

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Arne BRATKIČ

**SEZONSKA NIHANJA DUŠIKOVIH ZVRSTI IN DENITRIFIKACIJA V
BLEJSKEM JEZERU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SEASONAL VARIATIONS OF NITROGEN SPECIES AND
DENITRIFICATION IN LAKE BLED**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Odseku za znanosti o okolju Instituta »Jožef Stefan« v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Jadrana Faganelija, za somentorico doc. dr. Nives Ogrinc in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Mentor: prof. dr. Jadran Faganeli

Somentorica: doc. dr. Nives Ogrinc

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

Članica: doc. dr. Nives Ogrinc
Institut »Jožef Stefan«, Odsek za znanosti o okolju

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Spodaj podpisani se strinjam z objavo diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da sta elektronska in tiskana oblika diplomske naloge enaki.

Arne Bratkič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 502.51(285):579.266.2(043) = 163.6
KG sladke vode/jezerske vode/Blejsko jezero/dušik/kroženje dušika/mikrobne pretvorbe/stabilni izotopi/vodni stolpec/denitrifikacija
AV BRATKIČ, Arne
SA FAGANELI, Jadran (mentor)/OGRINC, Nives (somentorica)/MANDIČ-MULEC, Ines (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2009
IN SEZONSKA NIHANJA DUŠIKOVIH ZVRSTI IN DENITRIFIKACIJA V BLEJSKEGEM JEZERU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 49 str., 4 pregl., 23 sl., 8 pril., 85 vir.
IJ sl
JI sl/an
AI S pomočjo kemijskih in izotopskih meritev smo raziskali kroženje dušika in procese denitrifikacije v vodnem stolpcu evtrofnega, dimiktičnega Blejskega jezera v jeseni in zimi 2008. Vsebnost $^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ in $^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ se je povečevala z globino v vseh mesecih vzorčenja. $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ in $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ vrednosti izključujejo nitrat kot glavni vir dušika v suspendirani snovi zaradi njegove nizke izotopske sestave. Izkazalo se je, da predstavlja amonij glavno asimilacijsko obliko dušika. Povezava med izotopsko sestavo nitrata in njegovo koncentracijo kažejo na to, da je nitrat v jezeru najverjetneje rezultat razgrajevanja organske snovi. Vsaj v času vzorčevanja na izbrani točki ni bilo vidnih vplivov komunalnih odplak ali kmetovanja na bilanco dušika v Blejskem jezeru. Postopen porast vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ ter še posebno visoke vrednosti na meji oksično-anoksično na globini 24 m kažejo na aktivno denitrifikacijo v oktobru. V oktobru smo opazili povišanje koncentracije NO_3^- na globini termokline. Skupaj z nizko $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ vrednostjo sledi, da je nad termoklino prisotna zelo aktivna aerobna mikrobna združba. Pozimi denitrifikacija ni potekala, a je bila razlika v $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ vrednostih med površjem (8 ‰) in dnem (-2 ‰) največja. Vodni stolpec je bil takrat dobro premešan, koncentracija nitrata se je z globino spreminjala le malo in mikrobna aktivnost je bila nizka. Iz C/N razmerij ter $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ in $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ vrednosti suspendirane organske snovi sledi, da je le-ta v času vzorčevanja avtohtonega izvora. Vrednosti 0,8 ‰ in 1,8 ‰ za $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ ter -35,6 ‰ in -36,6 ‰ za $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ so pokazatelji precejšnje bakterijske populacije na globini 28 m in 24 m v mesecu avgustu in septembru, ki jo kasneje prekrije večji vnos odmrle avtohtone organske snovi. Porazdelitev fosforjevih zvrsti nakazuje, da je v Blejskem jezeru fosfor limitni dejavnik, ki uravnava primarno produkcijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 502.51(285):579.266.2(043) = 163.6
CX fresh waters/lake waters/Lake Bled/nitrogen/nitrogen cycling/microbial transformations/stable isotopes/water column/denitrification
AU BRATKIČ, Arne
AA FAGANELI, Jadran (supervisor)/OGRINC, Nives (co-advisor)/MANDIĆ-MULEC, Ines (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI SEASONAL VARIATIONS OF NITROGEN SPECIES AND DENITRIFICATION IN LAKE BLED
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 49 p., 4 tab., 23 fig., 8 ann., 85 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In order to investigate nitrogen cycling and denitrification processes in the water column of eutrophic, dimictic Lake Bled in autumn and winter 2008, different chemical and isotopic analyses were applied. Contents of $^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ and $^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ decreased with depth in all sampling periods. $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ values exclude nitrate as the main source of nitrogen in particulate matter due to their low isotopic composition. Instead, ammonium appeared to be the main assimilation species of nitrogen. The correlation between nitrate isotopic composition and its concentration implies that its source is most likely degradation of organic matter. During our sampling period at this location there were no evident influences of sewage or agriculture on the nitrogen balance in the lake. The gradual increase of $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ and especially the high values at the oxic-anoxic interface at depth 24 m correlate with the active denitrification in October. In this month, an increase in NO_3^- concentration at the thermocline was observed. Along with low $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ values, an active aerobic microbial community above the thermocline was expected. In wintertime there was no denitrification; however, the difference in $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ values between surface (8 ‰) and bottom (-2 ‰) waters was the highest. The water column was well mixed at that time, the nitrate concentration exhibited little variation, and microbial activity was low. C/N ratios, $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ values of particulate organic matter suggest its autochthonic origin. Values of 0.8 ‰ and 1.8 ‰ for $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ and -35.6 ‰ and -36.6 ‰ for $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ were indicative of an active bacterial community at the depth of 28 m and 24 m in August and September; that signal was later masked by sedimenting autochthonous organic matter. The distribution of phosphorus species suggests that phosphorus controls the primary production in Lake Bled.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VI
	KAZALO SLIK	VII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
	SLOVARČEK	XI
1	UVOD	1
1.1	Hipoteze in cilji diplomskega dela	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	Pregled kroženja dušika v jezerskem okolju z objavami	3
2.2	Povezava med ogljikom in dušikom v vodnem okolju	6
2.3	Izotopska frakcionacija pri kroženju dušika in ogljika	7
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	Oris področja raziskave	13
3.2	Vzorčenje	14
3.3	Meritve v vodnem stolpcu	15
3.4	Določanje izotopske sestave dušika in ogljika v suspendirani snovi ($\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$)	15
3.4.1	Priprava vzorcev za določanje izotopske sestave dušika v nitratu ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$)	15
3.4.2	Priprava vzorcev za določanje izotopske sestave dušika v amoniju ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NH}_4^+}$)	17
3.5	Modelni inkubacijski poskus	20
3.6	Meritve stabilnih izotopov na masnem spektrometru	21
3.7	Določanje izotopske sestave raztopljenega anorganskega ogljika ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$)	21
3.8	Določanje alkalnosti (Titracija po Granu)	21
3.9	Določanje hranil	22
3.10	Določanje suspendiranega organskega ogljika in totalnega dušika	22
4	REZULTATI	23
4.1	Osnovni fizikalni in kemijski parametri v vodnem stolpcu	23
4.2	Dušikove zvrsti in $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$:	24
4.2.1	Fosforjeve zvrsti ter razmerja nekaterih dušikovih in fosforjevih zvrsti:	27
4.3	Suspendirana organska snov in razmerje C/N	29
4.4	Alkalnost in $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$	31
5	RAZPRAVA	34
5.1	Spremembe fizikalnih in kemijskih parametrov v vodnem stolpcu	34
5.2	Kroženje in izvor dušika v Blejskem jezeru	34
5.3	Izvori suspendirane organske snovi v Blejskem jezeru	38
5.4	Vloga fosforja	40
6	SKLEPI	41
7	POVZETEK	42
8	VIRI	44
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Rezultati spiranja raztopin z znano izotopsko sestavo s kationskih in anionskih izmenjevalcev	21
Pregl. 2:	Rezultati meritev $\delta^{15}\text{N}$ po sežigu praznega anionskega izmenjevalca	22
Pregl. 3:	Rezultati meritev prvega poskusa z zeolitom. Za primerjavo je podana tudi kapaciteta suhega kationskega izmenjevalca	23
Pregl. 4:	Rezultati meritev izvedenih pri drugem poskusu z uporabo zeolita (Ostrom in sod., 1998)	24

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Shematski prikaz kroženja dušika v jezeru. Z belo barvo označena <i>amo</i> ter <i>nir</i> sta simbola za encima amonij monooksigenazo ter nitritno reduktazo (Francis, 2009).	3
Sl. 2:	Porazdelitev ¹⁵ N v sladkovodnih in estuarijskih okoljih. (Owens, 1987: 410) ter izotopske frakcionacije v mikrobnih pretvorbah dušika (Canfield, 2005: 265)	11
Sl. 3:	Pogled na Blejski otok z obrežja. (fotografija: Ana Flašker)	13
Sl. 4:	Vzorčevalno mesto pred Blejskim otokom. Označeni so tudi pritoki jezera: Mišca, Solznik ter umetno napeljana struga Radovne. Na južni strani jezera odteka Jezernica	14
Sl. 5:	Temperatura, pH in koncentracija kisika po globini vodnega stolpca Blejskega jezera v avgustu 2008 (Sodja, osebni vir)	23
Sl. 6:	Primerjava temperaturnih profilov Blejskega jezera po mesecih. Avgusta in oktobra je lepo vidna termoklina	24
Sl. 7:	Spreminjanje izotopske sestave nitrata po vodnem stolpcu Blejskega jezera v septembru, oktobru in decembru 2008	24
Sl. 8:	Spreminjanje koncentracije nitrata po vodnem stolpcu Blejskega jezera v septembru, oktobru in decembru 2008	26
Sl. 9:	Spreminjanje koncentracije amonija po vodnem stolpcu Blejskega jezera v septembru, oktobru in decembru 2008	26
Sl. 10:	Spreminjanje koncentracije DON po vodnem stolpcu Blejskega jezera v septembru, oktobru in decembru 2008	26

- Sl. 11: Nihanja koncentracij fosfata po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih. Decembra je koncentracija trikrat višja kot v ostalih dveh mesecih, vendar pa so tudi nihanje zelo močno. Na globini 16 m je opazen nenaden porast koncentracije v septembru takoj pod termoklino 27
- Sl. 12: Spreminjanje koncentracije celotnega raztopljenega fosforja po globini vodnega stolpca Blejskega jezera. Septembra se v anoksičnem delu hipolimnija močno poviša in preseže tudi decembrsko vrednost 28
- Sl. 13: Spreminjanje koncentracij DOP po globini vodnega stolpca Blejskega jezera v mesecih vzorčenja 28
- Sl. 14: Gibanje različnih fosforjevih zvrsti v decembru 2008. Viden je hiter preskok med relativnimi deleži fosfata in DOP na globini 14 m 29
- Sl. 15: Spreminjanje C/N razmerja po vodnem stolpcu Blejskega jezera v mesecu oktobru in decembru 2008 30
- Sl. 16: Spreminjanje izotopske sestave ogljika v suspendirani snovi po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih 31
- Sl. 17: Spreminjanje izotopske sestave dušika v suspendirani snovi po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih 31
- Sl. 18: Spreminjanje alkalnosti po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih 32
- Sl. 19: Spreminjanje $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih 33
- Sl. 20: $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ v odvisnosti od alkalnosti v vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih 33
- Sl. 21: $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ v odvisnosti od $\ln[\text{NH}_4^+]$ septembra in oktobra 2008. Naklon premice predstavlja obogatitveni faktor ϵ 37

Sl. 22:	$\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ vrednosti v odvisnosti od koncentracije NO_3^- oktobra 2008	38
Sl. 23:	Grafični prikaz izvora suspendirane organske snovi v Blejskem jezeru	39

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- ^{12}C lažji ogljikov izotop
- ^{13}C težji ogljikov izotop
- ^{14}N lažji dušikov izotop
- ^{15}N težji dušikov izotop
- C** kemijska oznaka za element ogljik; uporabljena v besedilu zajema vse oblike ogljika, razen če ni drugače določeno
- C/N** oznaka atomskega razmerja med ogljikom in dušikom v neki snovi
- DIC** okrajšava za raztopljeni anorganski ogljik; angl.: dissolved inorganic carbon
- DIN** okrajšava za raztopljeni anorganski dušik; angl.: dissolved inorganic nitrogen
- DON** okrajšava za raztopljeni organski dušik; angl.: dissolved organic nitrogen
- DOP** okrajšava za raztopljeni organski fosfor; angl.: dissolved organic phosphorus
- MS** okrajšava za masni spektrometer
- N** kemijska oznaka za element dušik; uporabljena v besedilu zajema vse oblike dušika, r r razen če ni drugače določeno
- PN** okrajšava za suspendirani dušik; angl.: particulate nitrogen
- POC** okrajšava za suspendirani organski ogljik; angl.: particulate organic carbon
- POM** okrajšava za suspendirano organsko snov; angl.: particulate organic matter
- TDN** okrajšava za celotni raztopljeni dušik; angl.: total dissolved nitrogen
- TDP** okrajšava za celotni raztopljeni fosfor; angl.: total dissolved phosphorus
- α** grška črka alfa označuje faktor izotopske frakcionacije za neko kemijsko reakcijo
- δ** grška črka delta označuje razmerje med težjim in lažjim izotopom elementa v spojini. Izražamo jo v promilih.
- ϵ** grška črka epsilon označuje obogatitveni faktor v δ vrednostih med reaktantom in produktom

SLOVARČEK

celokupna alkalnost	je definirana kot vsota koncentracij vseh baz, ki lahko sprejemajo protone ogljikove kisline; v jezerih je pogosto približno enaka karbonatni alkalnosti, ki zajema prispevek HCO_3^- in CO_3^{2-}
ekvivalentna točka	kemijske reakcije se zgodi med titracijo, ko je količina dodajane snovi enaka količini analita v raztopini
frakcionacija	je posledica izotopskega efekta. Kaže se v različni porazdelitvi težjega in lažjega izotopa nekega elementa
izotopski efekt	je pojav, ko ima med kemijsko reakcijo ali fizikalnim pojavom en izotop tekom procesa prednost pred drugim
masni spektrometer	naprava s katero merimo vsebnost in razmerja med lažjimi in težjimi izotopi določenega elementa v neki snovi
oligo (ev-) trofen	opis stanja hranil v nekem ekosistemu. Predpona oligo- pomeni, da je hranil malo, ev-, da jih je obilo
Redfieldovo razmerje	je atomsko razmerje med C:N:P v fitoplanktonu. Ime nosi po ameriškem oceanografu Alfredu C. Redfieldu, ki je izmeril vzorce fitoplanktona iz vsega sveta in odkril, da ima konstantno vrednost C:N:P = 106:16:1
RuBisCO	okrajšava za encim ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaza, ki katalizira prvi korak v Calvin-Bensonovem ciklu med procesom fiksacije CO_2

1 UVOD

Bled, njegov grad in jezero imajo že več kot tisočletno zapisano zgodovino. Arheologi so na otoku našli ostanke bivališč celo iz mlajše kamene dobe, kasneje pa tudi razvaline staroslovanskega svetišča posvečenega Živi, boginji življenja in plodnosti. Takrat seveda Bled še ni bil znana turistična destinacija in jezero ni bilo obremenjeno s človeškim vplivom. Do tega je prišlo v drugi polovici devetnajstega stoletja, ko je švicarski naturopat Arnold Rikli tu začel z zdraviliškim turizmom. Bled je zaradi svojega milega podnebja postal močno priljubljen predvsem pri premožnejšem in aristokratskem sloju. Sloves mondenega letovišča se je poznal pri naglem turističnem razvoju in gradnji hotelov; med drugim je prvi na področju današnje Slovenije dobil asfaltirane ceste, zelo hitro pa tudi električno in vodovod (Bled, 2009).

Povečan vnos organskega materiala s kanalizacijo pri nespremenjenem zadrževalnem času jezerske vode je pomenil začetek evtrofikacije jezera. Tekom let se je prebivalstvo v naseljih ob jezeru povečevalo, območje je postajalo bolj aktivno tudi v poljedelstvu. Gnojila so se spirala z deževnico v jezero, kar pomeni obremenitev okolja predvsem z viri dušika v obliki nitrata in amonija, ki lahko za nekajkrat presega naravne pretoke tega elementa. Alge ali cianobakterije so ugodne razmere in veliko hranilnih snovi izkoristile in ena vrsta je lahko prerasla vse druge – prihajalo je do neželjenih cvetenj. V takih primerih so se porušile fizikalno-kemijske razmere v jezeru, kar se je poznalo tudi na sestavi in številčnosti jezerske flore, favne in mikrobnih populacij. Poleg omenjenih neprijetnosti predstavljata nitrat in amonij še dodatno nevarnost za živali, predvsem ribe. Nitrat lahko v višjih koncentracijah povzroča methemoglobinemijo (akutno stanje, ko je večji del hemoglobina oksidiran in ne more prenašati kisika), amonij pa raztaplja membrane celic v škrgah rib.

Kljub izdatnim študijam na kroženju ogljika (Ogrinc in sod., 1997; Lojen in sod., 1999; Ogrinc in sod., 2002;) je o dušiku kot limitnem faktorju rasti v tem sistemu le malo znanega (Lojen in sod., 1997; Čermelj in Faganeli, 2003). Njegovo kroženje definirajo tako razmere v okolju kot tudi mikroba aktivnost in pestrost. Anorgansko vezanega dušika je v okolju največ, nekaj se ga nahaja v organizmih v obliki aminokislin, dušikovih baz v nukleinskih kislinah, redkeje pa v substituiranih maščobnih kislinah. Dušik prihaja *de novo* v okolje pri vulkanskih izbruhih ali postane na razpolago organizmu pri raztapljanju nekaterih vrst soli (Na, K, Ca, Mg in NH_4^+ -nitrati). Kemijske pretvorbe dušika so v primerjavi z biološkimi resda lahko hitrejše (npr. fotooksidacija v atmosferi), vendar je njihov obseg za nekaj razredov manjši.

Trije biološki procesi so bistveni pri kroženju dušika; fiksacija, nitrifikacija in denitrifikacija. Pri prvem procesu se atmosferski dušik veže v organsko obliko in se tako delež slednje povečuje. Nitrifikacija je oksidacija reduciranih dušikovih spojin do nitrata kar mikroorganizmi izkoriščajo kot vir energije in poteka v aerobnem okolju. Nitrat je končni produkt, ki ga denitrifikacija vrača v atmosfersko obliko (N_2) in poteka v anaerobnem okolju, saj nitrat služi kot akceptor elektronov, ko zmanjka kisika. Vsi trije procesi potekajo v kopenskih in vodnih ekosistemih ter so gonilna sila recikliranja dušika. Ne smemo pozabiti, da se omenjene dušikove pretvorbe dogajajo le in samo, če je na voljo dovolj energije in vir

ogljika. Obe kroženji sta povezani, pri čemer je dušikov cikel v večini primerov odvisen od ogljikovega.

Pri bioloških pretvorbah prihaja do frakcionacije kar pomeni, da organizmi rajši metabolizirajo lažje izotope, težje pa le v primeru, ko je hranil malo (tedaj se tudi običajno porabi ves substrat in ni opaznega izotopskega efekta). To lahko sledimo z analizami stabilnih izotopov ter iz izotopskih vrednosti in koncentracij različnih dušikovih zvrsti sklepamo na prisotnost in obseg procesov.

V pričujoči diplomski nalogi smo se osredotočili na pretvorbe dušika v vodnem stolpcu Blejskega jezera ter še posebej na denitrifikacijski potencial. Anoksičnost spodnjih plasti omogoča potek denitrifikacije, ki je sicer značilna in tudi precej bolj obsežna v sedimentu. To je edini način zmanjševanja vsebnosti mineralnega dušika v jezeru, kar pripomore k zniževanju evtrofikacije.

1.1 Hipoteze in cilji diplomskega dela

Evtrofna narava Blejskega jezera je precej problematična z okoljskega vidika, saj so cvetenja alg in cianobakterij pogosta. V zadnjem obdobju je bilo opravljenih precej raziskav na področju kroženja ogljika (Lojen in sod., 1997; Čermelj in Faganeli, 2003), medtem ko problematika dušika še ni bila samostojno obravnavana. Če se njegova koncentracija v okolju poveča, lahko pride do hitre rasti tako pro- kot evkariontskih avtotrofov, ki ima za okolje in ljudi negativne posledice. Zato je pomembno poznati izvor(e) dušika v vodi, da lahko tako stanje izboljšamo.

V tem diplomskem delu smo se osredotočili na:

- spremljanje koncentracije nitrata, amonija in organskega dušika, ter merjenje njihove izotopske sestave $\delta^{15}\text{N}$, da bi določili izvor dušika v suspendirani snovi in nitratu. Predpostavljamo, da lahko dušik v jezero pride s spiranjem iz kopnega, s slabo urejeno kanalizacijo naselja Bled ali z razpadom organske snovi. Vsi naštetih viri imajo svojo značilno izotopsko sestavo,
- identifikacijo najaktivnejših mikrobnih procesov v vzorčevalnem obdobju,
- ugotavljanje, kdaj in kje poteka denitrifikacija v vodnem stolpcu.

Pričakujemo, da bo denitrifikacija najbolj aktivna, ko je jezero tudi najbolj stratificirano (poletje-jesen) in pride v spodnjih plasteh do pomanjkanja kisika. Takrat bo tudi koncentracija amonija tam najvišja. V zgornjih plasteh bo višja koncentracija nitrata. Ko se jezero premeša, naj bi se hitrost denitrifikacije zmanjšala, v jezeru pa bi zasledili enakomerno porazdelitev dušikovih zvrsti po vodnem stolpcu.

