemistry*, 92: 263-273.

Azam F., Fonda Umani S., Funari E. 1999. Significance of bacteria in the mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita*, 35: 411-419.

Azam F., Long R.A. 2001. Oceanography: sea snow microcosms. *Nature*, 414: 495-498.

Baines S.B., Pace M.L. 1991. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: patterns across marine and freshwater systems. *Marine Chemistry*, 36: 1078-1090.

Banse K. 1990. New views on the degradation and disposition of organic particles as collected by sediment traps in the ocean. *Deep- Sea Research*, 37: 1177-1195.

Barnes H., Blackstock J. 1973. Estimation of lipids in marine animal tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for »total« lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 12: 103-118.

Berger B., Hoch B., Kavka G., Herndl G.J. 1996. Bacterial colonization of suspended particles in the River Danube. *Aquatic Microbial Ecology* 10: 37-44.

Biološki parametri. 2003. Piran, Morska biološka postaja Piran.
projects.mbss.org/monitoring/Bio-Parametri.html (november 2006): 3 str.

Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

Brachvogel T., Schweitzer B., Simon M. 2001. Dynamics and bacterial colonization of microaggregates in a large mesotrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology*, 26: 23-35.

Carlson C.A., Ducklow H.W. 1995. Dissolved organic carbon in the upper ocean of the central equatorial Pacific Ocean, 1992: daily and finescale vertical variations. *Deep- Sea Research*, 42: 639-650.

Danovaro R., Armeni M., Luna G.M., Corinaldesi C., Dell Anno A., Ferrari C.R., Fiordelmondo C., Gambi C., Gismondi M., Manini E., Mecozzi M., Perrone F.M., Pusceddu A., Giani M. 2005. Exo-enzymatic activities and dissolved organic pools in relation with mucilage development in the Northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353: 189-203.

Decho A.W. 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 28: 73-153.

Degobbis D., Malej A., Fonda Umani S. 1999. The mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. A critical review of the present scientific hypotheses. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita*, 35: 373-381.

Degobbios 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.

Dell' Anno A., Fabiano M., Mei M.L., Danovaro R. 2000. Enzymatically hydrolysed protein and carbohydrate pools in deep-sea sediments: estimates of the potentially bioavailable fraction and methodological considerations. *Marine Ecology Progress Series*, 196: 15-23.

Derieux S., Fillaux J., Saliot A. 1998. Lipid class and fatty acid distributions in particulate and dissolved fractions in the north Adriatic Sea. *Organic Geochemistry*, 29: 1609-1621.

Dilling L., Alldredge A.L. 2000. Fragmentation of marine snow by swimming macrozooplankton: a new process impacting carbon cycling in the sea. *Deep- Sea Research*, 47: 1227-1245.

Dilling L., Wilson J., Steinberg D., Alldredge A.L. 1998. Feeding by the euphausiid *Euphausia pacifica* and the copepod *Calanus pacificus* on marine snow. *Marine Ecology Progress Series*, 170: 189-201.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356.

Fuhrman J.A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*; 399: 541-548.

Giani M., Berto D., Zangrado V., Casteli S., Sist P., Urbani R. 2005. Chemical characterization of different typologies of mucilaginous aggregates in the Northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353: 232-246.

Gotsis-Skretas O. 1995. Mucilage appearances in Greek waters during 1982-1994. *Science of the Total Environment*, 165: 229-230.

Graham W.M., MacIntire S., Alldredge A.L. 2000. Diel variations of marine snow concentration in surface waters and implications for particle flux in the sea. *Deep Sea Research part I – Oceanographic Research Papers*, 47:367-395.

Graneli E., Carlsson P., Turner J.T., Tester P.A., Bechemin C., Dawson R., Funari E. 1999. Effects of N:P:Si ratios and zooplankton grazing on phytoplankton communities in the northern Adriatic Sea. I. Nutrients, phytoplankton biomass, and polysaccharide production. *Aquatic Microbial Ecology*, 18: 37-54.