Izotopska sestava dušikovih spojin naj bi pokazala na izvor dušika v jezeru. Najbolj verjetno je, da izvira dušik predvsem iz kanalizacijskih izpustov, ki se nato sprošča z razpadom organske snovi, manjši pa je vpliv kmetijstva. Če bi lahko ugotovili izvor dušika in če bi bil ta posledica človeškega delovanja, bi lahko ustrezno ukrepali ter zmanjšali vnos dušika v jezero.

vir novega dušika predstavlja izliv rek, usedanje atmosferskih delcev, spiranje z obale ali vnos detrita. Umetni (človeški) proces fiksacije (Haber-Boschov proces, odkrit leta 1913) je po svojem obsegu primerljiv morski fiksaciji (Canfield in sod., 2005).

Glavni biološki procesi v kroženju dušika v vodnih okoljih so: fiksacija, asimilacija, amonifikacija, imobilizacija, nitrifikacija (nitritacija in nitratacija skupaj) ter denitrifikacija. Mineralizacija dušika vključuje nastajanje biološko razpoložljivih anorganskih oblik dušika in sproščanje le-teh v okolje. Vsi omenjeni procesi so shematsko prikazani na sliki 1, potekajo v sladkovodnem okolju in jih lahko zasledujemo z uporabo stabilnih izotopov.

Nebiološki procesi v kroženju dušika tudi obstajajo, vendar so v primerjavi z biološkimi globalno manjšega pomena (in obsega), lokalno pa imajo lahko velik vpliv na okolje. Večinoma se ti procesi nanašajo na fizikalne pretvorbe. Med njimi velja izpostaviti izhlapevanje amonijaka, adsorpcijo amonija na mineralne delce ter pronicanje nitrata. Med kemične pretvorbe spadajo tudi fotooksidacija dvoatomnega dušika v atmosferi in oksidacija pri udarih strel med nevihtami (Galloway in Cowling, 2002). V jezerih sta edina pomembnejša anorganska procesa izhlapevanje amonijaka in raztapljanje dušika v vodi (Talbot, 2001).

Fiksacija – Sposobnost pretvarjanja atmosferskega dušika v amonij imajo le nekateri mikroorganizmi. Imenujemo jih diazotrofi. Najdemo jih zgolj v domenah Bacteria in Archea. Skupen jim je encimski kompleks nitrogenaza, ki je odgovoren za redukcijo N_2 . Sestavljen je iz dinitrogenaze in dinitrogenazne reduktaze s Fe, Mo ali V atomi v aktivnem centru (Postgate, 1998; Lehmann, 2002; Canfield in sod., 2005; Buick, 2007). Čeprav velja, da v sladkovodnem okolju fiksacija ne poteka v večjem obsegu, dobi pomembno vlogo v razmerah, ko postanejo primarni viri dušika (nitrati, amonij) limitni (Lehmann, 2002; Lehmann in sod., 2004; Hadas in sod., 2009). Mikrobno fiksacijo dušika vršijo mnogi organizmi: cianobakterije, metanogene arheje, predstavniki rodov *Azotobacter*, *Clostridium* in *Rhizobium* (Buick, 2007) ter fitoplanktonske alge (Lehmann in sod., 2004). Pomen vezave dušika je različen: v oligotrofnih okoljih je pomembnejši kot v evtrofnih, saj predstavlja aktiven vnos dušika v ekosistem.

Amonifikacija – Pri tem procesu se v porno vodo ali vodni stolpec sprošča amonij kot posledica heterotrofne razgradnje (Lehmann, 2002; Canfield in sod., 2005). Ta poteka v več stopnjah, v prisotnosti in odsotnosti kisika (Canfield in sod., 2005; Buick, 2007). Amonifikacijo vršijo v glavnem heterotrofne bakterije rodov *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium* ter aktinomycete (Canfield in sod., 2005). Usoda nastalega amonija je močno odvisna tudi od C/N razmerja organske snovi, ki se razgrajuje. Načeloma velja pravilo, da se pri razgradnji snovi z nižjimi C/N razmerji (5-10) več amonija sprosti (mobilizira) v okolico, saj je celičnim potrebam po dušiku hitro zadoščeno – to imenujemo tudi neto amonifikacija.

Asimilacija – Je postopek vključevanja anorganskih oblik dušika (NH_3 , NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-) v celično biomaso (Lehmann, 2002). Bakterije primarno asimilirajo amonij, fitoplankton nitrati (Lehmann in sod., 2004; Hadas in sod., 2009). Zehr in Ward (2002) ter Hoch in sod. (1992) ugotavljajo, da lahko tako bakterije kot fitoplankton asimilirajo obe vrsti dušika, možna pa je tudi asimilacija organskih oblik dušika (npr. uree).

V primeru privzema N lahko v jezerskem okolju ločimo dve skupini primarnih producentov; tiste, ki lažje asimilirajo NH_4^+ , NO_3^- in NO_2^- ter fiksatorje dušika kot so cianobakterije. Ker je fiksacija dušika energetsko zahteven proces, pride do kompeticije cianobakterij s

fitoplanktonom kot so diatomeje in zelene alge. V primeru, ko so koncentracije nitrata in amonija nizke, in je na voljo dovolj ostalih nutrientov (v glavnem raztopljenega fosforja in železa), pride do cvetenja fiksatorjev dušika. Razlikovanje med dvema skupinama primarnih producentov je pomembna predvsem iz vidika uporabe stabilnih izotopov pri preučevanju kroženja dušika v jezeru. Pri asimilaciji dušika pride v vsaki skupini do različnega privzema dušikovih izotopov in posledično do različne izotopske sestave fitoplanktona (Waser in sod., 1998)

Imobilizacija – Pod tem pojmom združujemo vse procese, ki odstranjujejo biološko razpoložljivi dušik (največkrat raztopljeni anorganski dušik (DIN; angl. dissolved inorganic nitrogen)) iz sistema tako, da se veže v/na organizme ali nežive delce. Imobiliziran dušik lahko spet postane na razpolago organizmom v relativno kratkem času. Glavna mehanizma sta asimilacija ter adsorpcija. Izhlepevanje, spiranje in denitrifikacija ne spadajo med imobilizacijske procese. Če ni izrecno poudarjeno, pod tem pojmom razumemo biološko imobilizacijo, ki je privzem omenjenih oblik dušika v celico, s čimer do odmrtja organizma niso več na razpolago (izvzeto je izločanje odpadnih celičnih produktov – sekrecija).

Nitrifikacija – Je dvostopenjski proces oksidacije amonija najprej do nitrita, nato še do nitrata (Lehmann, 2002). Različne bakterije in arheje (Francis in sod., 2005; Leininger in sod., 2006) vršijo oba procesa, med njimi izstopa rod *Nitrosomonas* za prvo stopnjo in rod *Nitrobacter* za drugo stopnjo (Buick, 2007). Vsi so striktni aerobi, čeprav so pred časom predlagali anaerobno oksidacijo amonija z manganovim dioksidom (Luther in sod., 1997), ki je kasneje niso mogli potrditi (Thamdrup in Dalsgaard, 2000). Poznamo avtotrofno in heterotrofno nitrifikacijo. Pri prvi dobijo organizmi energijo za fiksacijo CO₂ v Calvin – Bensonovem ciklu (Canfield in sod., 2005). Na nitrifikacijo v jezeru vplivajo pH, temperatura, koncentracija hranil ter koncentracija kisika (Lehmann, 2002; Canfield in sod., 2005). Praviloma velja (čeprav ni vedno tako), da je optimalen pH nevtralen do rahlo alkalen, temperatura med 25 in 35 °C, koncentracija kisika pa ne manjša od 1 – 6 μmol/l (Jones in Morita, 1985; Henriksen in Kemp, 1988; Canfield in sod., 2005). V evtrofnih jezerih lahko naravno nitrifikacijo zakrijejo vnosi alohtonega nitrata, kar otežuje interpretacijo rezultatov (Lehmann, 2002).

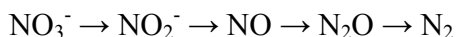
Nitratna amonifikacija ali disimilatorna redukcija nitrata do amonija (DNRA) – Je anaeroben proces in lahko poteka hkrati z respiratorno denitrifikacijo in anamoksom. Za prevlado DNRA so potrebne visoke koncentracije organskega materiala in nizke koncentracije nitrata (Tiedje, 1994; Bonin in sod., 1998; Canfield in sod., 2005). DNRA je pogosta v sedimentih, redkeje poteka v vodnem stolpcu ali v tleh. Pogosta je tudi v vampu goveda in čistilnih napravah (Tiedje, 1994). S tem procesom organizmi zmanjšujejo predvsem koncentracijo nitrita, ki je za celice strupen, vendar dušika za razliko od ostalih dveh procesov ne odstranjuje iz okolja. DNRA bakterije spadajo v rodove *Bacillus*, *Pseudomonas* in *Neisseria* (Tiedje, 1994; Canfield in sod., 2005).

Anamoks – To je kratica za »anaerobic ammonia oxidation« (ang. anammox), oziroma anaerobno oksidacijo amonija z nitritom. Danes še vedno ne poznamo dobro metabolnih procesov, ki sodelujejo v anamoksu, zaenkrat pa velja teorija encimske redukcije v treh stopnjah: nitrit v hidrosilamin (NH₂OH), ta v hidrazin (N₂H₄) in slednji v N₂ (Verstraete in Philips, 1998; Khin in Annachhatre, 2004). Zaradi strupenosti hidrazina naj bi imeli mikrobi znotrajcelični kompartment imenovan anamoksosom, kjer bi lahko reakcije potekale brez

nevarnosti za celico. (Niftrik in sod., 2004). Anamoks je aktiven le pri izjemno nizkih koncentracijah kisika, ki ga reverzibilno inhibira. V ugodnih razmerah (še posebej v združbi z nitritatorji) odstrani dvakrat več dušika kot respiratorna denitrifikacija (Zehr in Ward, 2002; Canfield in sod., 2005). Bakterije, ki vodijo ta proces, spadajo med kemolitoavtotrofe. Vse sodijo v red *Planctomycetales*. Dve drugi vrsti, za kateri so dokazali sposobnost anamoksa, sta *Brocadia anammoxidans* in *Kuenenia stuttgartiensis* (Khin in Annachhatre, 2004; Canfield in sod., 2005).

Aerobna denitrifikacija – Je proces redukcije nitrata in nitrita do N_2 pri atmosferski koncentraciji kisika. Encimski mehanizem ni poznan. Prvič so jo opisali na primeru *Paracoccus panthotrophus*, ki je hkrati tudi heterotrofni nitrifikator (procesa sta verjetno povezana). Kasneje so jo opisali še pri *Pseudomonas stutzeri*, ki ima boljši izkoristek in večjo toleranco na kisik kot *P. panthotrophus* (Zehr in Ward, 2002).

Respiratorna redukcija nitrata ali „prava denitrifikacija“ – Gre za disimilatorni proces, pri katerem se nitrat reducira do plinastih produktov, največkrat N_2 . Nitrat služi kot akceptor elektronov, katerih donorji so lahko organske molekule, vodik, sulfid, žveplo in metan (Modin in sod., 2007). Do denitrifikacije pride, ko mikrobom zmanjka kisika za oksigeno razgradnjo, saj nitrat ponuja drugi najboljši izplen energije – razlika v redoks potencialih je večja od ostalih anaerobnih akceptorjev elektronov. Bistvena razlika med ostalimi nitratskimi redukcijami je ta, da pri respiratorni redukciji mikrobi sproščeno energijo uporabljajo za rast (Tiedje, 1994) Smatrajo, da je denitrifikacija glavni ponor dušika v vseh ekosistemih (Canfield in sod., 2005). Biokemija denitrifikacije je dobro poznana. V procesu sodelujeta dva membranska in dva periplazemska encima, elektronska transportna veriga teče po celični membrani. Glavni koraki denitrifikacije so prikazani spodaj (Madigan in Martinko, 2006):



S pravo denitrifikacijo se zaključi biogeokemijski cikel dušika. V evtrofnih jezerih predstavlja glavni (in pogosto tudi edini) način odstranjevanja dušika (Lehmann, 2002).

Večina denitrifikatorjev je fakultativnih anaerobov, bodisi kemolito- ali kemoorganotrofov. Danes poznamo več kot 130 denitrifikatorskih vrst, razporejenih po vsaj 50 rodovih (Zumft in Körner, 1997), tudi med arhejami (*Halobacterium*) in glivami (*Fusarium*). Najpogosteje omenjena in tudi najbolj raziskana predstavnik sta eubakteriji *Pseudomonas stutzeri* in *Paracoccus denitrificans*.

2.2 Povezava med ogljikom in dušikom v vodnem okolju

C je najpomembnejši biogeni element, katerega kroženje je tesno prepleteno s kroženji ostalih biogenih elementov. S kisikom je povezano prek procesa fotosinteze, z dušikom pa predvsem pri procesih razgradnje. Organski ogljik in organski dušik sta tesno povezana; obstaja zveza med razmerjem C:N v organskem substratu, C:N v bakterijskih celicah in učinkovitostjo vgrajevanja C v celice. C je v organski obliki vezan v živi in odmrli biomasi, anorgansko pa predvsem v oblikah CO_2 (atmosfera), H_2CO_3 , v vodnem okolju pa so značilne naslednje zvrsti: raztopljeni CO_2 ($CO_{2(aq)}$), bikarbonatni ion (HCO_3^-) in karbonatni ion (CO_3^{2-}). Le majhen del vsega ogljika je udeležen pri biogeokemijskem kroženju. Večina je trajno deponiranega v zemeljski skorji kot $CaCO_3$ (ostanki skeletov morskih organizmov), precej pa ga je

raztopljenega v oceanih. Z naraščanjem koncentracije CO₂ v oceanih in jezerih (ki so že prenasočena z njim v oksičnem delu vodnega stolpca) se povečujeta kislost ter zvočna prevodnost, hkrati pa se manjša vsebnost kisika, kar pomeni močan stres predvsem za vodne živali (Brewer in Peltzer, 2009). Biološko neaktivne oblike ogljika so poliaromska, grafitna, diamantna ter fullerenska. Imenujemo jih črni ogljik (ang. black carbon) (Faganeli, 1999)

Ogljik se iz vseh ekosistemov izgublja s celičnim dihanjem v obliki CO₂, v taisti obliki ga kopenske rastline asimilirajo, v oceanih pa ga avtotrofi privzemajo prvenstveno v hidrogenkarbonatni obliki. Zato je verjetno najpomembnejši biološki proces njegova fiksacija med potekom fotosinteze (primarna produkcija). Nastali ogljik je reduciran in ima določen energijski potencial, kar kasneje drugi organizmi izkoristijo za pridobivanje energije, ki poganja kroženje vseh elementov (Madigan in Martinko, 2006). To je pomembno zaradi dejstva, da je ekosistem termodinamsko odprt sistem in bi ob prenehanju neprestanega vnosa novega, reduciranega ogljika lahko dosegel ravnotežno stanje. Preprosto povedano to pomeni smrt živih bitij (Faganeli, 1999).

Razlika med fiksacijo (bruto primarna produkcija) in respiracijo nam da podatek o neto produkciji ekosistema. Če je le-ta močno pozitivna, se nerazgrajen organski ogljik v njem nabira. Primer so sedimenti pod vodnimi masami z veliko primarno produkcijo, kjer se organski material ne oksidira popolnoma med posedanjem. V takih sedimentih so razmere ponavadi anoksične in razgradnja organskega materiala poteka počasneje kot v oksičnih razmerah. Ko se porabijo bolj energetsko ugodni prejemniki elektronov (NO₃⁻; Mn⁴⁺; Fe³⁺; SO₄⁻), se začne metanogeneza, ki je končni proces razgradnje organskega ogljika. Glede na vir elektronov ločimo hidrogenotrofno (H₂) in acetoklastično (CH₃COOH) metanogenezo. Pri slednji se metilni del molekule reducira do CH₄, karboksilni pa oksidira do CO₂ (Madigan in Martinko, 2006). Ta vrsta metanogeneze naj bi tudi prevladovala v sladkovodnih okoljih, omejena pa je na dva arhejska rodova: *Methanosarcina* in *Methanosaeta*. Hidrogenotrofna metanogeneza naj bi bila bolj razširjena v morskem okolju, sposobnost pa je razširjena po mnogih arhejskih rodovih, od katerih so bolj poznani *Methanobacterium*, *Methanococcus* ter *Methanomicrobium* (Faganeli, 1999). Metanogenezo vršijo le arheje, zaenkrat ni znan noben bakterijski predstavnik (Madigan in Martinko, 2006).

Iz anoksičnega okolja metanogeneze se nastali plin pomika po sedimentu navzgor dokler ne difundira v nadsloječi vodni stolpec. Na meji med oksično in anoksično cono živijo metanotrofi, striktno aerobne bakterije, ki oksidirajo metan (Liikanen in Martikainen, 2003). Primeri bakterijskih rodov sta *Methylomonas* in *Methylobacter*. Tako se večina metana oksidira, še preden uide v ozračje (kjer se kemično oksidira). Večji izvori metana so sedimenti, kjer metanogeneza intenzivneje poteka. Metanotrofi sicer spadajo v skupino bakterij, ki oksidirajo spojine z metilno skupino – metilotrofi.

2.3 Izotopska frakcionacija pri kroženju dušika in ogljika

Izotopi so atomi istega elementa, ki imajo enako vrstno število, a različno masno število, torej se razlikujejo po številu nevtronov v jedru. V naravi je najpogostejši najlažji stabilni izotop. Prav zaradi svoje stabilnosti predstavljajo stabilni izotopi lahkih elementov H, C, N, O in S

pomembno sledilo pri študiju biogenih prvin v okolju. Te prvine so najpomembnejše v biološkem sistemu in poleg tega sodelujejo v večini geokemijskih in mikrobnih reakcijah.

Izotopsko sestavo oziroma razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini izražamo z vrednostjo delta (δ). Ta predstavlja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st), in jo izražamo v promilih (‰):

$$\delta^{15}N (\delta^{13}C) (\text{‰}) = \left(\frac{R_{vz} - R_{st}}{R_{st}} \right) \times 1000 \quad \dots (1)$$

pri čemer je R_{vz} ($^{15}N/^{14}N$, $^{13}C/^{12}C$) razmerje težkega proti lahkemu izotopu v vzorcu in R_{st} razmerje težkega proti lahkemu izotopu v standardu. δ -vrednost vsakega standarda je definirana z vrednostjo 0 ‰. Pozitivne vrednosti pomenijo, da vsebuje vzorec več težkega izotopa kot standard, negativne pa, da ga vsebuje manj. Arbitrarno določena in sprejeta primarna referenca za izotopske analize dušika je zračni dušik (N_2), ki ima pojavnost težkega in lahkega izotopa $0,3663 \pm 0,0004$ atomskega odstotka ^{15}N in $99,6337 \pm 0,0004$ atomskega odstotka ^{14}N . Primarna referenca za ogljik je fosil zunanega skeleta prednika glavonožcev *Belemnite americana* iz krednega obdobja (PeeDee Belemnite, PDB), ki jo najdemo v Združenih državah Amerike v Južni Karolini. Ker je fosilnih ostankov premalo za splošno uporabo, so postavili kot enakovredno referenco umetno izdelan karbonat VPDB (Vienna PeeDee Belemnite) z vrednostjo $R_{st} = 0,0112372$.

Naravne vsebnosti so v principu konstantne in so določene z nastankom elementov. Vendar so v naravi opazna določena nihanja v vrednosti razmerij zaradi takoimenovane izotopske frakcionacije. Razlog, da se frakcionacija zgodi, je izotopski efekt. Le-ta je lahko kinetični ali termodinamski.

Termodinamski efekt predstavlja ravnotežje med kinetičnima efektoma kemijskega ravnotežja in je v splošnem manjši kot posamezni kinetični efekt. Odraža se predvsem v fizikalnih lastnostih, kot so parni tlak, vrelišče, tališče ipd. in pride do veljave, kadar imamo opravka s snovnim prenosom med dvema fazama (difuzija, izparevanje, kristalizacija ipd.). Tako termodinamski efekt kot tudi nekateri kinetični so odvisni od temperature (Farquhar in sod. 1989).

Kinetični izotopski efekt je posledica različnih vibracijskih nivojev vezi, v katerih so udeleženi težji izotopi. Pri procesih, kjer gre za cepitev vezi, se vpletenost molekule s težjim izotopom odraža v kinetiki same reakcije, zato je eden izmed produktov favoriziran (bodisi tisti z lažjim bodisi tisti s težjim izotopom). To dejstvo pride še zlasti do izraza v različnih biokemijskih reakcijah v naravi.

V primeru ravnotežnih reakcij med posameznimi fazami izražamo izotopske efekte s faktorjem izotopske frakcionacije, α . Pri ravnotežni reakciji, $aA \leftrightarrow bB$, (kjer sta A in B različni spojini) je α podan z naslednjo enačbo:

$$\alpha_{(A-B)} = \frac{R_A}{R_B} \quad \dots (2)$$

kjer R_A označuje razmerje težkega proti lažjemu izotopu v molekuli ali fazi A (reaktantu) R_B pa razmerje istih izotopov v molekuli ali fazi B (produktov). Ta nam pove, kako se je spremenila

izotopska sestava reaktanta (A) in produkta (B), oziroma kakšna je stopnja frakcionacije med reakcijo. Zaradi lažje primerjave se namesto frakcionacijskega faktorja uporablja obogatitveni faktor ε , ki podaja razliko med reaktantom in produktom z δ -vrednostmi. Obogatitveni faktor je s frakcionacijskim faktorjem povezan z naslednjima relacijama in se podaja v ‰:

$$\varepsilon_{(A-B)} = (\alpha_{(A-B)} - 1) \times 1000 \quad \dots (3)$$

$$\varepsilon_{(A-B)} \cong \delta_A - \delta_B \quad \dots (4)$$

V mnogih primerih reaktanti ne ostajajo v sistemu, temveč iz njega sproti izstopajo. V tem primeru ne pride do uravnoveženja reaktantov in produktov, pač pa se njihova izotopska sestava tekom reakcije spreminja. V primeru, kjer se delež reaktanta premosorazmerno zmanjšuje z nastajanjem produkta, lahko napovemo kakšna bo izotopska sestava reaktanta (in s tem tudi produkta) v kateremkoli času reakcije, če poznamo njen frakcionacijski faktor, α . Obogatitev reaktanta sledi pravilu Rayleighove enačbe destilacije:

$$R_t = R_0 \times f^{(\alpha-1)} \quad \dots (5)$$

kjer R_t pomeni izotopsko razmerje reaktanta po času t , R_0 izotopsko razmerje reaktanta na začetku reakcije ($t=0$), f je delež preostalega reaktanta in α frakcionacijski faktor. Bolj uporabljena oblika enačbe (5) vključuje δ -vrednosti, ki jo zapišemo v naslednji obliki:

$$\delta \cong \delta_0 + \varepsilon \times \ln(f) \quad \dots (6)$$

kjer δ_0 izotopsko sestavo reaktanta na začetku reakcije, ε pa je obogatitveni factor. Enačba velja za sisteme, kjer je $\delta_0 \geq 0$ in $\varepsilon < +10\%$.

Poudariti je potrebno, da so v naravi take reakcije redke in da istočasno potekajo druge reakcije, ki bodisi tekmujejo za isti substrat bodisi ga generirajo ali pa porabljajo nastali produkt in s tem vnašajo stohiometrično nesorazmerje (Owens, 1987; Canfield in sod., 2005). V hipotetičnem primeru, da bi taka reakcija lahko vseeno nemoteno potekla do konca in bi se ves reaktant pretvoril v produkt, frakcionacija ne bi več bila opazna. Taki primeri so predvsem v oligotrofnih vodah, kjer primanjkuje določenega substrata in ga mikroorganizmi vsega metabolizirajo (Owens, 1987).

Sprva so uporabljali izotopsko frakcionacijo za sledenje mikrobnih procesov na primeru ogljika. Izotopske spremembe so zelo očitne in hkrati tudi bolj enoznačne kot pri dušiku (Owens, 1987). Zaradi tesne povezanosti obeh kroženj se glavne frakcionacije dogajajo pri podobnih ali istih procesih kar lahko izkoristimo za potrjevanje ali zavračanje hipotez, za iskanje izvora organske snovi ter za identifikacijo raziskovanega procesa (Owens, 1987). Raziskave so pokazale, da na izotopsko sestavo fitoplanktona vplivajo prepustnost membrane, temperatura in količina svetlobe, predvsem pa različne poti asimilacije (Laws in sod., 1995; Popp in sod., 1998)

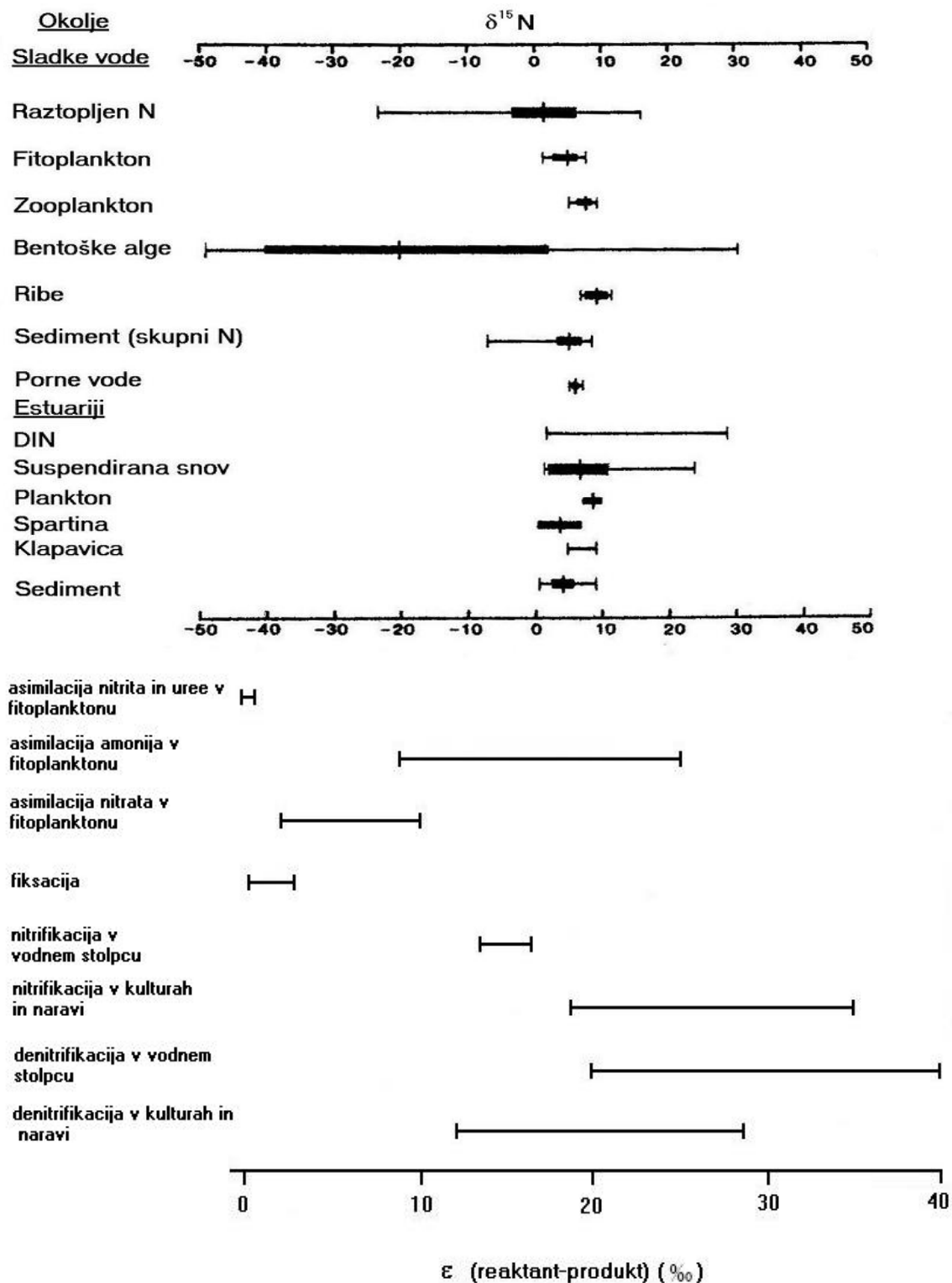
Velik frakcionacijski faktor spremlja fotosintezo (Wong in sod., 1975). Pri rastlinah s C_3 ciklom, med katere spada tudi jezerski fitoplankton, ima encim RuBisCO (ribuloza 1,5-bifosfat karboskilaza), ki asimilira CO_2 iz atmosfere ali raztopljenega v vodi, obogatitveni faktor 20 ‰. Vrednost CO_2 v atmosferi je -7 ‰, torej znaša končna izotopska sestava

fitoplanktona okoli -27 ‰. V primeru, ko je fotosintetska aktivnost tako velika, da nastopi pomanjkanje raztopljenega CO₂ (Meyers in Teranes, 2001) in fitoplankton asimilira hidrogen karbonatni ion (HCO₃⁻), ki ima v jezeru δ¹³C vrednosti med -8 ‰ in -11 ‰, v morju pa +1 ‰, se to pozna na izotopski sestavi fitoplanktona. Zato je tudi razpon δ¹³C vrednosti v fitoplanktonu večji v jezerskih okoljih in se giblje med -38 in -16 ‰ v primerjavi z morjem, kjer se vrednosti gibljejo med -24 in -16 ‰ (del Giorgio in France, 1996). Tudi alohtona organska snov, ki pride v jezerski ekosistem, ima lahko raznolike δ¹³C vrednosti, saj je na kopnem več rastlin s C₄ ciklom, ki ne uporablja encima RuBisCO, temveč fosfoenolpiruvat karboksilazo (δ¹³C vrednosti so pri teh med -8 ‰ in -18 ‰) (Kukovec, 2006), obstajajo pa tudi tako imenovane CAM rastline, ki združujejo oba cikla ter imajo δ vrednosti med C₃ in C₄ (Meyers in Teranes, 2001). Na izotopsko sestavo organske snovi naj neposredno ne bi vplivalo ravnotežje (obarjanje in raztapljanje) CaCO₃, saj so le-ti procesi v ravnotežju z izotopsko sestavo raztopljenega CO₂. Ko organska snov sedimentira na dno jezera, se njena izotopska sestava še dalje spreminja med potekom diagenoze. Čeprav spremembe potekajo počasneje, se obogati s ¹³C v razponu med 1 ‰ in 4 ‰ (Meyers in Teranes, 2001; Ogrinc in sod., 2005).

Pri procesu metanogeneze prihaja do največjih frakcionacij. Obe vrsti, hidrogenotrofna in acetatna, močno preferirata ¹²C in potekata le v sedimentu. Pri acetatni fermentaciji nastaja metan z δ¹³C vrednostmi med -60 ‰ in -30 ‰, pri hidrogenotrofni pa med -110 ‰ ter -60 ‰. Na Bledu so ugotovili (Lojen in sod., 1999), da je prvi način odgovoren za 65 % vsega nastalega metana spomladi, drugi pa za več kot 90 % jeseni. Metan iz sedimenta počasi difundira proti meji anoksično-oksikčno, kjer se spremenijo razmere iz reduktivnih v oksidativne (Whiticar in Faber, 1986). Na tej meji najdemo metanotrofe, ki metan oksidirajo. Večina metana se oksidira preden pride prek celotnega vodnega stolpca na mejo voda-zrak, kar zmanjšuje prispevek k izpustom toplogrednih plinov (Whiticar in Faber, 1986). Nastali CO₂ lahko ostane tudi raztopljen v vodi in je s tem na voljo fotosintetskim organizmom. Tudi mikrobn oksidacija metana spreminja izotopsko sestavo reaktanta in produkta. Whiticar in Faber (1986) poročata o obogatitvenem faktorju ε_(CH₄-CO₂) = 5 ‰ – 20 ‰. Tovrstno recikliranje organske snovi je potrebno upoštevati pri interpretaciji mikrobnih procesov in spremljajočih izotopskih vrednostih.

Tudi z uporabo stabilnih izotopov dušika je možno ločiti izvor nitrata, ki se spira v jezero. Spojine oziroma raztopljene dušikove zvrsti, ki so antropogenega izvora, so obogatene s ¹⁵N kot rezultati čiščenja odpadnih vod in visokega trofičnega statusa človeka. Nitrat, ki prihaja v jezero preko kanalizacije ima δ¹⁵N vrednosti med 10 in 20 ‰ in se znatno razlikuje od izotopske sestave nitrata, ki se spira v jezero iz naravnih tal, in ima δ¹⁵N vrednosti med 2 in 8 ‰. V jezeru je nitrat nadalje izpostavljen različnim procesom, ki vplivajo na kroženje dušika v jezerskem okolju in posledično na izotopsko frakcionacijo.

Za mikrobn procese v kroženju dušika je že dolgo znano, da ustvarjajo znatne frakcionacije. Razpon frakcionacij za posamezen proces se sicer med okolji razlikuje, vendar lahko načeloma po izotopski sestavi izvornega substrata in končnega produkta ugotovimo za kateri proces gre. V sladkovodnih ekosistemih je narejenih sicer manj študij, kot v morskih ali kopenskih, a je kljub temu nekaj že znanega. Porazdelitev δ¹⁵N vrednosti v sladkovodnih okoljih ter nekaj frakcionacijskih faktorjev je shematsko prikazanih na sliki 2.



Slika 2: Porazdelitev ^{15}N v sladkovodnih in estuarijskih okoljih. (Owens, 1987: 410) ter izotopske frakcionacije v mikrobni pretvorbi dušika (Canfield, 2005: 265)

Fiksacija dušika v jezerskih okoljih nima velike frakcionacije. Diazotrofi fiksirajo atmosferski dušik z $\delta^{15}\text{N} = 0 \text{ ‰}$. Največ raziskav je bilo narejenih na cianobakteriji *Trichodesmium*. Wada in Hattori (1976), Carpenter in sod. (1997) ter Montoya in sod. (2002) poročajo o $\epsilon_{(\text{N}_2\text{-biomasa})} = 0,5 \text{ ‰} - 2,0 \text{ ‰}$ za naravne vzorce. Izotopska vrednost za *Trichodesmium* niha med -1 ‰ in -2 ‰ (Carpenter in sod., 1997), kar je upoštevanja vredna razlika med atmosferskim dušikom. Razlika pri fiksaciji je opazna zlasti na kopnem, kjer imajo v istem območju rastline v simbiozi s fiksatorji znatno nižje izotopske vrednosti dušika biomase kot tiste, ki ne živijo v simbiozi (Owens, 1987).

Asimilacija izraža večje frakcionacije. Obogatitveni faktor za privzem nitrata med njim in biomaso je med 3 ‰ in 10 ‰ (Montoya in McCarthy, 1995; Waser in sod., 1998) po drugih podatkih (Fogel in Cifuentes, 1993) pa med 1 ‰ in 5 ‰ . Nitrat, ki ostane v epilimniju jezera je praviloma obogaten s ^{15}N in se njegova izotopska sestava giblje med 5 ‰ in 10 ‰ (Carpenter in sod., 1997). Meyers in Teranes (2001) poročata o vrednostih med 7 ‰ in 10 ‰ . Tudi pri asimilaciji amonija se kaže izotopski efekt, za katerega so pokazali pozitivno korelacijo med koncentracijo amonija in frakcionacijo (Pennock in sod., 1996; Waser in sod., 1998). Fogel in Cifuentes (1993) sta izračunala obogatitveni faktor 10 ‰ . Frakcionacija asimilacije je močno odvisna od drugih procesov, ki hkrati tečejo v vodnem stolpcu jezera. Denitrifikacija ustvarja rezervoar obogatene nitrata, različne vrednosti pa so odvisne tudi od vrstne sestave mikrobiološke združbe. Razgradnja fitoplanktona, ki je dušik prvenstveno dobil s fiksacijo, nitrat vsekakor osiromaši s ^{15}N , razgradnja heterotrofov in organizmov višjih trofičnih nivojev pa ga obogati, saj se ^{15}N po prehranjevalni verigi akumulira (Fogel in Cifuentes, 1993). Skupaj z amonifikacijo v anaerobnih razmerah ne prihaja do opaznejše frakcionacije (Lehmann in sod., 2004; Buick, 2007).

Nitrifikacijo prav tako spremlja velika frakcionacija. Več podatkov je za estuarije, kjer poročajo o obogatitvenem faktorju $\epsilon_{(\text{NH}_4\text{-NO}_3)} = 24 \text{ ‰} - 27 \text{ ‰}$ (Owens, 1987). Drugi raziskovalci (Canfield in sod., 2005) navajajo vrednosti med 18 ‰ in 36 ‰ .

Od vseh mikrobnih procesov dušikovega kroženja ima verjetno denitrifikacija najbolj očitno frakcionacijo. V vodnem stolpcu je $\epsilon_{(\text{NO}_3\text{-N}_2)} = 20 \text{ ‰} - 40 \text{ ‰}$ (Owens, 1987), podobne vrednosti pa držijo tudi za izolirane čiste kulture (Canfield in sod., 2005). Pri tem niso opazili posebnih razlik med slanim ter sladkovodnim okoljem. Omeniti velja, da poleg frakcionacije na dušiku poteka hkrati tudi frakcionacija na kisiku (^{16}O , ^{18}O) (Lehmann in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Oris področja raziskave



Slika 3: Pogled na Blejski otok z obrežja. (fotografija: Ana Flašker)

Blejsko jezero leži v severozahodnem delu predalpskega sveta Slovenije in je nastalo v zadnji poledenitvi (Wurmska) (Lojen, 1996; Lojen in sod., 1997; Ogrinc in sod., 2002). Povprečna globina jezera je 17,9 m (Lojen in sod., 1997; Ogrinc in sod., 1997), njegova površina znaša 1,44 km² (Remec-Rekar in Bat, 2003). Morfološko ga razdelimo v dve kotanji: zahodno, ki je globlja in doseže globino 30,5 m ter vzhodno z največjo globino 24 m. Blejsko jezero ima dva naravna pritoka vode na severozahodni strani jezera Mišco in Solznik. Na južni strani iz jezera odteka Jezernica (Ogorelec in sod., 2006).

Zgornji sloj vode v Blejskem jezeru – epilimnij je pretežno prenasičen s kisikom, globlji sloj hladne jezerske vode – hipolimnij pa je anoksičen. Povprečna temperatura v anoksičnem okolju je pretežno konstantna in se giblje med 4 in 8 °C. Jezero ima vse značilnosti evmiktnega sladkovodnega bazena. V času stratifikacije je najbolj očitna termoklina, ki se na začetku stratifikacije v mesecu aprilu in maju začne na globini 5 metrov, proti koncu poletja pa se spusti na globino 10 metrov. V zimskem času se vodni stolpec premeša.

Jezero leži v urbanem okolju na skrajnem SZ robu Ljubljanske kotline. Turizem je glavna gospodarska dejavnost, vendar so v bližini tudi večji industrijski centri s težko industrijo, kar predstavlja veliko obremenitev za jezero. To se kaže v močni eutrofikaciji jezera in občasnem »cvetenju« alg. Eutrofikacija jezera predstavlja velik problem. Zaradi povečanih množin hranil pride do pretiranega razmnoževanja določenih alg in bakterij. Posledica je delna ali popolna anoksija vodnega stolpca zaradi razgradnje organske snovi. Da bi izboljšali ekološke razmere v jezeru so v šestdesetih letih pričeli s prvimi sanacijskimi ukrepi. V jezero so speljali dotok reke Radovne, z natega, ki so jo zgradili pred tridesetimi leti, odvajajo vodo iz anoksičnega hipolimnija na vzhodnem delu. Navkljub omenjenim poskusom, da bi izboljšali stanje, še vedno prihaja do cvetenj. Ta niti niso več tako pogosta ali obsežna, kot so bila, vendar vsakič močno zmotijo jezerski ekosistem. Pomanjkanje hranil lahko privede do upada v raznolikosti mikrobnih vrst, intenzivna poraba kisika pa tudi do pogina nektona v jezeru. Posledica je manjša razgradnja odmrlega organskega materiala in večja aktivnost sulfat reducirajočih bakterij, denitrifikatorjev in metanogenih arhej. Slednji dve skupini sta nezanemarljiva vira toplogrednih plinov. Poleg ekološkega vidika je potrebno omeniti tudi kvaren vpliv na turizem. Z algami ali cianobakterijami prekrita površina jezera ni le estetski problem, kajti toksini, ki se lahko sproščajo v času cvetenja, predstavljajo nevarnost tudi za človeka.

3.2 Vzorčenje

Vzorčevalno mesto za naše raziskave se nahaja v zahodni kotanji, nad najglobljim delom Blejskega jezera (30,5 m) (slika 4). Hipolimnij je tam anoksičen večino leta. Vzorce vodnega stolpca smo zajeli v mesecih avgust, september, oktober in december 2008. Avgusta smo zajeli vzorce le na treh globinah 8, 24 in 28 m v vodnem stolpcu, medtem ko smo ostale mesece vzorce zajemali v razmiku dveh metrov po globini vodnega stolpca.



Slika 4: Vzorčevalno mesto pred Blejskim otokom. Označeni so tudi pritoki jezera: Mišca, Solznik ter umetno napeljana struga Radovne. Na južni strani jezera odteka Jezernica

Vzorci vode smo jemali ročno z Van Dornovim vzorčevalnikom, jih pretočili v petlitrne plastične posode in jih hranili do prenosa v laboratorij pri temperaturi 4 °C. Vzporedno smo zajeli vzorce tudi za določitev izotopske sestave raztopljenega anorganskega ogljika (DIC). Ampule volumna 12 ml za analize smo pripravili pred vzorčevanjem v laboratoriju. Za izotopsko sestavo DIC smo v ampule dodali 2 kapljici nasičene H₃PO₄, jih zatesnili in prepihali s helijem.

V laboratoriju smo polovico vsakega vzorca takoj prefiltrirali najprej čez prežarjen (4 ure pri temperaturi 480 °C) in stehtan filter iz steklenih vlaken Whatman GF/C, drugo polovico vzorca pa smo prefiltrirali le čez prežarjen filter Whatman GF/C. Vzorce smo nato posušili v sušilniku pri 60 °C in stehtane vzorce shranili za določitev atomskih odstotkov ogljika in dušika, medtem ko smo nestehtane filtre uporabili za določanje izotopske sestave ogljika in dušika. Vzorce vode smo prefiltrirali še čez 0,2 µm filtre (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) in približno 100 ml vzorca takoj zamrznili. V teh vzorcih smo določili koncentracije posameznih fosforjevih in dušikovih zvrsti. Preostanek vode smo nadalje uporabili za določitev izotopske sestave posameznih dušikovih zvrsti.

3.3 Meritve v vodnem stolpcu

Meritve fizikalnih parametrov smo izvedli v mesecu avgustu in septembru. Pri tem smo uporabili Hydrolabovo sondo H₂O, ki omogoča istočasne meritve globine, temperature, pH, specifične prevodnosti, redoks potenciala in koncentracije raztopljenega kisika. Meritve so bile izvedene vsak meter prvih deset metrov, globlje pa v razmiku dveh metrov vse do dna. V mesecu oktobru in decembru smo po globini izmerili le temperaturo. Pri tem smo uporabili prenosni termometer Hanna Instruments, model HI 91531K.