Graneli E., Wallstrom K., Larsson U., Graneli W., Elmgren R. 1990. Nutrient limitation of primary production in the Baltic Sea area. *Ambio*, 19: 142-151.

Griebe T. 1991. Experiments on aggregate formation. Diploma thesis. Hamburg, University of Hamburg, Institute of Hydrology and Fishery: 70 str.

Grossart H.P., Simon M. 1993. Limnetic macroscopic organic aggregates (lake snow): abundance, characteristics, and bacterial dynamics in Lake Constance. *Limnology and Oceanography*, 38: 532-546.

Grossart H.P., Simon M. 1997. Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: the significance of transparent exopolymer particles (TEP), phyto- and zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 42: 1651-1659.

Grossart H.P., Simon M. 1998. Bacterial colonization and microbial decomposition of limnetic organic aggregates (lake snow). *Aquatic Microbial Ecology*, 15: 127-140.

Grossart H.P., Ploug H. 2000. Bacterial production and growth efficiencies: direct measurements on riverine aggregates. *Limnology and Oceanography*, 45: 436-445.

Grossart H.P., Ploug H. 2001. Microbial degradation of organic carbon and nitrogen on diatom aggregates. *Limnology and Oceanography*, 46: 267-277.

Grossart H.P., Levold F., Allgaier M., Simon M., Brinkhoff T. 2005. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 7: 860-873.

Heissenberger A., Herndl G.J. 1994. Formation of high molecular weight material by free-living marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 111: 129-135.

Herndl G.J. 1988. Ecology of amorphous aggregations (marine snow)in the northern Adriatic Sea: II. Microbial density and activity in marine snow and its implication to overall pelagic processes. *Marine Ecology Progress Series*, 48: 265-275.

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.

Howarth R.W. 1988. Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19: 89-110.

Innamorati M. 1995. Hyperproduction of mucilages by micro and macro algae in the Tyrrhenian Sea. *Science of the Total Environment*, 165: 65-81.

Izvajanje monitoringa kakovosti morja, brakičnih voda in voda za življenje in rast morskih školjk in morskih polžev v letu 2004: letno poročilo. 2004. Piran, Morska biološka postaja Piran (MBP): 83 str.

Jaeger K.E., Ransac S., Koch H.B., Ferrato F., Dijkstra B.W. 1993. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters*, 332: 143-149.

Janse I., van Rijssel M., Ottema A., Gottschal J.C. 1999. Microbial breakdown of *Phaeocystis mucopolysaccharides*. *Limnology and Oceanography*. 44: 1447-1457.

Jensen L.M. 1983. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight, composition, and bacterial assimilation. *Marine Ecology Progress Series*, 11: 39-48.

Justic D. 1987. Long-term eutrophication of the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 18: 281-284.

Kaltenbock E., Herndl G.J. 1992. Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the northern Adriatic Sea. IV. Dissolved nutrients and the autotrophic community associated with marine snow. *Marine Ecology Progress Series*, 87: 147-159.

Kiorboe T., Tiselius P., Mitchell-Innes B., Hansen J.L.S., Visser A.W., Mari X. 1998. Intensive aggregate formation with low vertical flux during an upwelling-induced diatom bloom. *Limnology and Oceanography*, 43: 104-116.

Kiorboe T. 2000. Colonization of marine snow aggregates by invertebrate zooplankton: abundance, scaling and possible role. *Limnology and Oceanography*, 45: 479-484.

Kirchman D.L., Wheeler P.A. 1998. Uptake of ammonium and nitrate by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the sub-Arctic Pacific. *Deep-Sea Research*, 45: 347-365.

Knoll S., Zwisler W., Simon M. 2001. Bacterial colonization of early stages of limnetic diatom microaggregates. *Aquatic Microbial Ecology*, 25: 141-150.

Kirchman D.L. 2002. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbial Ecology*, 39: 91-100.

Kovač N. 1999. Fotokemične pretvorbe izbranih polisaharidov in modelnih substratov v vodnih medijih. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 118 str.

Kovač N., Faganeli J., Bajt O., Šket B., Orel B., Penna N. 2004. Chemical composition of macroaggregates in the northern Adriatic Sea. *Organic Geochemistry*, 35: 1095-1104.

Kovač N. 2005. Pojav sluzastih makroagregatov v severnem Jadranu. *Kemija v šoli*, 17:25-31.

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.

Kovač N., Faganeli J., Bajt O., Šket B., Šurca-Vuk A., Orel B., Mozetič P. 2006. Degradation and preservation of organic matter in marine macroaggregates. *Acta Chimica Slovenica*, 53: 81-87.

Lampitt R.S., Noji T., V Bodungen B. 1990. What happens to zooplankton fecal pellets ? *Marine Biology*, 104: 15-23.

Lampitt R.S., Wishner K.F., Turley C.M., Angel M.V. 1993. Marine snow studies in the North Atlantic Ocean: distribution, composition and role as a food source for migrating zooplankton. *Marine Biology*, 116: 689-702.

Lancelot C. 1995. The mucilage phenomenon in the continental coastal waters of North Sea. *Science of the Total Environment*, 165: 83-102.

Logan B.E., Grossart H.P., Simon M. 1994. Direct observation of phytoplankton, TEP and aggregates on polycarbonate filters using brightfield microscopy. *Journal of Plankton Research*, 16: 1811-1815.

Mague T.H., Friberg E., Hughers D.J., Morris I. 1980. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton a physiological approach. *Limnology and Oceanography*, 25: 262-279.

Malej A., Mozetič P., Malačič V., Terzič S., Ahel M. 1995. Phytoplankton responses 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*, 18: 273-288.

Manganelli M., Funari E. 2003. Le mucilagini nel Mar Adriatico: ruolo dei possibili agenti causali e dei fattori ambientali. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita*, 39: 77-95.

Marchetti R., Iacomini M., Torri G., Focher B. 1989. Caratterizzazione preliminare degli essudati di origine fitoplanctonica. raccolti in Adriatico nell'estate 1989. *Acqua Aria*, 9: 883-887.

Mohar B. 2006. Encimska razgradna morskih makroagregatov. Diplomaska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 63 str.

Mohar B., Kofol R., Kovač N., Faganeli J. 2007. Enzymatic hydrolysis of the northern Adriatic mucous macroaggregates. V: ASLO 2007 Aquatic Sciences Meeting. Water rocks! Book of abstracts. ASLO 2007 Aquatic Sciences Meeting, Santa Fe, New Mexico, February 4-9, 2007: 123-123.

www.aslo.org/santafe2007 (februar, 2007): 350 str.

Moeseneder M., Winter C., Herndl G.J. 2001. Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria in the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. *Limnology and Oceanography*, 46: 95-107.

Myklesstad S. 1977. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. 2. Influence of N/P ratio in growth medium on assimilation ratio, growth rate and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev) Cleve. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 29:161-179.

Myklesstad S., Holmhansen O., Varum KM., Volcani BE. 1989. Rates of release of extracellular amino-acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. *Journal of Plankton Research*. 11:763-773. Cit. po: Manganelli M., Funari E. 2003. Le mucilagini nel Mar Adriatico: ruolo dei possibili agenti causali e dei fattori ambientali. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 39: 77-95.

Naeem S., Hahn D.R., Schuurman G. 2000. Producer-decomposer co-dependency influences biodiversity effects. *Nature*, 403: 762.

Nagata T., Kirchman D.L. 1992. Release of macromolecular organic complexes by heterotrophic marine flagellates. *Marine Ecology Progress Series*, 83: 233-240.

Oviatt C., Doering P., Nowicki B., Reed L., Cole J., Frithsen J. 1995. An ecosystem level experiment on nutrient limitation in temperate coastal marine environments. *Ecology Progress Series*, 116: 171-179.