3.4 Določanje izotopske sestave dušika in ogljika v suspendirani snovi ($\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$)

Vzorci za določitev izotopske sestave ogljika v suspendirani snovi smo nakisali z 1M HCl, da smo odstranili raztopljen anorganski ogljik, in posušili (Mayer, 2005). Nato smo jih dali v posebne kositrne kapsule in stisnili. Vzorce za določitev izotopske sestave dušika v suspendirani snovi smo pripravili brez predhodnega nakisanja in vzorec direktno postrgali iz filtra v kositrno kapsulo. Meritve izotopske sestave ogljika in dušika smo izvedli na masnem spektrometru Europa 20-20 s preparativnim nastavkom ANCA-SL za trdne in tekoče vzorce.

3.4.1 Priprava vzorcev za določanje izotopske sestave dušika v nitratu ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$)

Prefiltrirani vodi smo najprej preliminarno spektrofotometrično določili koncentraciji nitrata in amonija s prenosnim spektrofotometrom Hach Lange DR 2800 in testnim kitom istega proizvajalca LCK 339 za nitrat in LCK 304 za amonij. Tovrstne meritve imajo manjšo natančnost, zato so bile tako določene koncentracije le okvirne. Potrebovali smo jih za izračun potrebne količine mase kationskega (AG 50W Cation Exchange Resin, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) in anionskega izmenjevalca (AG 1, MP-1, 2 Strong Anion Exchange Resin, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), čez katera smo vzorec

nato počasi pretočili. Nadalje smo okvirne koncentracije nitrata in amonija potrebovali tudi za izračun primerne prostornine vzorca, v katerem je bilo dovolj analita za dober signal na masnem spektrometru. Najprej smo vzorec spustili čez kationski izmenjevalec. Da smo dosegli dovolj počasen tok vode, smo uporabili peristaltično črpalko s hitrostjo črpanja nastavljeno na 2 vrtljaja/min. Tako so imeli kationi (NH_4^+) dovolj časa, da so se vezali na izmenjevalec. Hkrati s kationi so se na ta izmenjevalec vezale še tiste organske snovi, ki jih nismo izločili pri prejšnjih filtriranjih (Ostrom in sod., 1998:). V vodi sta ostala le nitrat in nitrit, vendar koncentracije slednjega niso motile izotopske analize nitrata (Casciotti in McIlvin, 2007).

Pripravo nitrata za izotopske meritve smo na prvem vzorčevanju izvedli na tri različne načine in metode med seboj primerjali. Na podlagi rezultatov smo se pri nadaljnjih vzorčevanjih odločili za najbolj primerno metodo.

S počasnim izparevanjem pri 60 °C smo vodo, v kateri je ostal le nitrat, odpareli in sušino pripravili za meritve izotopske sestave nitrata na masnem spektrometru Europa 20-20 s preparativnim nastavkom ANCA-SL za trdne in tekoče vzorce.

Vzorce vode z nitratom smo spustili čez anionske kolone, kjer se je nitrat vezal. Nitrat smo dobro sprali iz anionskih kolon in ga pripravili za izotopske meritve. Kolono smo sprali tako, da smo dodali desetkrat po 3 mL 3M HCl, vsakič počakali, da se je izmenjevalec prepojil s kislino in šele nato vključili peristaltično črpalko, nastavljeno na visoke obrate (150 vrtljajev/min). Na koncu smo še dvakrat sprali kolono z deionizirano vodo in dobljeno raztopino takoj nevtralizirali z Ag_2O . Srebrov oksid smo postopno dodajali v raztopino in zraven intenzivno mešali. Čaša je bila postavljena v vodno kopel z ledom, saj je reakcija eksotermna. Reakcija je uspešno potekla, ko se je raztopina mlečno obarvala. Z mešanjem smo nadaljevali tako dolgo, da je bela barva izginila in se je usedlina ločila od raztopine. Sproti smo preverjali pH, ki se je moral gibati v območju med 5 in 6. Nevtraliziran vzorec smo prefiltrirali še čez 0,45 μm filter, ki smo ga posušili v sušilniku pri 60 °C. Nitrat iz vode je reagiral s srebrovim oksidom, da se je tvoril srebrov nitrat (AgNO_3). Tega smo do analize shranili v temi, saj na svetlobi razpade. Tako pripravljenim vzorcem smo izmerili izotopsko sestavo dušika (Downs in sod., 1999).

Za pripravo vzorcev z zlitino Devarda smo jezersko vodo najprej spustili čez anionske kolone in ga sprali z nje z 2 M KCl (desetkrat po 3 mL). Nato smo nakisali Whatman GF/C filtre s 2,5 N KHSO_4 in jih zavili v teflonski trak ter dali v steklene inkubacijske posode ($V = 300 \text{ mL}$), v katere smo že prej nalili sprano raztopino. Dodali smo še zlitino Devarda in 1 N NaOH, ter takoj zaprli posode s plinotesnim gumijastim zamaškom. V prisotnosti reducenta (zlitina Devarda) se nitrat spremeni v amonij, alkalna raztopina, v kateri se nahaja, pa povzroči izhajanje amonijaka, ki se ponovno raztopi kot amonij na nakisanih filterih. Inkubacija je trajala en teden pri sobni temperaturi v temnem prostoru. Večkrat na dan smo posode stresali, da se je vsebina premešala. Po inkubaciji smo iz posod vzeli teflonske trakove s filteri, jih odvili in filtre dali v kositrne kapsule, ki smo jih shranili do merjenja na masnem spektrometru (Downs in sod., 1999).

Priprava nitrata po postopku mikro difuzije z uporabo zlitine Devarda se je izkazala za neuspešno, saj je ponovno prišlo do frakcionacije (Preglednica 1), predvidoma zaradi vpliva drugih ionov. Tega postopka v nadaljevanju nismo uporabili. Ugotovili smo, da se meritve po 1. in 2. metodi med seboj niso razlikovale, zato smo v nadaljevanju uporabili 1. metodo, ker je bila hitrejša in cenejša.

3.4.2 Priprava vzorcev za določanje izotopske sestave dušika v amoniju ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NH}_4^+}$)

Nato smo pričeli s postopkom za določitev izotopske sestave amonija. Pri vzorcih, ki so imeli visoke koncentracije amonija in nizke koncentracije nitrata (večinoma na globinah 24 m, 26 m in 28 m), smo najprej uporabili anionski izmenjevalec, ki prav tako učinkovito odstrani organsko snov in nitrat (Lehmann in sod., 2001). Vzorec smo nato počasi izparevali pri 60 °C. Razlika v izparevanju v primerjavi z nitratom je bila v dodatku kisline, ki je znižala pH raztopine in s tem preprečila amoniju, da bi uhajal v zrak. Sušino smo nato dali v kositrne kapsule in meritve izvedli na masnem spektrometru Europa 20-20 s preparativnim nastavkom ANCA-SL za trdne in tekoče vzorce. Rezultatov, ki smo jih dobili s tem postopkom, je bilo malo in njihovi signali, ki smo jih izmerili na masnem spektrometru so bili šibki.

V ostalih vzorcih smo poskušali določiti izotopsko sestavo amonija, ki smo ga ujeli na kationskem izmenjevalcu (preglednica 1). S testiranjem pripravljenih raztopin s točno znano izotopsko sestavo (Europa, $\delta^{15}\text{N} = +2,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$) smo ugotovili, da pri spiranju amonija iz kationskega izmenjevalca prihaja do velikih napak in frakcionacij, prav tako pa tudi do nepopolnega izpiranja analita, zato smo določanje $\delta^{15}\text{N}$ v amoniju v vzorcih, kjer so bile nizke koncentracije, opustili.

Poskusili smo tudi s sežigom kationskega izmenjevalca, na katerem je bil izmenjan amonij. Izmenjevalec smo najprej homogenizirali, vendar koncentracije amonija niso bile dovolj visoke, da bi dobili zadovoljiv signal na spektrometru. Ta postopek je sicer možen le pri kationskem izmenjevalcu, kajti prazni anionski izmenjevalec vsebuje spojine, ki motijo meritve izotopske sestave dušika (Preglednica 2).

Preglednica 1: Rezultati spiranja raztopin z znano izotopsko sestavo s kationskih in anionskih izmenjevalcev

vzorec na kationski koloni	$\delta^{15}\text{N}$ ‰ (stand.)	$\delta^{15}\text{N}$ ‰ (izmer.)	vzorec na anionski koloni	$\delta^{15}\text{N}$ ‰ (stand.)	$\delta^{15}\text{N}$ ‰ (izmer.)
	Europa			Merck	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5	-3,1	KNO_3 a	3,4	3,3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5	-0,7	KNO_3 b	3,4	3,3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5	-3,2	KNO_3 (z Devardo) a	3,4	-0,3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5	1,5	KNO_3 (z Devardo) b	3,4	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5	0,9			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5	0,9			

Preglednica 2: Rezultati meritev $\delta^{15}\text{N}$ po sežigu praznega anionskega izmenjevalca

Vzorec	$\delta^{15}\text{N}$ ‰
anion.izm.	-1,2
anion.izm.	-1,5
anion.izm.	-1,5
anion.izm.	-1,7

Amonij smo poskušali ločiti od nitrata tudi s pomočjo zeolita (Sprynskyy in sod., 2001; Thornton in sod., 2007; Wang in sod., 2008). Zeolit je mineral z veliko sposobnostjo vezave kationov in pozitivno nabitih molekul. Ker je precej cenejši od uporabljenega kationskega izmenjevalca, in ker ga izdelujejo v velikih količinah in primerno čistega, samo ga poskusili uporabiti kot kationski izmenjevalec. Zeolit smo naročili pri slovenskem ponudniku Silkem d.o.o. v dveh oblikah: fino zmleti (tip ZP-4A, povprečna velikost delcev 3-5 μm) in granulirani (tip HC-13, velikost delcev 1-5 mm). Njegovo ustreznost smo preizkušali s standardnimi raztopinami z znanimi koncentracijami. Koncentracijo analita smo določali s prenosnim spektrofotometrom Hach Lange DR 2800.

V prvem poskusu smo zeolit inkubirali na stresalniku v 50 mL raztopine z znano koncentracijo čez noč. Pred inkubacijo smo eni seriji vzorcev po dodatku zeolita znižali pH na nevtralno s 3 M HCl, saj uporabljeni mineral dvigne pH na 11. Uporabljali smo različne količine zeolita. V drugem poskusu smo ponovili poskus, opisan v Ostrom in sod (1998). Pripravljeni raztopini smo dodali 100 mg zeolita in vzorec 30 min mešali pri sobni temperaturi. Po 30 minutah smo vzorec vode z zeolitom prefiltrirali čez 0,45 μm filtre, in dodali spet 100 mg zeolita. Po

naslednjih 30 minutah smo raztopino še enkrat prefiltrirali. Oba filtra smo posušili pri 40 °C. Sušino smo nato pripravili za meritev na masnem spektrometru.

Preglednica 3: Rezultati meritev prvega poskusa z zeolitom. Za primerjavo je podana tudi kapaciteta suhega kationskega izmenjevalca

Vzorec (V = 50 mL)	m _{zeol} [mg]	c _{zac} (NH ₄ -N) [mg/L]	c _{kon} (NH ₄ -N) [mg/L]	NH ₄ ⁺ [mg]/zeol. [mg]	izkoristek
HC-13 a netrir.	3000	1	0,365	$1,058 \times 10^{-5}$	0,635
HC-13 b netitr.	3000	1	0,573	$7,117 \times 10^{-6}$	0,427
ZP-4A a netitr.	3000	1	0,724	$4,600 \times 10^{-6}$	0,276
ZP-4A b netitr.	3000	1	0,751	$4,150 \times 10^{-6}$	0,249
HC-13 a (pH=6,5)	3000	1	0,511	$8,150 \times 10^{-6}$	0,489
HC-13 b (pH=7)	3000	1	0,495	$8,417 \times 10^{-6}$	0,505
ZP-4A a (pH=6,8)	3000	1	0,694	$5,100 \times 10^{-6}$	0,306
ZP-4A b (pH=6,3)	3000	1	motno		
ZP-4A (pH=4,7)	3000	1	0,125	$1,458 \times 10^{-5}$	0,875
HC-13 (pH=7)	3000	1	0,229	$1,285 \times 10^{-5}$	0,771
HC-13 (pH=7)	4000	1	0,192	$1,010 \times 10^{-5}$	0,808
HC-13 (pH=6,8)	6000	1	0,105	$7,458 \times 10^{-6}$	0,895
HC-13 (pH=7,1)	10000	1	0,151	$4,245 \times 10^{-6}$	0,849
kation. izmenjev.	-	-	-	$9,18 \times 10^{-2}$	-

V prvem poskusu je bila prostornina vzorca 50 mL. Iz rezultatov v Preglednici 3 je razvidno, da je bila ločitev amonija bolj uspešna pri večji količini zeolita in takrat, ko smo raztopino nevtralizirali z dodatkom kisline. Zaradi različnih mas zeolita, ki smo jih uporabili, je zgolj podatek o izkoristku neprimeren, saj tega ne upošteva. Zato smo rezultate preračunali na mg suhe teže zeolita, da jih med seboj lažje primerjamo. Posebnih razlik med obema vrstama zeolita nismo opazili. To ni bilo pričakovano, saj se razmerje med površino in prostornino pri manjših delcih močno poveča, kar pomeni več prostih mest za vezavo in smo predvidevali da bo ZP-4A bolj učinkovit. Kljub temu je razvidno, da imamo še vedno precej izgube. Postopka zato nismo mogli uporabiti pri naših raziskavah, ker so dejanske koncentracije nižje in bi imele izgube zato večji vpliv, rezultati bi bili posledično nezanesljivi.

V drugem poskusu, ki so ga izvedli že Ostrom in sod. (1998) smo imeli le dva vzorca, kar ni dovolj za statistično obrazložitev rezultata. Kljub temu smo opazili, da je ta metoda privedla do večje učinkovitosti fino granuliranega zeolita, ki je odstranil za en velikostni razred več amonija, kar je sicer še vedno stokrat manj kot ga odstrani sintetični kationski izmenjevalec. Rezultati so zbrani v Preglednici 4. Ali je ta metoda resnično bolj primerna za odstranjevanje

amonija iz voda, je zaradi omenjenega primanjkljaja podatkov težko reči, saj ne vemo ali je rezultat reprezentativen. Potrebni so nadaljni poskusi z večjim številom vzorcev, da bi lahko odgovorili na to vprašanje. Poleg tega imajo lahko vpliv na poskus tudi razmere, ki so precej različne. V drugem poskusu sta bila prostornina raztopine veliko večja, masa zeolita pa precej manjša kot v prvem poskusu. Različna sta bila tudi način mešanja in čas inkubacije. Vse te razlike so pomembne in imajo vpliv na reakcijske pogoje, ki definirajo stopnjo adsorpcije amonija.

Preglednica 4: Rezultati meritev izvedenih pri drugem poskusu z uporabo zeolita (Ostrom in sod., 1998)

Vzorec (V = 1 L)	$m_{\text{zeol.}}$ [mg]	c(zač)-NH ₄ -N [mg/L]	c(konč)NH ₄ -N [mg/L]	NH ₄ ⁺ [mg]/zeol. [mg]	izkoristek
ZP-4A	200	0,431	0,403	$1,400 \times 10^{-4}$	0,065
HC-13	200	0,421	0,412	$4,500 \times 10^{-5}$	0,021

Iz navedenih poskusov je razvidno, da je določitev izotopske sestave amonija v koncentracijskem območju, ki ga najdemo v jezerih, zahtevno in je potrebno uvesti drugačen postopek, kot smo ga uporabili v tej diplomii.

3.5 Modelni inkubacijski poskus

Decembra smo v globini 28 m zajeli dodatnih 5 L vode za modelni inkubacijski poskus. Z njim smo želeli preveriti učinkovitost denitrifikacije v hladnih mesecih. V vodi je bilo veliko suspendirane snovi. Predvidevali smo, da je na njej že razvita mikrobna združba, ki ima sposobnost denitrifikacije (Nishio in sod., 1982; Steingruber in sod., 2001).

Vodo smo pretočili v 300 mL steklene inkubacijske posode, katerim smo dodali 1 mL 10 mM KNO₃ z $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3} +180 \text{‰}$. S težjim izotopom obogaten nitrat smo dodali zato, da bi lahko sledili asimilacijske in denitrifikacijske procese. Uporabili smo višjo koncentracijo, kot jo najdemo v naravnem sistemu, da bi imeli organizmi na voljo več nitrata in bi lažje sledili spremembam v koncentracijah, povezanih s prej omenjenimi procesi (Nielsen, 1992; Rysgaard in sod., 1993).

Posode smo zatesnili z gumijastimi zamaški, ki smo jih še dodatno pritrdili s kovinskimi pokrovi za primer, če bi v posodah nastal nadtlak. Inkubacija je potekala v hladilniku (temen prostor) pri 7 °C z namenom, da bi omejili vpliv fotoavtotrofov ter da bi se približali *in situ* razmeram. Čas med odpiranjem posameznih inkubacijskih posod je bil približno en mesec. Vzorce smo najprej prefiltrirali in v filtratu določili koncentracije dušikovih in fosforjevih zvrsti. Na filtru smo določili izotopsko sestavo dušika v suspendirani snovi.

Rezultatov inkubacijskega poskusa nismo mogli uporabiti pri interpretaciji naše hipoteze, zato jih Rezultatih in Razpravi nismo upoštevali. Kljub temu so dodani na koncu diplomske naloge v Prilogah.

3.6 Meritve stabilnih izotopov na masnem spektrometru

Vsi rezultati meritev izotopskih vrednosti so podani z vrednostmi δ relativno glede na mednarodne standarde (za ogljik PDB, za dušik je to atmosferski dušik) in izraženi v ‰ (enačba 1). Kontrolo kvalitete meritev na masnem spektrometru Europa 20-20 s preparativnim nastavkom ANCA-SL za trdne in tekoče vzorce smo izvajali z referenčnimi standardi vsakih 8 vzorcev. Za analize vzorcev dušika smo uporabljali referenčna materiala IAEA-N1 (t.j. amonijev sulfat z vrednostjo $\delta^{15}\text{N} = +0,4 \pm 0,2 \text{ ‰}$), IAEA-N2 (t.j. amonijev sulfat z vrednostjo $\delta^{15}\text{N} = +20,3 \pm 0,2 \text{ ‰}$) ter interni laboratorijski standard Europa (Europa Scientific Ltd.; t.j. amonijev sulfat z vrednostjo $\delta^{15}\text{N} = +2,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$). Za analize vzorcev ogljika smo uporabljali referenčni material IAEA CH-6 (t.j. sukroza z vrednostjo $\delta^{13}\text{C} = -10,4 \pm 0,2 \text{ ‰}$) in interni laboratorijski standard UreaC (t.j. urea z vrednostjo $\delta^{13}\text{C} = -30,5 \pm 0,2 \text{ ‰}$; Kemika Zagreb). Natančnost meritev znaša $\pm 0,2 \text{ ‰}$ za $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti in $\pm 0,3 \text{ ‰}$ za $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti.

3.7 Določanje izotopske sestave raztopljenega anorganskega ogljika ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$)

Vzorce smo pripravili že na mestu vzorčevanja, kjer smo prepihane ampule z vsebnostjo nasičene kisline H_3PO_4 prelili s 6 mL vzorca. Izotopsko sestavo sproščenega CO_2 smo izmerili iz plinske kape na masnem spektrometru Europa 20-20 s preparativnim nastavkom ANCA-TG, ki se uporablja za meritve plinastih vzorcev. Pravilnost priprave vzorca in poteka meritev smo spremljali s pripravo delovnega standarda Na_2CO_3 , ki ima $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ vrednost $-10,8 \text{ ‰}$. Standard smo pripravili podobno kot vzorce. Meritve izotopske sestave izvedemo tako, da v avtomatski vzorčevalnik najprej damo standarde plina z znano izotopsko sestavo CO_2 z vrednostjo $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} -5,2 \pm 0,2 \text{ ‰}$, nato delovni standard Na_2CO_3 in set 10-tih vzorcev.

3.8 Določanje alkalnosti (Titracija po Granu)

Celotno alkalnost vzorca smo določili po Granovi metodi (Gran, 1952). Pri tem smo uporabili certificirano kislino HCl koncentracije $0,05 \pm 0,002 \text{ mol/L}$ (0,05 N) (KEFO Lab). Pred uporabo smo najprej umerili pH meter in s tem določili naklon elektrode. Nato smo v posodico zatehtali približno med 6 in 8 g vzorca in odčitali natančno vrednost začetnega volumna vzorca (V_0) (predpostavljamo, da je 1 g vzorca približno enako 1 mL vode). V posodico smo položili še magnetek in vse skupaj postavili na magnetno mešalo. V raztopino smo potopili pH elektrodo. Počasi smo dodajali HCl in na pH metru opazovali spremembe vrednosti pH v milivoltih (mV). Ko smo prišli do točke 220 mV, smo ob vsakem dodajanju po 0,05 ml HCl odčitali vrednost pH vzorca v mV do vrednosti 260 mV. Dobljene podatke (prostornino dodane HCl, napetosti ter začetno maso in napetost) smo vnesli v predpripravljeno računalniško tabelo v programu Excel© tvrdke Microsoft™, kjer smo iz Granove funkcije najprej izračunali natančno prostornino dodane HCl v ekvivalentni točki in jo nadalje uporabili pri določitvi celokupne alkalnosti.

Celotno alkalnost (TA) določimo kot koncentracijo HCO_3^- po enačbi:

$$TA [\text{mmol/L}] = c_{\text{HCl}} \cdot V_e / V_{\text{vzorca}} \quad \dots (7)$$

Pri čemer pomeni C_{HCl} koncentracijo certificirane HCl (mmol/L, meq/L), V_e volumen porabljene HCl pri določitvi ekvivalentne točke (mL) ter V_{vzorca} začetni volumen vzorca (mL). Natančnost tako določene celotne alkalnosti je $\pm 2\%$.