Parrish C.C., Abrajano T.A., Budge S.M., Helleur R.J., Hudson E.D., Pulchan K., Ramos C. 2000. Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications. *Marine Chemistry*, 5: 193-223.

Passow U., Alldredge A.L. 1994. Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 113: 185-198.

Ploug H., Grossart H.P., Azam F., Jorgensen B.B. 1999. Photosynthesis, respiration, and carbon turnover in sinking marine snow from surfacewaters of Southern California Bight: implications for the carbon cycle in the ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 179: 1-11.

Ploug H., Grossart H.P. 2000. Bacterial growth and grazing on diatom aggregates: respiratory carbon turnover as a function of aggregate size and sinking velocity. *Limnology and Oceanography*, 45: 1467-1475.

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.

Riebesell U. 1991. Particle aggregation during a diatom bloom. II. Biological aspects. *Ecology Progress Series*, 69: 281-291.

Riemann L., Steward G.F., Azam F. 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 578-587.

Ryther J.H., Dunstan W.M. 1971. Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, 171: 1008-1013.

Schweitzer B., Huber I., Amann R., Ludwig W., Simon M. 2001. α - and β - Proteobacteria control the consumption and release of amino acids in lake snow aggregates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 632-645.

Simon M. 1987. Biomass and production of small and large Free-living and attached bacteria in Lake Constance. *Limnology and Oceanography*, 32: 591-607.

Simon M., Grossart H.P., Schweitzer B., Ploug H. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*, 28: 175-211.

Smith D.C., Simon M., Alldredge A.L., Azam F. 1992. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature*, 329: 139-142.

Stoderegger K., Herndl G.J. 1998. Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 43: 877-884.

Tanoue E. 1995. Detection of dissolved protein molecules in oceanic waters. *Marine Chemistry*, 51: 239-252.

Tranvik L. 1994. Colloidal and dissolved organic matter excreted by a mixotrophic flagellate during bacterivory and autotrophy. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1884-1888.

Turk T., 2003. Vzroki in posledice cvetenja in sluzenja Jadranskega morja. Ankaran, Spletni portal Slovensko morje.

www.slovensko-morje.net/sm-staro/biologija/2.html (november 2006): 4 str.

van Rijssel M., Janse I., Noordkamp DJB., Gieskes WWC. 2000. An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. *Journal of Sea Research*, 43:297-306.

Williams PM., Gordon LI. 1970. C-13-C-12 ratios in dissolved and particulate organic matter in sea. *Deep Sea Research*, 17: 19-27.

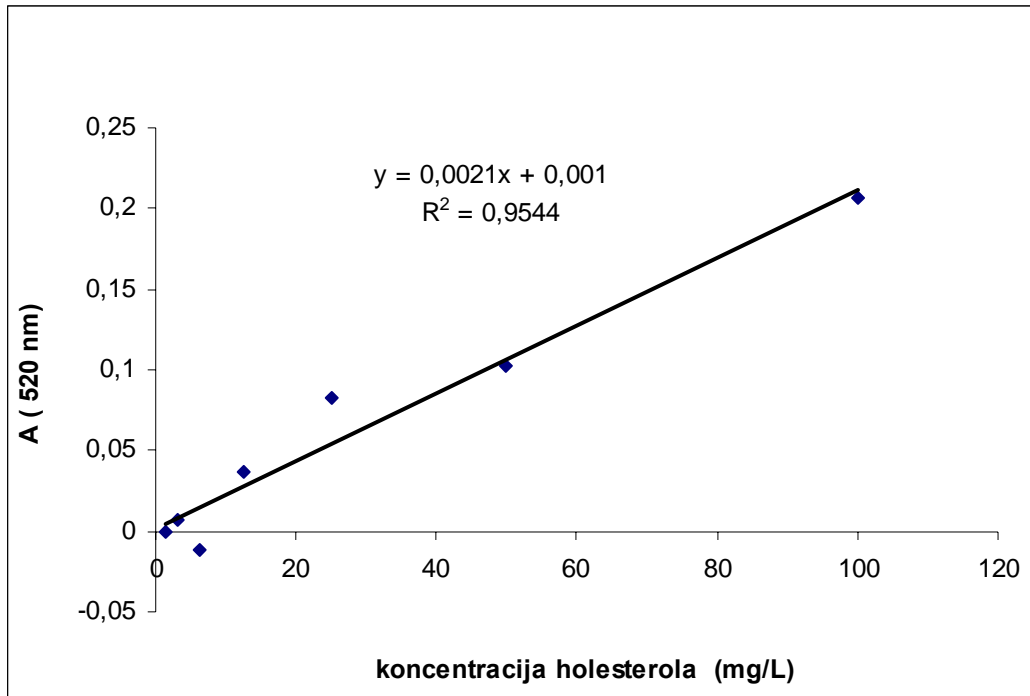
Zimmermann-Timm H., Holst H., Muller S. 1998. Seasonal dynamics of aggregates and their typical biocoenosis in the Elbe Estuary. *Estuaries*, 21: 613-621.