3.9 Določanje hranil

Hranilne soli NO_3^- , NH_4^+ in PO_4^{3-} so določili s standardnimi spektrofotometričnimi metodami (Grasshoff in sod., 1983) na Morski biološki postaji, Nacionalnega inštituta za biologijo v Piranu. Celotni raztopljeni dušik (TDN; angl. total dissolved nitrogen) in fosfor (TDP; angl. total dissolved phosphorus) pa kolorimetrično po oksidaciji s $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ s standardnimi postopki (Grasshoff in sod., 1983). Napaka meritev je $\pm 3\%$.

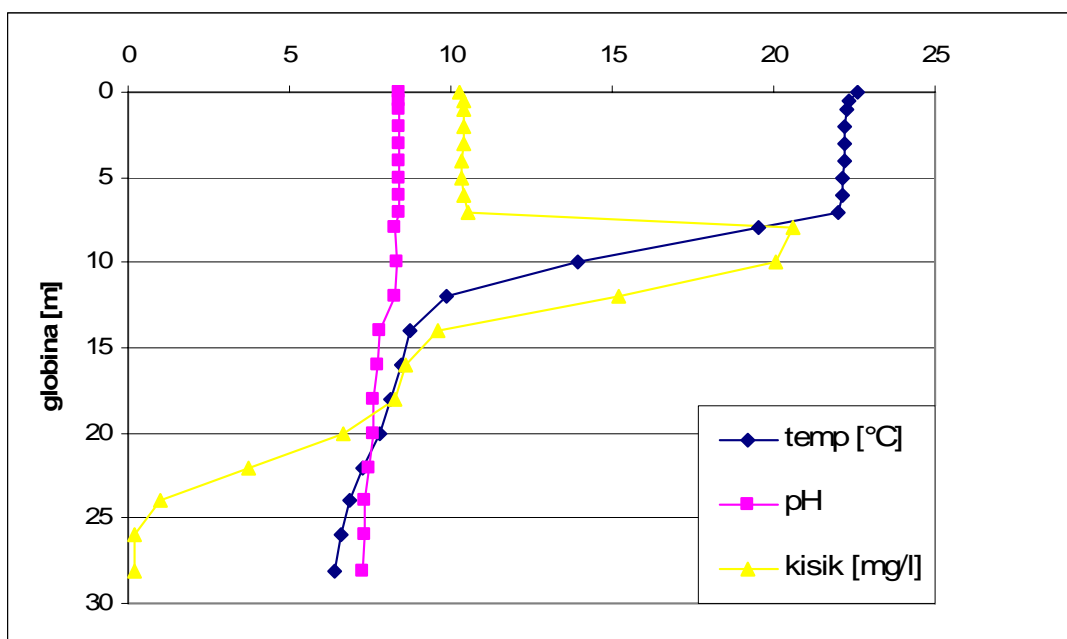
3.10 Določanje suspendiranega organskega ogljika in totalnega dušika

Vsebnost suspendiranega organskega ogljika in totalnega dušika v posušeni in nakisani (z 1 M HCl) vzorcih stehtanih filtrov so določili na Morski biološki postaji, Nacionalnega inštituta za biologijo v Piranu z elementnim analizatorjem C, H, N, S Carlo Erba EA 1108, pri sežigni temperaturi 1020 °C (Hedges in Stern, 1984). Napaka meritev je $\pm 3\%$.

4 REZULTATI

4.1 Osnovni fizikalni in kemijski parametri v vodnem stolpcu

V avgustovskem vzorčenju smo imeli za vodni stolpec Blejskega jezera na razpolago fizikalne in kemijske podatke Sektorja za kakovost voda, Agencije Republike Slovenije za okolje. Na sliki 5 so prikazani glavni fizikalni in kemijski parametri (temperatura, pH in koncentracije raztopljenega kisika) po globini vodnega stolpca.

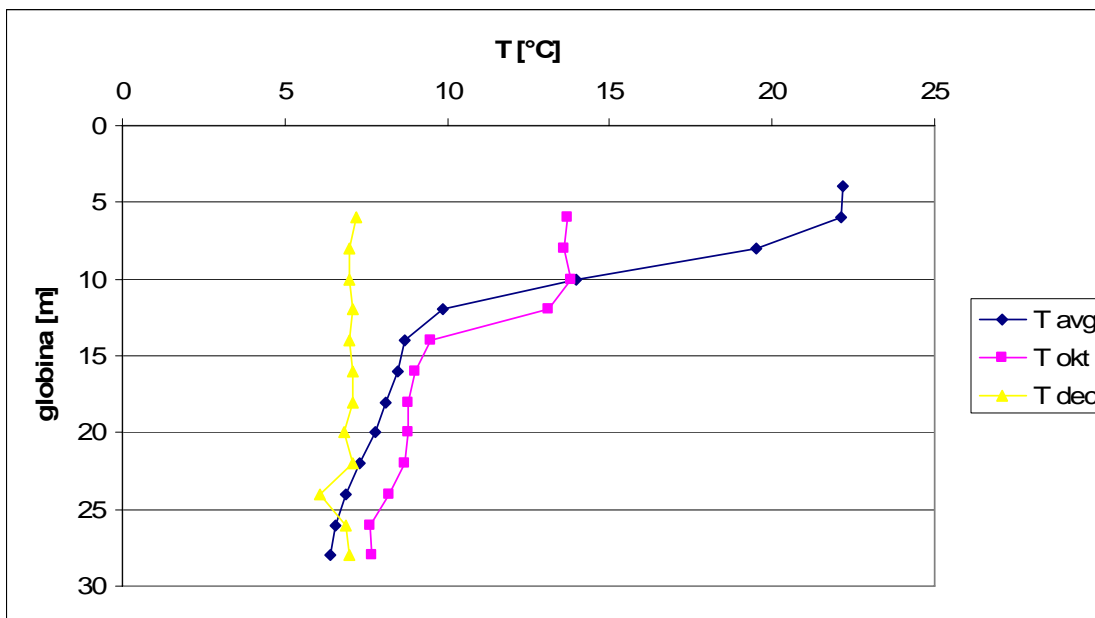


Slika 5: Temperatura, pH in koncentracija kisika po globini vodnega stolpca Blejskega jezera v avgustu 2008 (Sodja, osebni vir)

Močno je izražena termoklina, ki se začne na 6 m in konča na 12 m. V tem prehodu se temperatura zniža iz 22 °C na 9 °C. V naslednjih 16 m pade za nadaljne 3 °C. S temperaturnim prehodom se ujema koncentracija raztopljenega kisika. Do lokalnega maksimuma pride ravno na začetku termokline, kjer doseže vrednost 20,6 mg/L. Pod termoklino koncentracija raztopljenega kisika najprej počasi, nato pa hitro pada, dokler nima na globini 26 m vrednost 0,22 mg/L in postane vodni stolpec anoksičen. V takšnih razmerah že lahko poteka denitrifikacija. pH se v avgustu po globini ne spreminja veliko; od vrha do dna se spremeni le za eno enoto iz pH 8,4 na 7,3, pri čemer je največji posamičen prehod tik pod termoklino in znaša pol enote pH.

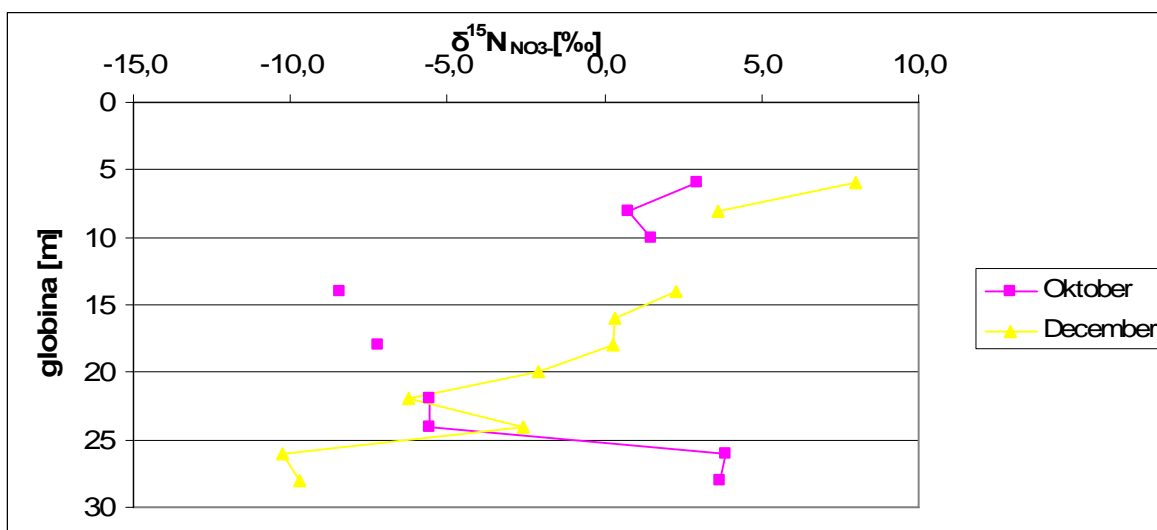
Primerjava temperaturnih profilov po mesecih (slika 6) nam pokaže, kako se zgornje plasti jezera ohlajajo in kako termoklina počasi izginja. Opazimo tudi, da se zgornja meja termokline pomika navzdol (avgust 8 m, oktober 12 m), spodnja meja pa ostaja na približno enaki globini (14 m). Temperature spodnjih plasti (od 26 m navzdol) se v vseh treh mesecih ne razlikujejo

za več kot 1,3 °C, v razmaku 2,5 °C pa so že od globine 14 m, kljub temu, da je decembra vodni stolpec premešan.



Slika 6: Primerjava temperaturnih profilov Blejskega jezera po mesecih. Avgusta in oktobra je lepo vidna termoklina

4.2 Dušikove zvrsti in $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$:



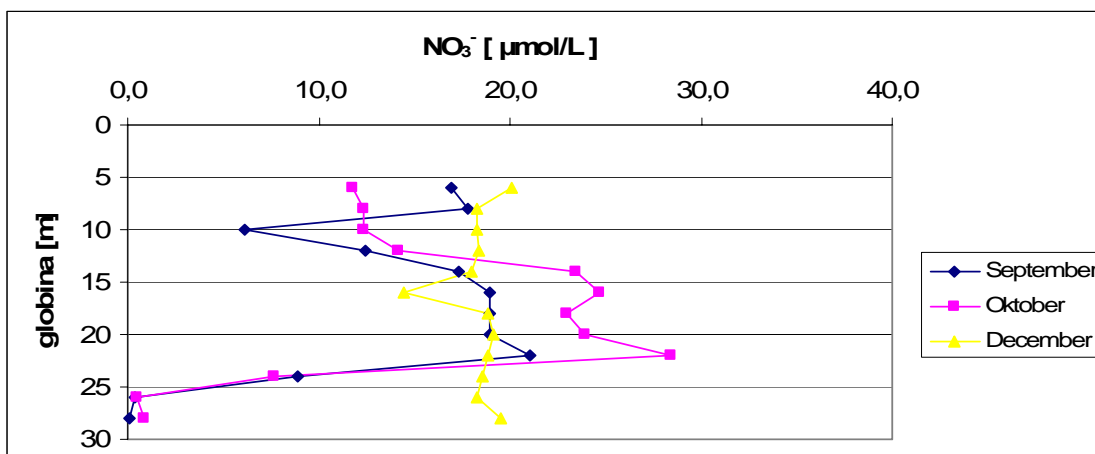
Slika 7: Spreminjanje izotopske sestave nitrata po vodnem stolpcu Blejskega jezera v oktobru in decembru 2008

Čeprav so za september na razpolago zgolj tri vrednosti, lahko za oktober in december dokaj dobro opišemo globinsko spreminjanje (slika 7) izotopske sestave nitrata. Nitrat ima na vrhu bolj pozitivne vrednosti, kar je v skladu z rezultati Carpenterja in sod. (1997), ki navajajo vrednosti med 5 ‰ in 10 ‰. Globlje izotopska sestava nitrata močno pade. Do padca v oktobru pride ravno na spodnji meji termokline. Pomembna razlika nastopi od globine 24 m dalje, kjer se oktobra in decembra sestava bistveno razlikujeta. Oktobra se izotopska vrednost nitrata spet poveča na približno 3,6 ‰, medtem ko decembrska doseže najnižjo izmerjeno vrednost, $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-} = -10,3 \text{ ‰}$. Nasprotno ostaja decembra koncentracija nitrata po vsem vodnem stolpcu približno enaka, nihanja v izotopski sestavi pa so precejšnja, vendar kažejo padajoč trend. Za december predvidevamo da je hkrati s premešanjem vodnega stolpca prišlo tudi do oksigenacije spodnjih plasti, čeprav se to na izotopski sestavi nitrata ne pozna. To dejstvo je pomembno pri nadaljni interpretaciji rezultatov.

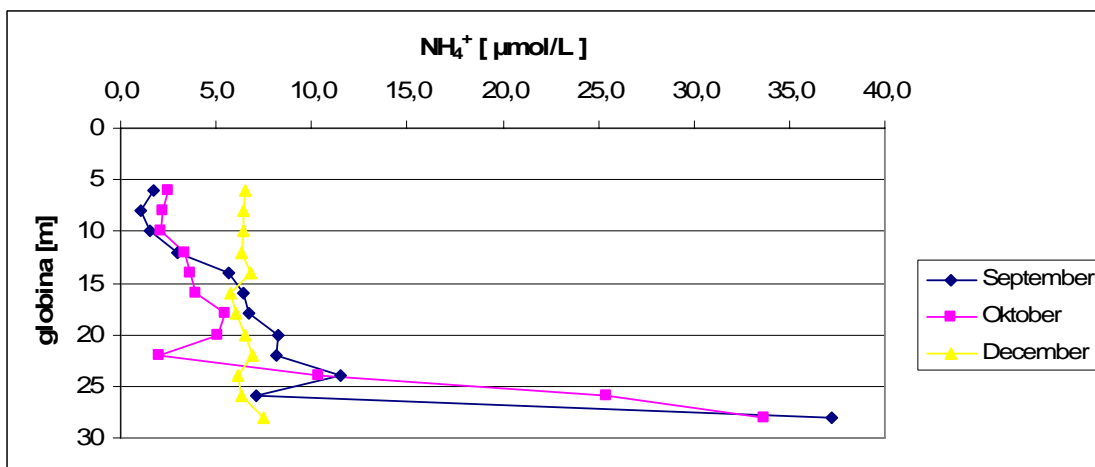
Krivulji za koncentracije nitrata za september in oktober sta si precej podobni (slika 8). Pri tem ne gre za ujemanje v koncentracijah, temveč za podoben profil v vodnem stolpcu. Razen na 6 m in 8 m je koncentracija nitrata oktobra vedno višja kot septembra. Nad termoklino je povprečna vrednost koncentracij septembra 13,4 $\mu\text{mol/L}$, decembra pa 12,6 $\mu\text{mol/L}$. Pod njo znaša povprečna vrednost septembra 17,3 $\mu\text{mol/L}$ in decembra 21,9 $\mu\text{mol/L}$. Pri tem nismo upoštevali podatkov iz anoksičnega dela vodnega stolpca (globini 26 m in 28 m). Decembra se koncentracija, v odsotnosti povezav z nihanji ostalih mesecev, ne spreminja močno z izjemo na 16 m globine. Povprečna vrednost je 18,7 $\mu\text{mol/L}$. To je blizu meritev Ostroma in sod. (1998), ki so v jezeru Superior (oligotrofno) izmerili koncentracijo nitrata 23 $\mu\text{mol/L}$.

Izmerjene koncentracije amonija (slika 9) se tako kot v primeru nitrata obnašajo podobno v septembru in oktobru, medtem ko se drugačen trend kaže decembra. Nenaden porast koncentracij (iz 8 na 37 $\mu\text{mol/L}$ septembra in iz 2 na 33 $\mu\text{mol/L}$ oktobra) od globine 22 m navzdol kaže, da je bil vodni stolpec suboksičen ali anoksičen. Septembra so bile koncentracije amonija pod termoklino višje, nad njo pa nižje kot oktobra. Decembra so koncentracije amonija do globine 22 m višje od septembrskih in oktobrskih s povprečno vrednostjo 6,5 $\mu\text{mol/L}$. Ostrom in sod. (1998) so izmerili precej nižje koncentracije okoli 0,3 $\mu\text{mol/L}$. Ob predpostavki, da je vodni stolpec decembra oksigeniran, je ta rezultat vsekakor nepričakovan.

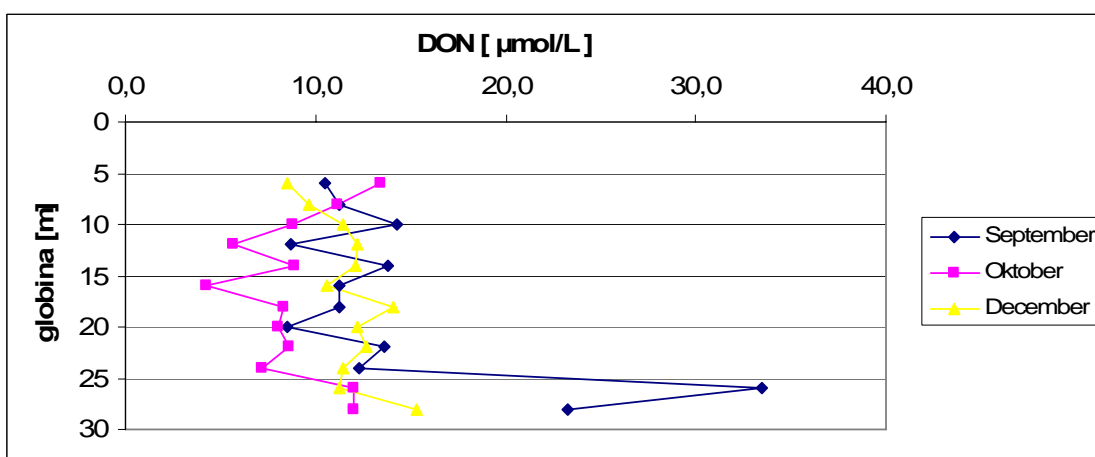
Rezultati kažejo tudi, da v predelih anoksije septembra in oktobra večji delež dušika predstavlja raztopljeni organski dušik (DON; ang. dissolved organic nitrogen) in ne več nitrat, ki je dominantna oblika v oksičnem delu vodnega stolpca (slika 10). Koncentracije DON dobimo tako, da od TDN odštejemo koncentracije nitrata in amonija. Tudi sicer se DON giblje podobno kot amonij z razliko, da je koncentracija DON od 1- do 10-krat višja od amonija. Tekom vodnega stolpca se koncentracija DON septembra ne spreminja mnogo in niha okoli srednje vrednosti 11,5 $\mu\text{mol/L}$ (podatki iz anoksičnega dela niso upoštevani). V anoksičnem delu koncentracija DON hitro naraste in doseže najvišji vrednosti 33,5 $\mu\text{mol/L}$ in 23,3 $\mu\text{mol/L}$. Oktobra je le-ta nekoliko nižja (9,0 $\mu\text{mol/L}$), koncentracije pa so pri vrhu in dnu višje od tistih na sredini vodnega stolpca. Posebej opazen je padec na globini 16 m, ko doseže koncentracija DON vrednost 4,3 $\mu\text{mol/L}$. Decembra ni opaznih večjih nihanj v koncentraciji DON. Povprečna vrednost je 11,8 $\mu\text{mol/L}$, ki je podobna septembrskemu povprečju oksigeniranega dela vodnega stolpca.



Slika 8: Spreminjanje koncentracije nitrata po vodnem stolpcu Blejskega jezera v septembru, oktobru in decembru 2008



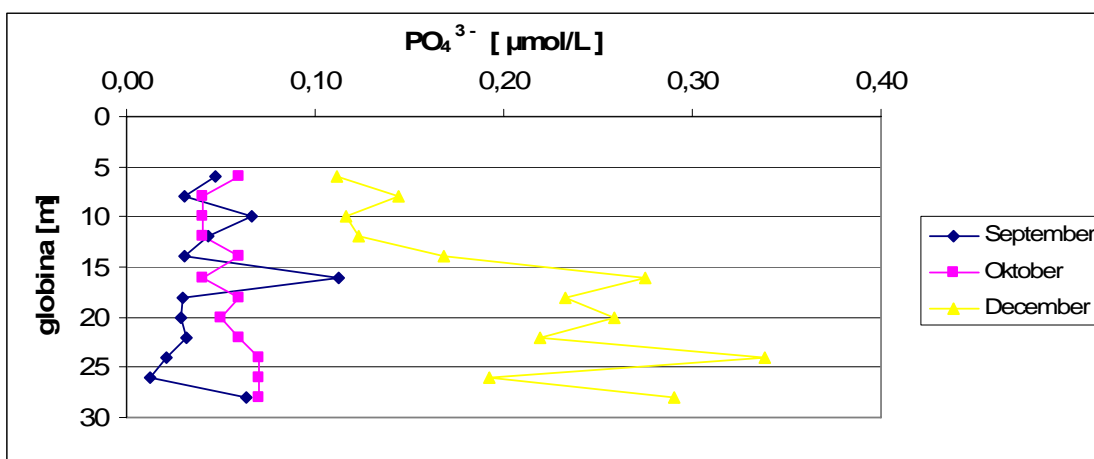
Slika 9: Spreminjanje koncentracije amonija po vodnem stolpcu Blejskega jezera v septembru, oktobru in decembru 2008



Slika 10: Spreminjanje koncentracije DON po vodnem stolpcu Blejskega jezera v septembru, oktobru in decembru 2008

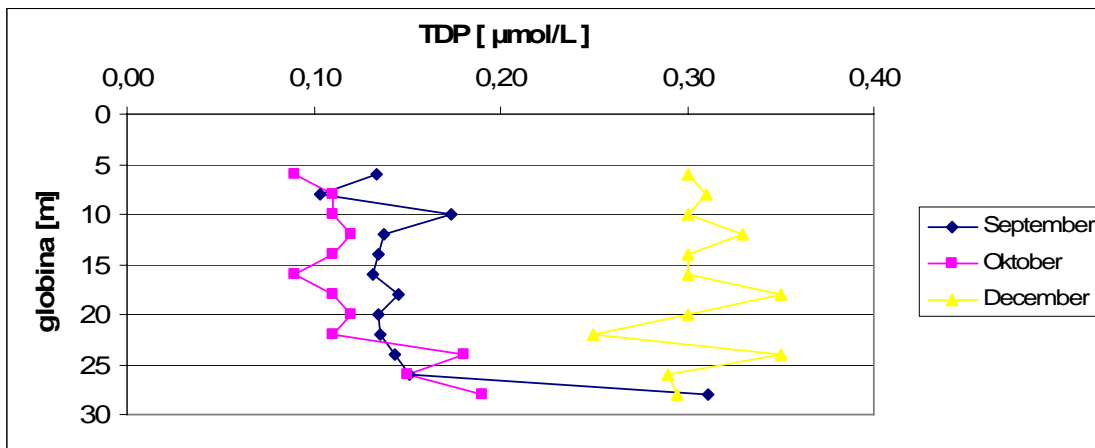
4.2.1 Fosforjeve zvrsti ter razmerja nekaterih dušikovih in fosforjevih zvrsti:

Na sliki 11 so podana nihanja koncentracij fosfata v vseh treh mesecih, ko smo merili njegovo koncentracijo. Razvidno je, da je v toplejših mesecih fosfata precej manj in se giblje med 0,01 $\mu\text{mol/L}$ in 0,11 $\mu\text{mol/L}$ septembra, ter med 0,04 $\mu\text{mol/L}$ in 0,07 $\mu\text{mol/L}$ oktobra. Decembra koncentracije postopoma naraščajo in so precej višje ter se gibljejo med 0,11 $\mu\text{mol/L}$ in 0,34 $\mu\text{mol/L}$, ki je najvišja vrednost (24 m). Na globini 16 m je izrazito tudi enkratno povišanje fosfata v septembru (tako pod termoklino) na račun česar se močno zmanjša koncentracija organsko vezanega fosforja.

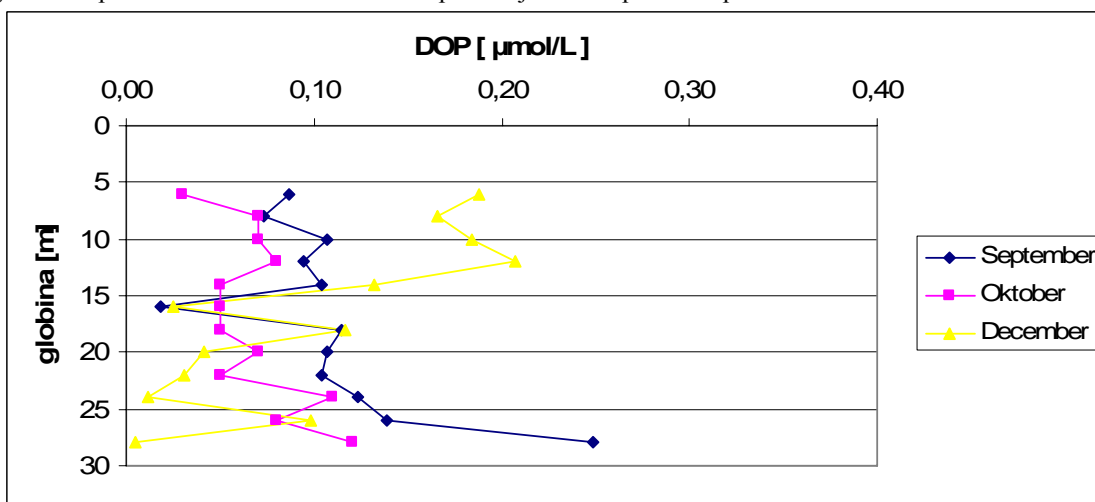


Slika 11: Nihanja koncentracij fosfata po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih. Decembra je koncentracija trikrat višja kot v ostalih dveh mesecih, vendar so tudi nihanja večja. Na globini 16 m je opazen nenaden porast koncentracije v septembru takoj pod termoklino

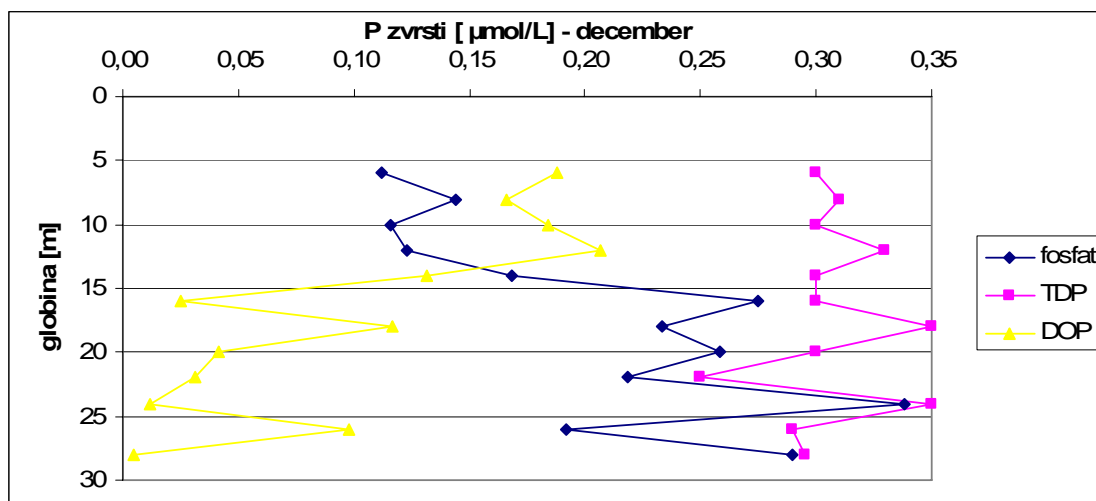
Na sliki 12 vidimo nihanja celotnega fosforja v vodi. Ponovno opazimo višje koncentracije decembra, ki se gibljejo med 0,25 $\mu\text{mol/L}$ in 0,35 $\mu\text{mol/L}$. S primerjavo slik 11 in 12 pa lahko približno ugotovimo kolikšen delež celotnega fosforja predstavlja fosfat, ki je glavna oblika, s katero mikroorganizmi privzemajo fosfor. Razliko med koncentracijami celotnega fosforja in fosfata predstavlja fosfor v organski obliki (DOP, ang. dissolved organic phosphorus), katerega delež narašča z globino. Medtem ko septembra na globini 28 m predstavlja DOP praktično celoten fosfor in je oktobra povprečno več fosforja v organski obliki kot fosfata, se decembra od globine 14 m navzdol pojavlja fosfat kot pretežna oblika, ki kmalu predstavlja celoten fosfor, a z opaznim padcem na 26 m (slika 13).



Slika 12: Spreminjanje koncentracije celotnega raztopljenega fosforja po globini vodnega stolpca Blejskega jezera. Septembra se v anoksičnem delu hipolimnija močno poveča in preseže tudi decembrsko vrednost



Slika 13: Spreminjanje koncentracij DOP po globini vodnega stolpca Blejskega jezera v mesecih vzorčenja

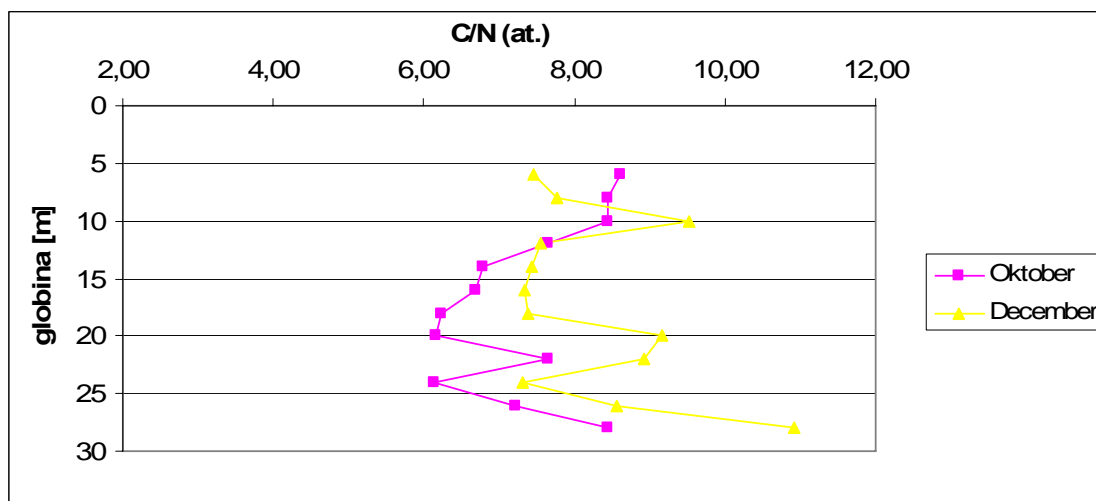


Slika 14: Gibanje različnih fosforjevih zvrsti v decembru 2008. Viden je hiter preskok med relativnimi deleži fosfata in DOP na globini 14 m

4.3 Suspendirana organska snov in razmerje C/N

Bistven del naših eksperimentov obsegajo analize suspendirane snovi, ki vsebuje prokariote, alge, protozoje in drugo suspendirano organsko snov; skratka vse planktonske organizme in druge delce, ki so večji od $0,7\mu\text{m}$.

Na sliki 18 lahko spremljamo spreminjanje atomskega razmerja C/N v suspendirani snovi po globini za mesec oktober in december. Lepo se vidi usklajenost v spodnjih plasteh, medtem ko se proti površju razmerja bolj razlikujejo. Opazno je zlasti hitro povišanje C/N razmerja decembra na globini 10 m na vrednost 9,5. Decembra so razmerja večinoma višja, kar pomeni, da je v vzorcih več organskega ogljika kot dušika. Od globine 20 m dalje navzdol lahko trdimo, da se razmerje v splošnem povišuje, z edino izjemo na 24 m, kjer dosežeta vrednosti za oktober in december tudi svoje najnižje vrednosti (6,1 in 7,3). Na globini 28 m doseže razmerje C/N v decembru najvišjo vrednost (10,9). Zanimivo je, da so oktobra C/N vrednosti z največje globine (8,5) primerljive s tistimi na vrhu vodnega stolpca (8,6).



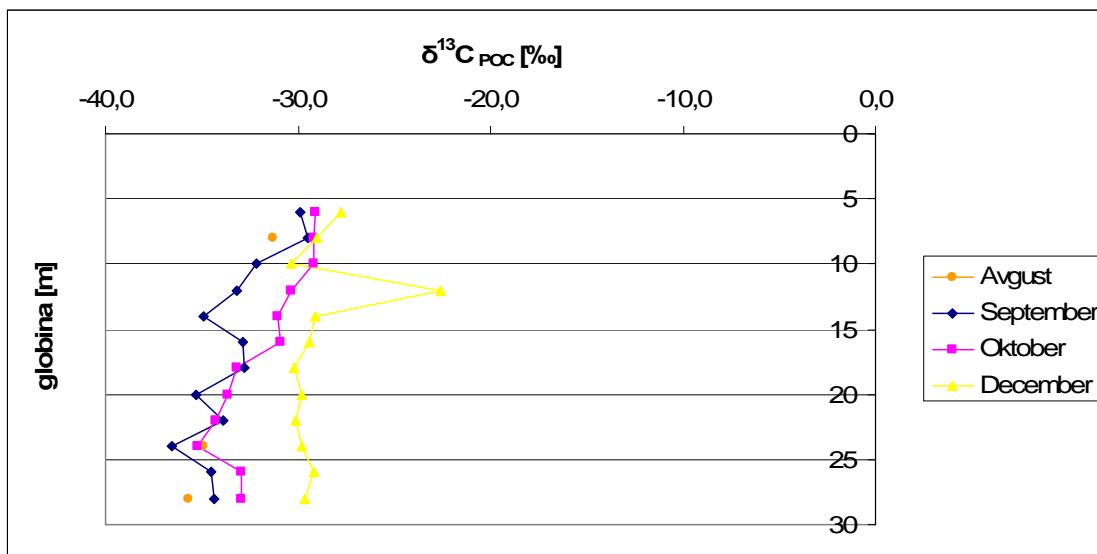
Slika 15: Spreminjanje C/N razmerja po vodnem stolpcu Blejskega jezera v mesecu oktobru in decembru 2008

Vendar razmerje C/N ni edini pokazatelj sprememb procesov v jezeru. Še bolj neposredna je izotopska sestava suspendirane snovi, še posebej v povezavi z že prej opisanimi dejavniki, predvsem koncentracijami dušikovih zvrsti in izotopsko sestavo nitrata. Slika 16 kaže, kako se po globini spreminja delež težjega ogljikovega izotopa v suspendirani organski snovi, slika 17 pa enako spreminjanje težjega dušikovega izotopa v suspendirani organski snovi. Prvi vtis je, da se δ vrednosti v obeh primerih manjšajo, kar je pričakovano.

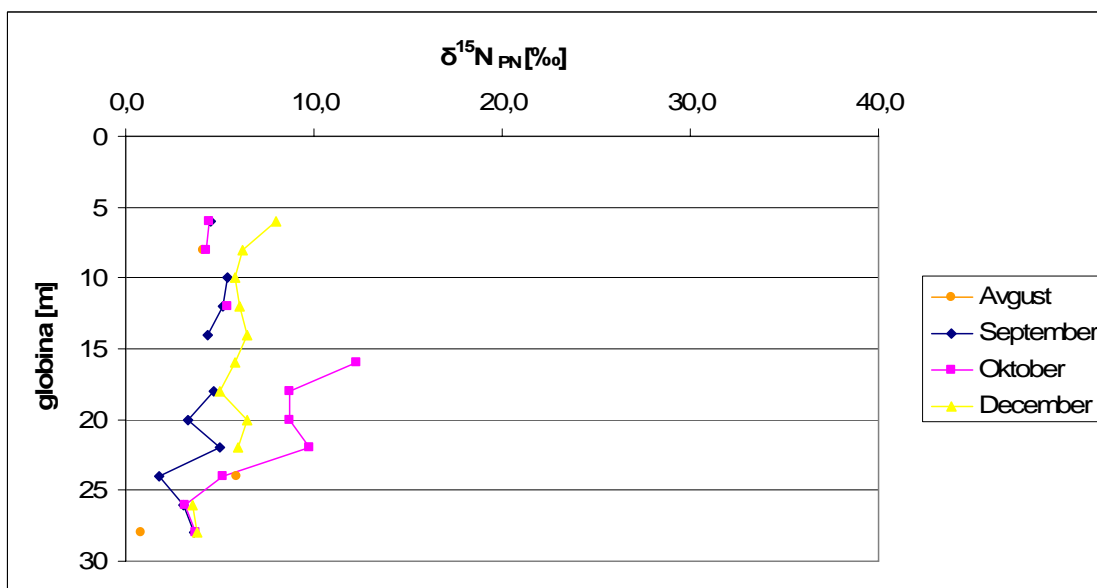
Pri ogljiku so vrednosti razporejene tudi tako, da se, vsaj pod termoklino, izotopska sestava suspendirane snovi manjša hkrati z nastopom hladnih mesecev. Opazen je tudi enkraten padec na globini 12 m v decembru z $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ vrednostjo $-22,6\text{‰}$. Sicer velikih nihanj ni opaziti, od vseh mesecev najbolj izstopa september po hitrih spremembah v kratkih intervalih po globini, kjer se $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ vrednosti spreminjajo iz približno -33‰ na -35‰ in nazaj. Vidi se, da so si vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ v septembru in oktobru med seboj bolj podobne kot z decembrom. Zgornje plasti imajo precej podobno izotopsko sestavo v vseh mesecih vzorčevanja. Gre za interval $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ vrednosti med $-27,7\text{‰}$ (december) ter $-29,9\text{‰}$ (september).

Pri dušiku je opazno predvsem veliko povišanje vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ oktobra pod termoklino z vrednostjo $12,2\text{‰}$ ter dejstvo, da z izjemo avgusta, na globini 28 m vrednosti konvergirajo k $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ vrednostim med $3,6\text{‰}$ in $3,8\text{‰}$. Očitno je, da sta dinamiki ogljika in dušika precej različni. V tem primeru dobimo vtis, da so si gibanja izotopskih sestav po mesecih med seboj manj podobna.

Suspendirana snov se oktobra intenzivno obogati s težjim izotopom dušika med 12 m in 16 m in doseže vrednost $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ $12,2\text{‰}$ ter potem enakomerno pada proti končni vrednosti $3,7\text{‰}$. Med temi globinami smo ne le oktobra, temveč tudi v drugih mesecih opazili povečano pogostost sprememb, bodisi v koncentracijah, izotopski sestavi ogljika in drugih parametrih. Izotopske vrednosti za dušik so $4,5\text{‰}$ na globini 5 m za meseca september in oktober ter 8‰ za december in nato pod termoklino zlagoma padajo proti končni vrednosti $3,6\text{‰}$ (september in oktober).



Slika 16: Spreminjanje izotopske sestave ogljika v suspendirani snovi po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih



Slika 17: Spreminjanje izotopske sestave dušika v suspendirani snovi po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih

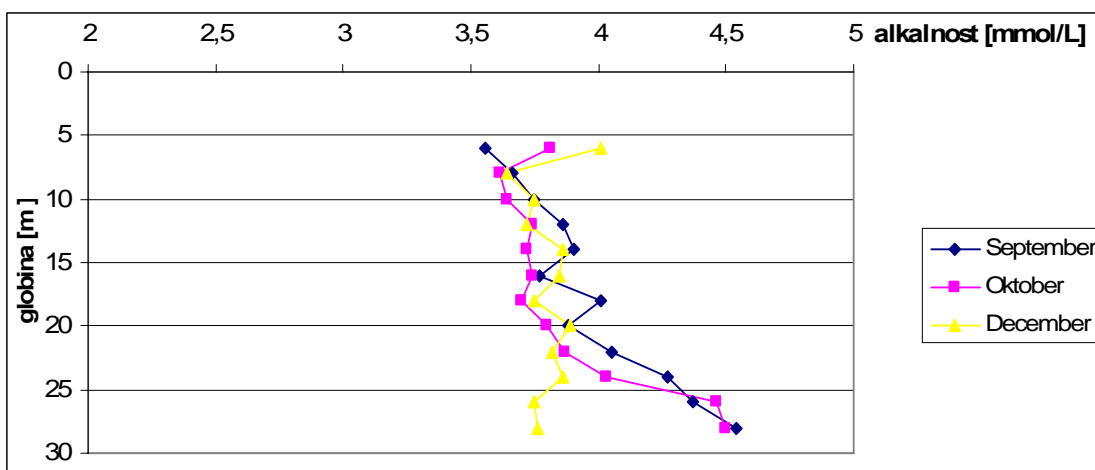
4.4 Alkalnost in $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$

Na sliki 18 lahko spremljamo spreminjanje alkalnosti po globini. Septembra naraste za eno enoto (iz 3,5 mmol/L na 4,5 mmol/L), oktobra pa naraste iz 3,8 mmol/L na 4,5 mmol/L. Decembra ostajajo vrednosti alkalnosti med 4,0 mmol/L in 3,75 mmol/L. Razlika od ostalih dveh mesecev je tudi v tem, da decembra vrednosti padajo in ne naraščajo. Kljub temu imajo

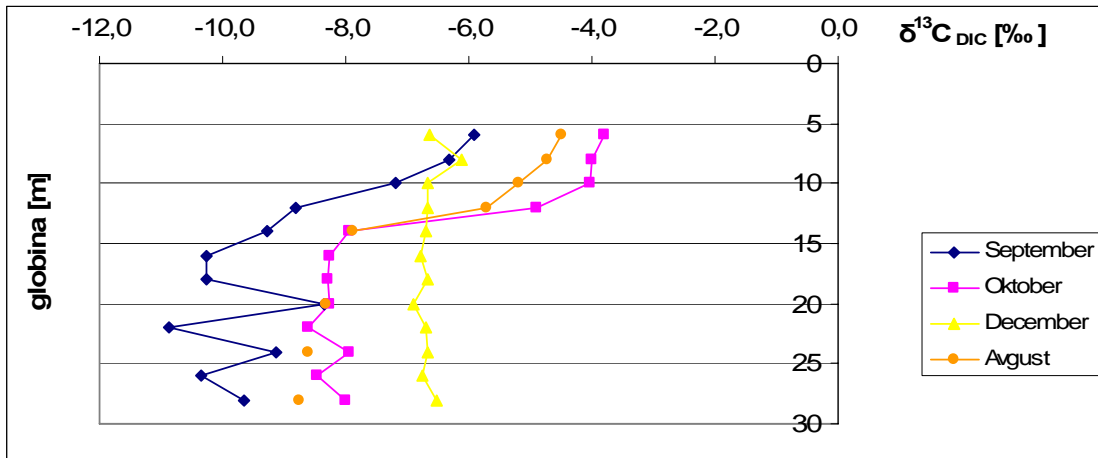
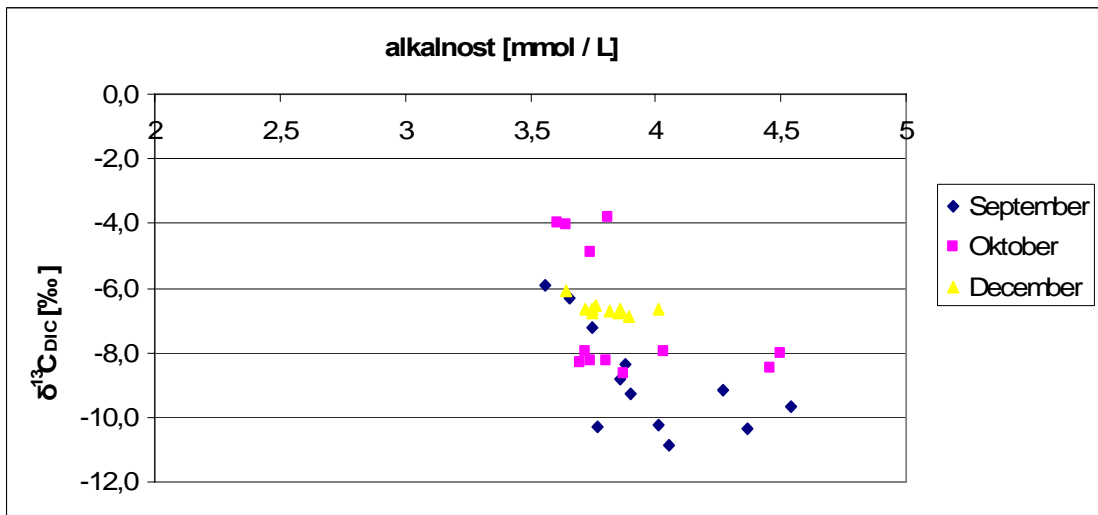
vsi trije meseci podobna povprečja; september $4,0 \pm 0,3$ mmol/L, oktober $3,9 \pm 0,3$ mmol/L in december $3,8 \pm 0,1$ mmol/L. Septembra je opazno tudi intenzivnejše nihanje med globinami 14 m in 20 m.