ZAHVALA

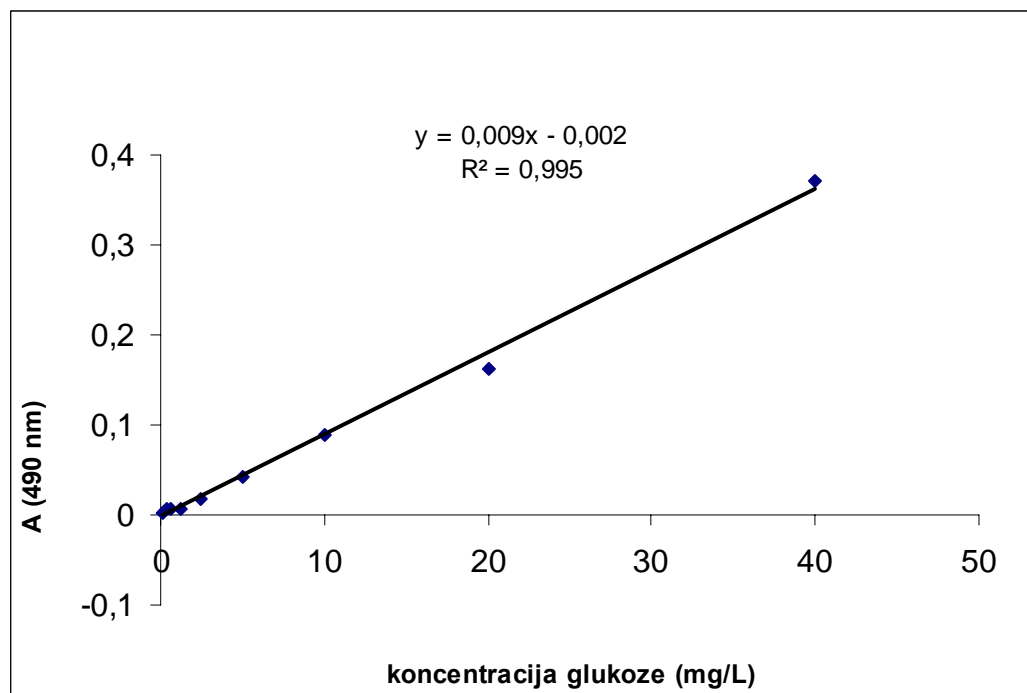
Zahvaljujem se svojim mentorjema prof. dr. Faganeliju in doc. dr. Kovač ter vsem delavcem Morske biološke postaje v Piranu, ki so mi pomagali pri mojem delu (dr. Patricija Mozetič, dr. Oliver Bajt, mag. Branko Bogunović, Silva Maslo, Mira Avčin, Tihomir Makovec, Alma Hvala, Vlado Bernetič in ostali). Posebej se še zahvaljujem recenzentki prof. dr. Mandić- Mulec in predsedniku komisije prof. dr. Stoparju, da sta si vzela čas za ta zagovor.