Slika 19 prikazuje spreminjanje $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ po profilu vodnega stolpca. Tudi tu se vrednosti DIC decembra ne spreminjajo mnogo, vendar kažejo padajoč trend v poletnih in jesenskih mesecih. $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ je najbolj homogen decembra ter ima večino vrednosti koncentriranih okoli povprečja $-6,6 \pm 0,2$ ‰. Septembra in oktobra lahko podatke smiselno ločimo v dve skupini, nad in pod termoklino. V obeh primerih so vrednosti nad termoklino višje kot pod njo. Septembra imajo povprečje $-7,1 \pm 1,3$ ‰, oktobra pa $-4,2 \pm 0,5$ ‰. Pod termoklino so septembrske vrednosti zbrane okoli $-9,8 \pm 0,8$ ‰, oktobrske pa okoli $-8,2 \pm 0,2$ ‰. Največja nihanja kažejo septembrske vrednosti v hipolimniju.

Na sliki 20 je prikazana odvisnost $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ od alkalnosti. Slednja je močno odvisna od koncentracije raztopljenega CO_2 v vodi. Izvori ogljikovega dioksida so različni, zato lahko iz izotopske vrednosti DIC sklepamo na njegov izvor. Opazimo, da je variabilnost $\delta^{13}\text{C}$ večja kot variabilnost alkalnosti in da alkalnost narašča z globino. To lahko razložimo z večjim zastajanjem HCO_3^- v globini, kjer je metabolna aktivnost manjša, kot v višjih plasteh jezera. Septembra in oktobra je opazimo, da se vsebnost $\delta^{13}\text{C}$ v DIC vedno bolj niža, medtem ko se alkalnost veča.



Slika 18: Spreminjanje alkalnosti po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih

Slika 19: Spreminjanje $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ po vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecihSlika 20: $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ v odvisnosti od alkalnosti v vodnem stolpcu Blejskega jezera v vzorčevalnih mesecih

5 RAZPRAVA

5.1 Spremembe fizikalnih in kemijskih parametrov v vodnem stolpcu

Višek koncentracije kisika (slika 5) avgusta 2008 na globini 8 m lahko obrazložimo s prisotnostjo in veliko aktivnostjo fotosintetskih organizmov. Kasnejši hiter padec koncentracije raztopljenega kisika lahko pripišemo temu, da v globini ni več veliko svetlobe (voda je precej motna), od vidnega spektra še najbolje prodira modro-zelena svetloba z valovno dolžino okoli 480 nm. Predvidevamo tudi, da je vrsti svetlobe prilagojena tudi vrstna sestava avtotrofov z različnimi fotosintetskimi pigmenti. Hkrati s padanjem temperature in koncentracije hranil se manjša tudi metabolna aktivnost organizmov; termo- in nitriklina se ujemata. Takoj pod vodno gladino je opazen nizek padec koncentracije raztopljenega kisika, kar bi lahko bilo znamenje fotoinhibicije; pojava, ko velika intenziteta svetlobe neugodno vpliva na sposobnost fotosinteze. Tekom vseh treh mesecev (slika 6) opazujemo, kako postaja termoklina postopoma manj izrazita, v decembru pa je vodni stolpec že popolnoma premešan. To je v skladu s pričakovanji in se ujema tudi z drugimi raziskavami (Hodell in Schelske, 1998; Teranes in Bernasconi, 2000; Lehmann in sod., 2004; Hadas in sod., 2009).

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je jezero v času stratifikacije možno obravnavati kot dva ločena sistema; epilimnij in hipolimnij. Za prvega je značilna večja dovzetnost za zunanje vplive kot so vnos alohtone snovi s spiranjem ali padavinami ter fiksacija dušika. Značilno je tudi intenzivnejše privzemanje nitrata za potrebe primarne produkcije (Lehmann in sod., 2002).

Hipolimnij se obnaša kot zaprt ekosistem, ki izmenjuje le malo snovi, veliko pa se je reciklira. Če obstajata, sta resuspenzija ali difuzija iz sedimenta lahko pomembna dejavnika, sicer pa se v ta del jezera vnaša nova snov s sedimentacijo delcev iz epilimnija. Možen je tudi začasen prehod živih organizmov kot del njihovega dnevnega ritma.

5.2 Kroženje in izvor dušika v Blejskem jezeru

Izmerjene $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ v epilimniju podpirajo hipotezo, da nitrat v Blejskem jezeru večinoma izvira iz razgrajevanja organske snovi. Zaradi umetnih posegov spada od leta 1985 dalje med mezotrofna jezera. Vnos komunalnih odpadkov se je v tem času zmanjšal za 80 % (Remec-Rekar in Bat, 2003). Owens (1987) opaža vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v odpadkih (med 2 ‰ in 4 ‰) podobne tistim, ki smo jih izmerili v suspendirani snovi v epilimniju meseca oktobra (slika 20).

Decembrsko znižanje izotopske sestave nitrata lahko obrazložimo najprej z razgradnjo, nato pa z nitrifikacijo izotopsko težje organske snovi, ki je tonila. To tezo podpirajo tudi koncentracije amonija v decembru (slika 9). Le-te se skladajo z vrednostmi, ki so jih izmerili Hadas in sod. (2009), a so v nasprotju z rezultati Lehmann in sod. (2004). Nitrifikatorji bi lahko amonij konstantno porabljali, heterotrofna združba pa bi bila ob podobnih metabolnih hitrostih njegov vir (Gardner in sod., 1987).

Iz podatkov o izotopski sestavi suspendirane organske snovi lahko zaključimo, da fiksacija atmosferskega dušika v Blejskem jezeru ne predstavlja bistvenega vira dušika za fitoplankton

ali cianobaterije v epilimniju. Kot smo že omenili, fiksacija proizvede organsko snov, ki ima 1 – 2 ‰ manj težjega izotopa, kot je v atmosferi, naše vrednosti pa se septembra in oktobra gibljejo med 4,3 ‰ in 5,4 ‰ v epilimniju (slika 17).

Hkrati z omenjenimi vrednostmi v prid naši hipotezi govorita še koncentraciji nitrata in amonija (sliki 8 in 9), ki nista nikdar padli pod mejo 6,5 $\mu\text{mol/L}$ in s tem nista bili limitna dejavnika. Fiksacija dušika je energetsko bolj zahteven proces kot asimilacija in poteka le, ko ostali viri dušika niso na razpolago. Primerljive rezultate so dobili Lehmann in sod. (2004). Hadas in sod. (2009) so izmerili $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ vrednosti 3,3 ‰, ki so jih lahko zaradi prisotnosti diazotrofov pripisali fiksaciji. Na globini 10 m bi bil septembra lahko razlog za nenaden padec v koncentraciji nitrata prav njegova intenzivna asimilacija.

Predvidevamo, da je primarni vir dušika za suspendirano organsko snov nitrat (Hodell in Schelske, 1998; Teranes in Bernasconi, 2000; Lehmann, 2002; Lehmann in sod., 2004;). Pričakujemo, da bo izotopska sestava suspendiranega dušika (PN) od izotopske sestave NO_3^- v povprečju nižja zaradi frakcionacijskega faktorja, ki spremlja asimilacijo (Lehmann, 2002; Lehmann in sod., 2004; Hadas in sod., 2009). V našem primeru pa je izotopska sestava nitrata nižja od suspendirane snovi. V oktobru je v epilimniju v povprečju nižja za 4,3 ‰, decembra pa za 2,3 ‰. Za september nimamo dovolj podatkov. V nadaljevanju iščemo obrazložitev za omenjeno odstopanje.

Izotopska sestava nitrata se oktobra giblje pri negativnih vrednostih ali vrednostih blizu 0 ‰. Ostrom in sod. (1998) so nizko izotopsko sestavo pripisali atmosferski depoziciji z dežjem. Na Bled in okolico je oktobra 2008 padlo približno 250 mm dežja na kvadratni meter, kar ne odstopa od dolgoletnega povprečja (Naše okolje ... , 2008). Pred našim vzorčenjem 24. 10. 2008 tudi ni bilo večjih padavin. V noči od 16. 10. na 17. 10. in tega dne je padlo na merilno mesto Bled-Mlino 4,8 mm dežja, do vzorčenja pa ni več deževalo (Zupančič, osebni vir).

V morskem okolju, kjer je bilo narejenih več obsežnejših študij, obstaja jasna povezava med $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ in porabo nitrata (Altabet in François, 1994; Altabet, 1996; Meyers in Teranes, 2001). Razlog je v dejstvu, da je v morju dušik ponavadi limitni element. V jezerih je to fosfor (v obliki fosfata) in se te povezave pogosto ne kažejo jasno, čeprav so jih že dokazali (Teranes in Bernasconi, 2000).

V jezerih s kratkimi zadrževalnimi časi se enkratni vnosi alohtone snovi z zelo drugačno izotopsko sestavo jasno odražajo v izotopski sestavi nitrata v epilimniju (Teranes in Bernasconi, 2000). Vendar Blejsko jezero nima večjih pritokov in odtokov, se pa je z dotokom Radovne in instalacijo natege zadrževalni čas skrajšal na 1,1 leta. Pred posegi je bil ocenjen na 4 leta (Remec-Rekar in Bač, 2003). To kaže na veliko večje recikliranje dušika kot to velja za druga jezera (Bernasconi in sod., 1997; Hodell in Schelske, 1998; Teranes in Bernasconi, 2000; Lehmann in sod., 2004; Hadas in sod., 2009). Zato bi moral biti zunanji vnos materiala zelo velik (kar bi se poznalo na koncentracijah) ali pa bi moral imeti izjemno drugačno izotopsko sestavo (kar bi se poznalo na meritvah izotopov).

Poleg že omenjenih potencialnih izvorov dušika v suspendirani organski snovi v epilimniju nam lahko dodatno informacijo ponudi tudi obogatitveni faktor ϵ , ki pokaže povezavo med $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ v suspendirani snovi in porabo nitrata (Voss in sod., 1996). Ker fitoplankton med rastjo preferenčno vgrajuje ^{14}N , bi morala relacija med $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ v suspendirani snovi in koncentraciji

nitrate slediti Rayleighjevi kinetični frakcionaciji (Altabet in François, 1994). Z modelom Rayleighjeve destilacije opišemo spremembo izotopske sestave substrata in nastalega produkta pri asimilaciji dušika z naslednjo enačbo:

$$\delta^{15}N_{NO_3-(f)} = \delta^{15}N_{NO_3-(f-1)} - \varepsilon \cdot \ln(f) \quad \dots (8)$$

in za nastali organski produkt dobimo enačbo:

$$\delta^{15}N_{PN} = \delta^{15}N_{NO_3-} + \varepsilon \quad \dots (9)$$

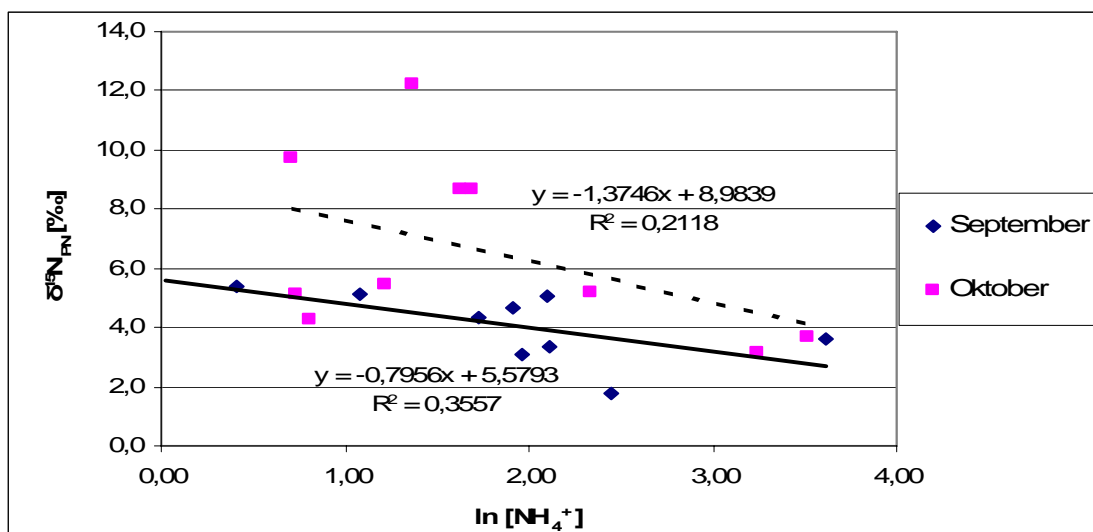
kjer je f ostanek frakcije NO_3^- , ε je biološki frakcionacijski faktor porabe NO_3^- za fitoplankton izražen v ‰, $\delta^{15}N_{PN}$ in $\delta^{15}N_{NO_3-}$ pa sta izotopska sestava dušika v suspendirani snovi in nitratu, oba v ‰. Enačbi zahtevata linearno povezavo med vrednostmi $\delta^{15}N_{PN}$ in $\ln[NO_3^-]$, kjer naklon premice predstavlja frakcionacijski faktor ε . Iz enačbe 9 je razvidno, da frakcionacijski faktor lahko določimo tudi iz linearne povezave med $\delta^{15}N_{PN}$ in $\delta^{15}N_{NO_3-}$. Poudariti je potrebno, da Rayleighov model opisuje sistem, ki ima količino reaktanta omejeno. V našem primeru imamo stalen doprinos nitrata, kar pomeni, da je izračunan frakcionacijski faktor le približen.

Iz rezultatov (priloge D, E in F) sledi, da so povezave med $\delta^{15}N_{PN}$ in logaritma koncentracij nitrata pozitivne ter da asimilacija nitrata nima primarnega vpliva na izotopsko sestavo suspendirane snovi jeseni in pozimi. Prav tako naklon premice ne ustreza biološkemu obogatitvenemu faktorju. Edina izjema je sprememba koncentracije nitrata septembra na 10 m, ki kaže nenaden padec, najverjetneje zaradi intenzivne asimilacije.

Podobne odvisnosti so opazili v jezeru Lugano v Švici (Bernasconi in sod., 1997; Lehmann in sod., 2004). Rezultati raziskav v drugih jezerih pa kažejo drugačne odvisnosti med $\delta^{15}N_{PN}$ in koncentracijami nitrata. V teh primerih so $\delta^{15}N_{PN}$ vrednosti negativno odvisne od koncentracije nitrata, torej je prisotna asimilacija nitrata (Wharton in sod., 1993; Teranes in Bernasconi, 2000).

Vzroki za odstopanja so še vedno nejasni. Lehmann in sod. (2004) navajajo naslednje možne razloge za odsotnost sklopitve: nekonstanten frakcionacijski faktor med privzemom nitrata, drugi viri dušika (NH_4^+ , N_2), vnos alohtonega nitrata ali organske snovi, intenzivnejša nitrifikacija, razgrajevanje organske snovi ter po premešanju vodnega stolpca tudi vpliv organske snovi iz hipolimnija. Možna in precej verjetna je tudi sprememba v vrstni sestavi cianobakterij in fitoplanktona ter sprememba rastnih pogojev, od katerih je frakcionacijski faktor precej odvisen (Faganeli in sod., 1989; Montoya in McCarthy, 1995; Hadas in sod., 2009).

Nitrifikacija močno obogati amonij s težjim izotopom. Oktobra in decembra je to očitno do globine 10 m. Zdi se, da je bolj kot nitrat, vir dušika verjetno predstavljal amonij. To hipotezo podpira več dejstev.



Slika 21: $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ v odvisnosti od $\ln[\text{NH}_4^+]$ septembra in oktobra 2008. Naklon premice predstavlja obogatitveni faktor ϵ

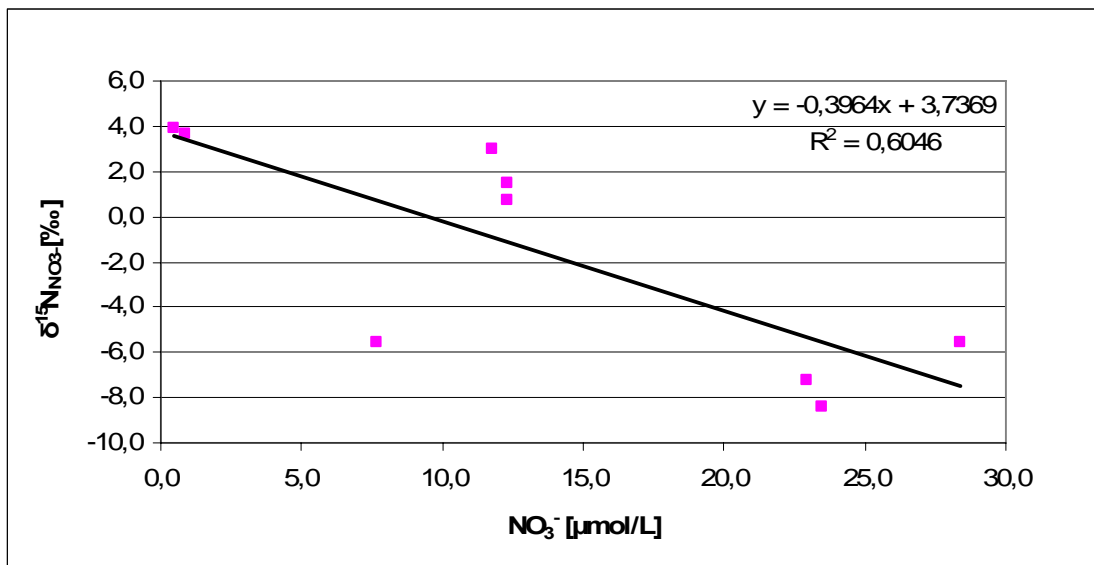
Slika 21 kaže negativno linearno odvisnost med $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ vrednostmi in $\ln[\text{NH}_4^+]$ v septembru in oktobru, ki pomeni, da vir dušika v obeh mesecih res predstavlja amonij. V decembru povezav med $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ vrednostmi in $\ln[\text{NH}_4^+]$ nismo zasledili. Frakcionacijska faktorja povezana z asimilacijo amonija sta ocenjena na $-0,8\text{‰}$ v septembru in $-1,4\text{‰}$ v oktobru.

Primerjava koncentracij amonija med jesenskimi in zimskim vzorčenjem kaže, da se je amonij jeseni intenzivneje porabljal. Če bi bil glavni ponor amonija nitrifikacija, bi se to poznalo na nižjih izotopskih vrednostih nitrata in posledično na še nižjih izotopskih vrednostih suspendirane snovi. Slednje pa so višje od vrednosti v nitratu, kar kaže na vir dušika, ki je obogaten s težjim izotopom. Ker ni podatkov o izotopski sestavi amonija, o tem ne moremo govoriti z zanesljivostjo.

Nitrifikacija je bila intenzivnejša med globinami 12 m in 18 m, ko je jasen padec $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$. in porast njegove koncentracije v septembru in oktobru.

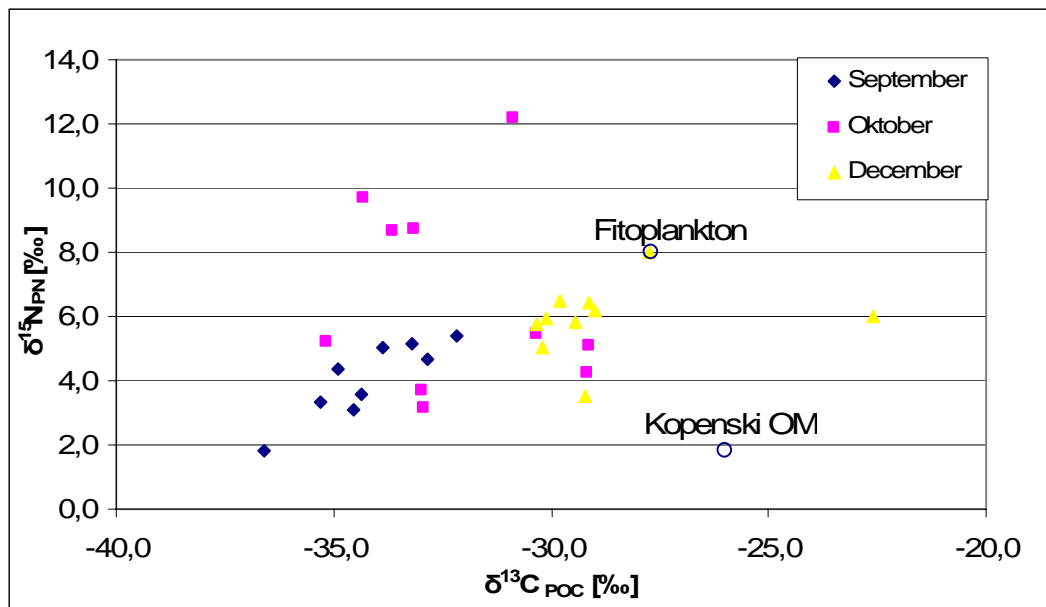
Suspendirana organska snov kaže podoben trend v hipolimniju. Čeprav je opazna jasna povezava med porabo nitrata in večanjem njegove izotopske sestave v oktobru (slika 22), še vedno ni korelacije med koncentracijo nitrata ter izotopsko sestavo suspendirane snovi.