Največja zahvala gre mami in očetu.

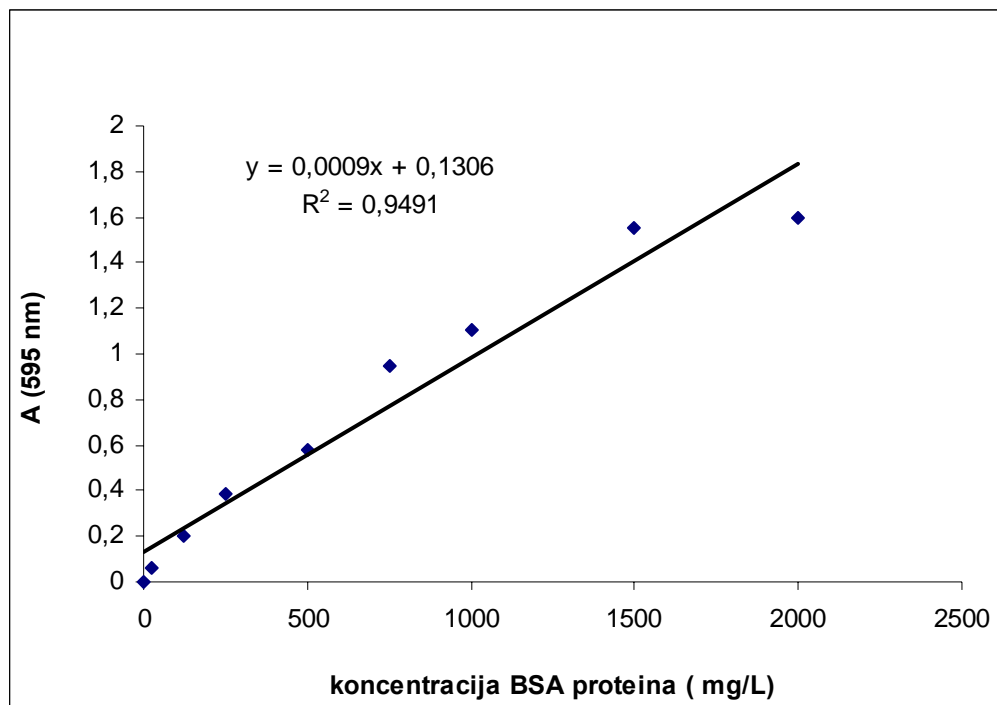
PRILOGE



Priloga A 1: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije lipidov



Priloga A 2: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije ogljikovih hidratov



Priloga A 3: Umeritvena krivulja za določanje koncentracij proteinov

Priloga B: Tabela glavnih signalov/absorpcijskih trakov določenih v FT-IR spektrih makroagregatov severnega Jadrana (Kovač in sod., 1998, 2002, 2004, 2006)

Lega absorpcijskih trakov (valovno št./cm ⁻¹)	Pripadajoče skupine/spojine
3500-3000	- OH in NH skupine
3000-2800	- alkilne skupine (-CH ₃ , -CH ₂)
1700-1700	- C=O karbonilne skupine (karboksilnih kislin, estrov, ketonov)
1630-1656	- C=O nihanja (amid I, proteini) - C=C vezi (aromati, alkeni) - signali vode
1520-1545	- N-C=O nihanja (amid II, proteini)
≈ 1430	- prečno nihanje -CH ₃ in -CH ₂ skupin - signali karbonata
≈ 1240-1250	- C-O signali etrov in karboksilnih kislin
900-1200	- polisaharidi, - silikati
≈ 1080, ≈ 1030, 800, 777, 472	- silikati
≈ 2520, 1796, 1430, 876, 713	- karbonati
778, 799 (780, 800)	- SiO ₂ (absorpcijski vrhovi tudi pri ≈ 1162, 1072 – 1080, 462 in 512 cm ⁻¹)
< 700cm ⁻¹	- signali vode - signali soli