Denitrifikacija v vodi bolj vpliva na izotopsko sestavo nitrata v jezeru kot denitrifikacija v sedimentu (Lehmann in sod., 2004, Hadas in sod., 2009). Iz odvisnosti med $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ -vrednostmi in koncentracijo raztopljenega nitrata lahko ugotovimo ali je naraščanje $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ -vrednosti posledica denitrifikacije ali mešanja nitrata iz različnih virov. Iz slike 22 je razvidna močna povezanost med $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ -vrednostmi in koncentracijo nitrata ($r^2 = 0,60$). $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ -vrednosti padajo z naraščanjem koncentracije nitrata, kar nakazuje na proces denitrifikacije prisotne v jezeru v mesecu oktobru. V mesecu decembru te povezave nismo zasledili. Iz rezultatov lahko zaključimo, da v času vzorčevanja v Blejskem jezeru ni opaziti vpliva nitrata, ki bi lahko bil posledica kanalizacijskih izpustov ali kmetovanja.

Slika 22: $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ vrednosti v odvisnosti od koncentracije NO_3^- oktobra 2008

5.3 Izvori suspendirane organske snovi v Blejskem jezeru

Podatki o izotopskih sestavah dušikovih in ogljikovih zvrsti, prav tako pa tudi njihove koncentracije kažejo, da je bila jeseni in pozimi leta 2008 organska snov v Blejskem jezeru avtohtonega izvora. To potrjujejo razmerja C/N (slika 15), ki v epilimniju ne presežejo vrednosti 8, ki je značilna za planktonsko jezersko populacijo (Teranes in Bernasconi, 2000). Vnosi kopenske rastlinske snovi imajo C/N razmerje višje od 20 (Lehmann in sod., 2004). V podporo so tudi $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ vrednosti (slika 19), ki so blizu -27‰ in so podobne vrednostim fitoplanktona določenega v jezeru ($\delta^{13}\text{C} = -27,7\text{‰}$; Čermelj in sod., 1996). Na podlagi $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ vrednosti ne moremo zanesljivo določiti izvora organske snovi, ker je razpon $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti tipične za fitoplanktom velik in se giblje med $+2$ in $+14\text{‰}$ (Gu in sod., 1993). Druge raziskave navajajo vrednosti, ki so še nižje od $-2,4$ in $-0,2\text{‰}$ (François in sod. 1996). Vrednosti $\delta^{15}\text{N} < 0$ so tipične za cianobakterije. Iz grafa, kjer nanašamo vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ v odvisnosti od $\delta^{13}\text{C}$ v suspendirani snovi (slika 23), bi lahko določili različne izvore organske snovi. Na grafu smo označili dve ključni točki, ki določata izvor organske snovi: kopensko organsko snov z $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo -26‰ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednostjo $+2\text{‰}$ in fitoplanktonsko organsko snov z $\delta^{13}\text{C}$ vrednostjo $-27,7\text{‰}$ (Čermelj in sod., 1996) in $\delta^{15}\text{N}$ vrednostjo $+8\text{‰}$, kjer smo privzeli povprečno vrednost razpona določenih $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti za fitoplankton v jezerskem okolju. Iz slike 23 je razvidno, da se večina rezultatov nahaja v območju z nižjimi $\delta^{13}\text{C}$ vrednostmi kot sta izbrani točki, kar pomeni, da na izotopsko sestavo ogljika vpliva tudi izvor DIC, ki ga fitoplankton črpa iz vodnega stolpca, medtem ko so vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ med mejnima točkama.



5.4 Vloga fosforja

Za jezerska okolja običajno velja, da je limitni faktor fosfor in ne dušik, kot je to v morjih (Lehmann, 2002). O pomanjkanju fosforja govorimo, kadar je razmerje med suspendiranim dušikom in suspendiranim fosforjem večje od 16 (po Redfieldu).

Vrednosti razmerij med nitratom in fosfatom so veliko višje od prej omenjenega mejnega razmerja. Denitrifikacija je najbolj verjetni razlog za hitro manjšanje, malodane uravnoveženje koncentracij fosfata in nitrata v globinah 26 in 28 metrov. Višje v vodnem stolpcu se večina fosforja porabi oz. asimilira.

Izgleda, da je v Blejskem jezeru fosfor limitni dejavnik primarne produkcije.

6 SKLEPI

Analize kemijskih in fizikalnih parametrov so nam pokazale, da lahko jezero v času stratifikacije obravnavamo kot dva ločena sistema; epilimnij in hipolimnij. To so kasneje potrdile tudi analize izotopske sestave $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$. Epilimnij je bolj dovzeten za vplive alohtonih dejavnikov, hipolimnij pa se obnaša kot zaprt sistem, kjer se večina glavnih nutrientov regenerira. Iz rezultatov lahko zaključimo:

- Rezultati meritev izotopske sestave nitrata ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$) in suspendirane snovi ($\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$) izključujejo nitrat kot glavni vir dušika v suspendirani snovi zaradi njegove nizke izotopske sestave v času vzorčenja. To hipotezo zavračajo tudi pozitivne linearne povezave med $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ in $\ln[\text{NO}_3^-]$ v modelu Rayleighjeve destilacije. Čeprav nismo izmerili izotopske sestave amonija, kaže negativna linearna povezava med $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ in $\ln[\text{NH}_4^+]$ na amonij kot glavno asimilacijsko obliko dušika. Ta sklep podpirajo tudi vrednosti koncentracij različnih dušikovih zvrsti.
- Iz izvora nitrata in porabe amonija za vir dušika v suspendirani snovi septembra in oktobra sledi, da je bila organska snov avtohtonega izvora. To podpirajo tudi analize razmerja med ogljikom in dušikom (C/N (at)) ter $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ suspendirane organske snovi, ki so bile značilne za planktonsko jezersko populacijo.
- Izotopska sestava dušika v suspendirani snovi ($\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$) zavrača hipotezo, da bi bila fiksacija atmosferskega dušika pomemben vir tega elementa. To podpirajo tudi meritve koncentracij nitrata in amonija, ki niso bile v času našega vzorčenja nikoli limitne.
- Oktobra smo lahko potrdili, da je padec v koncentraciji nitrata in njegova obogatitev s težjim dušikovim izotopom posledica aktivne denitrifikacije v vodnem stolpcu. Decembra te povezave nismo mogli potrditi, za ostale mesece pa imamo premalo podatkov. Nitrat v jezeru je najverjetneje rezultat razgrajevanja organske snovi. Vsaj v času vzorčevanja na izbrani točki ni bilo vidnih vplivov komunalnih odplak ali kmetovanja na bilanco dušika v Blejskem jezeru.
- Tekom vzorčenja se je pokazal padec v intenziteti procesov z nastopom hladnejših mesecev. To je bilo razvidno predvsem iz odsotnosti nihanj kemijskih parametrov ter izotopskih sestav po profilu vodnega stolpca.
- Meritve fosforjevih zvrsti nakazujejo, da je v Blejskem jezeru fosfor limitni dejavnik, ki uravnava primarno produkcijo.

7 POVZETEK

Kroženje dušika v jezerskih ekosistemih je bistvenega pomena za celostno razumevanje procesov, ki v njih potekajo. Čeprav so jezera v primerjavi z oceanskimi, morskimi ali priobalnimi področji še vedno razmeroma slabo raziskana, se stanje izboljšuje. Jezera nudijo vpogled v zgodovino eutrofikacije (in s tem antropogenega vpliva) določenega območja, poleg tega pa so tudi edinstven modelni sistem za preučevanje naravnih procesov, saj so običajno zadrževalni časi vode in v njej raztopljenih snovi daljši kot v prej omenjenih ekosistemih.

Kroženje dušika je v splošnem bolj kompleksno od kroženja ogljika. Glavni procesi, ki jih lahko pričakujemo v jezerskem okolju, predvsem v vodnem stolpcu so: fiksacija, amonifikacija, asimilacija, imobilizacija, nitrifikacija in denitrifikacija. Med seboj so tesno prepleteni. Organizmi, ki vršijo te procese, lahko tekmujejo za isti substrat ali pa uporabljajo produkte določenih reakcij kot reaktante za druge. Večinoma so to bakterijsko vodeni procesi, pomembno vlogo pa igrajo tudi fitoplankton in arheje.

Danes lahko zanesljivo in hitro sledimo tem procesom z uporabo stabilnih izotopov. Interpretacija rezultatov je odvisna od poznavanja procesov in dobrega predvidevanja možnih izidov. Tako kot pri kroženju ogljika in dušika tudi tu velja, da so spremembe izotopske sestave ogljikovih spojin lažje sledljive in bolj enoznačne kot spremembe v izotopski sestavi dušikovih spojin. Vsi naravni procesi (encimske reakcije) raje uporabljajo lažje izotope (^{12}C , ^{14}N) kot težje (^{13}C , ^{15}N). Razlog za tako diskriminacijo med izotopi je kinetični izotopski efekt. Za lažjo predstavo izražamo izotopske efekte s frakcionacijskim faktorjem α ali z obogatitvenim faktorjem ϵ . Podatki o izotopski sestavi nam ne posredujejo samo informacij o nekem procesu temveč lahko mnogo izvemo tudi o izvoru snovi, ki jo preučujemo.

V tej diplomski nalogi smo želeli s spremljanjem fizikalno-kemijskih parametrov in izotopske sestave dušikovih spojin ugotoviti izvor dušika v vodnem stolpcu Blejskega jezera ter identificirati najaktivnejše mikrobne procese v vzorčevalnem obdobju od septembra do decembra 2008. Za zagotavljanje dodatnih informacij smo merili tudi izotopsko sestavo določenih ogljikovih zvrsti in koncentracije fosforja. Poseben poudarek smo dali denitrifikaciji, saj smo poskusili ugotoviti ali lahko pride do denitrifikacije tudi izven sedimenta v anoksičnih delih vodnega stolpca.

Rezultati analiz kažejo, da je bilo Blejsko jezero v času vzorčenja stratificirano in da se epilimnij in hipolimnij obnašata kot dva različna sistema iz vidika kroženja nutrientov. Ko je z nastopom zimskih mesecev termoklina izginila, se je vodni stolpec premešal, z njim vred pa tudi v vodi raztopljene snovi. Opazili smo upad v obsegu procesov, kar se je pokazalo predvsem v odsotnosti gradientov temperature, koncentracij dušikovih spojin in njihove izotopske sestave. Določeni procesi, predvsem razgradnja organske snovi, so potekali kljub nizkim temperaturam. Razgradnjo smo lahko identificirali na podlagi izotopske sestave nitrata ($\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$), ki je zlagoma padala in dosegla najnižjo vrednost -10,3 ‰. V nadaljevanju smo ugotovili, da NO_3^- ni vir dušika za suspendirano snov, temveč se najverjetneje asimilira amonij. Pri njegovi asimilaciji je obogatitveni faktor ocenjen na -0,8 ‰ septembra in -1,4 ‰ oktobra. Zaradi analitskih težav nismo uspeli izmeriti izotopske sestave amonija in nove teze nedvoumno potrditi. Kljub temu ni smiselno, da bi amonij bil edini vir dušika v suspendirani

snovi. V literaturi najdemo tudi druge alternativne hipoteze za primere, da asimilacija nitrata ni glavni vir dušika, od katerih lahko je za Blejsko jezero bolj verjetna sprememba v vrstni sestavi mikrobne in fitoplanktonske populacije. Niti nitrat niti amonij nista bila nikoli limitna, koncentracije fosforjevih zvrsti in razmerja med dušikovimi in fosforjevimi zvrstmi pa so pokazale primanjkljaj slednjih, predvsem fosfata. Podatki kažejo, da je v Blejskem jezeru fosfor limitni dejavnik, kar je tudi sicer značilno za jezera.

Oktober smo potrdili denitrifikacijo v vodnem stolpcu. Koeficient diskriminacije (r^2) znaša 0,60. Decembra denitrifikacije nismo mogli potrditi, kar smo tudi pričakovali.

S sintezo podatkov smo prišli do sklepa, da je bila v vzorčevalnem obdobju organska snov avtohtonega izvora, kar med drugim potrjujejo C/N razmerja, ki niso presegla vrednosti 8. Tudi vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ podpirajo ta zaključek. Vrednost $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ 1,8 ‰ na globini 28 m v avgustu je značilna za bakterijsko heterotrofno združbo. V ostalih mesecih je ta signal verjetno zakrila toneča organska snov. To ni presenetljivo, saj je naše vzorčevalno obdobje sledilo poletno-jesenskemu višku primarne produkcije. Meritve izotopske sestave ogljika kažejo, da je bil glavni vir ogljika za suspendirano organsko snov v hipolimniju razgradnja organske snovi, ki se kaže v nizki izotopski sestavi hidrogenkarbonatnega iona in povečani alkalnosti. V epilimniju je glavni vir ogljika raztopljeni CO_2 .

Ob dejstvu, da gre za prve raziskave na Blejskem jezeru na področju kroženja dušika, bi bilo potrebno opraviti dodatne meritve za potrditev naših rezultatov. Predvsem bi bilo potrebno uporabiti primeren proces priprave vzorcev za določanje izotopske sestave dušika v amoniju. Tako bi dobili pomemben del podatkov o kroženju in izvoru dušika. Priprave vzorcev z ionskimi izmenjevalci, izhlapevanjem in z zeoliti so se (zaenkrat) izkazale kot neuspešne. Opisane postopke smo v Sloveniji sicer prvič uporabili za analizo jezerskih vod.

Kljub omenjenim primanjkljajem smo lahko vseeno ovrednotili določene procese in odprli nova vprašanja o razumevanju kroženja dušika v Blejskem jezeru.

8 VIRI

- Altabet M. A., François R. 1994. Sedimentary nitrogen isotopic ratio as a recorder for surface ocean nitrate utilization. *Global Biogeochemical Cycles*, 8, 1: 103-116
- Altabet M. A. 1996. Nitrogen and carbon stable isotopic tracers of the source and transformation of particles in the deep sea. V: *Particle flux in the ocean*. Ittekkot V., Schäfer P., Honjo S., Depetris P. J. (eds.). New York, John Wiley & Sons Ltd: 155-183
- Bernasconi S. M., Barbieri A., Simona M. 1997. Carbon and nitrogen isotope variations in sedimenting organic matter in Lake Lugano. *Limnology and Oceanography*, 42, 8: 1755-1765
- Bled. 2008. Wikipedia.
<http://sl.wikipedia.org/wiki/Bled> (11. apr. 2009): 1 str.
- Bonin P., Omnes P., Chalamet A. 1998. Simultaneous occurrence of denitrification and nitrate ammonification in sediments of the french mediterranean coast. *Hydrobiologia*, 389: 169-182
- Brewer P. G., Peltzer E. T. 2009. Limits to marine life. *Science*, 324: 347-348
- Buick R. 2007. The earliest records of life on Earth. V: *Planets and life. The emerging science of astrobiology*. Sullivan W. T. III., Baross J. S. (eds.). Cambridge, Cambridge University Press: 237-264
- Canfield D. E., Kristensen E., Thamdrup B. 2005. The nitrogen cycle. V: *Aquatic geomicrobiology*. Southward A. J., Tyler P., Young, C. M., Fuiman L. A. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 205-267
- Carpenter E. J., Rodger Harvey H., Fry B., Capone D. G. 1997. Biogeochemical tracers of the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. Part 1. *Deep-Sea Research*, 44, 1: 27-38
- Casciotti K. L., McIlvin M. R. 2007. Isotopic analyses of nitrate and nitrite from reference mixtures and application to Eastern Tropical North Pacific. *Marine Chemistry*, 107: 184-201
- Cegnar T. Meteorologija: podnebne razmere v oktobru 2008. *Naše okolje. Bilten Agencije Republike Slovenije za okolje*, 15, 10: 3-35
http://www.arso.gov.si/o%20agenciji/knji%C5%BEnica/mese%C4%8Dni%20bilten/NASE%20OKOLJE2008_10.pdf (12. jun. 2009)
- Čermelj B., Faganeli J. 2003. Anoxic degradation of biogenic debris in sediments of eutrophic subalpine Lake Bled (Slovenia). *Hydrobiologia*, 494: 193-199
- del Giorgio P. A., France R. L. 1996. Ecosystem-specific patterns in the relationship between zooplankton and POM or microplankton $\delta^{13}\text{C}$. *Limnology and Oceanography*, 41, 2: 359-365
- Downs M., Michener R., Fry B., Nadelhoffer K. 1999. Routine measurement of dissolved inorganic ^{15}N in precipitation and streamwater. *Environmental Monitoring and Assessment*, 55: 211-220
- Faganeli J. 1999. Osnove geomikrobiologije in mikrobne biogeokemije. Študijsko gradivo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 175 str.

- Faganeli, J., Pezdič, J., Fanuko, N. 1989. Chemical and isotopic composition of some phytoplankton species. *Biološki vestnik*, 37: 9-18
- Fahrquhar G. D., Ehleringer J. R., Hubick H.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 503-537
- Fogel M. L., Cifuentes L. A. 1993. Isotope fractionation during primary production. V: *Organic geochemistry*. Engel M. H., Macko S. A. (eds.). New York, Plenum Press: 73-98
- Francis C. A. 2009. *Microbial nitrogen cycling*. Building, Stanford University. <http://pangea.stanford.edu/~caf/> (12. avg. 2009): 4 str.
- Francis C. A., Roberts K. J., Beman J. M., Santoro A. E., Oakley B. B. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 41: 14683–14688
- Gardner W. S., Nalepa T. F., Malczyk J. M. 1987. Nitrogen mineralization and denitrification in Lake Michigan sediments. *Limnology and Oceanography*, 32, 6: 1226-1238
- Gran G. 1952. Determination of the equivalence point in potentiometric titration II. *Analyst*, 77: 661-671
- Gu B. Schelske C.L., Brenner M 1996. Relationship between sediment and plankton isotope ratios (d13C and d15N) and primary productivity in Florida lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 875-883
- Hadas. O., Altabet M.A., Agnihitori R. 2009. Seasonally varying nitrogen isotope biogeochemistry of particulate organic matter in lake Kinneret, Israel. *Limnology and Oceanography*, 54, 1: 75-85
- Henriksen K., and Kemp W. M. 1988. Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. V: *Nitrogen cycling in coastal marine environments*. Blackburn T. H., Sørensen J. (eds.). New York, John Wiley & Sons: 207–249
- Hoch M. P., Fogel M. L., Kirchman D. L. 1992. Isotope fractionation associated with ammonium uptake by a marine bacterium. *Limnology and Oceanography*, 37, 7: 1447-1459
- Hodell D. A., Schelske C. L. 1998. Production, sedimentation and isotopic composition of organic matter in Lake Ontario. *Limnology and Oceanography*, 43, 2: 200-214
- Holloway J.M., Dahlgren R.A. 1999. Geological nitrogen in terrestrial biogeochemical cycling. *Geology* 27: 567-570
- Jones R. D., Morita R. Y. 1985. Low temperature growth and whole cell kinetics of a marine ammonium oxidizer. *Marine Ecology Progress Series*, 21: 239-243
- Khin T., Annachhatre A. P. 2004. Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*, 22: 519-532

Kukovec K. 2006. Frakcionacija stabilnih izotopov ogljika in dušika v fitoplanktonu Tržaškega zaliva. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 57 str.

Laws E.A., Popp B.N., Bidigare R.R., Kennicutt M.C., Macko S.A. 1995. Dependence of phytoplankton carbon isotopic composition on growth rate and $[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$: Theoretical considerations and experimental results. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59: 1131-1138

Lehmann M. F. 2002. Dynamics of the stable carbon and nitrogen isotope geochemistry in eutrophic Lake Lugano (Switzerland/Italy). Constraints on biogeochemical cycling in aquatic systems. Doctoral thesis. Zürich, Swiss Federal Institute of Technology Zürich, Geological Institute: 138 str.

Lehmann M. F., Bernasconi S. M., Barbieri A., McKenzie J. A. 2002. Preservation of organic matter and alteration of its carbon and nitrogen isotope composition during simulated and in situ early sedimentary diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66, 20: 3573-3584

Lehmann M. F., Bernasconi S. M., McKenzie J. A. 2001. A method for the extraction of ammonium from freshwaters for nitrogen isotope analysis. *Analytical Chemistry*, 73, 19: 4717-4721

Lehmann M. F., Reichert P., Bernasconi S. M., Barbieri A., McKenzie J. A. 2003. Modelling nitrogen and oxygen isotope fractionation during denitrification in a lacustrine redox-transition zone. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, 14: 2529-2542

Lehmann M.F., Bernasconi S., McKenzie J., Barbieri A., Simona M., Veronesi M. 2004. Seasonal variation of the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of particulate and dissolved carbon and nitrogen in Lake Lugano: Constraints on biogeochemical cycling in a eutrophic lake. *Limnology and Oceanography*, 49, 2: 415-429

Leininger S., Ulrich T., Schloter M., Schwark, L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C., Schleper C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442: 806-809

Liikanen A., Martikainen P. J. 2003. Effect of ammonium and oxygen on methane and nitrous oxide fluxes across sediment-water interface in a eutrophic lake. *Chemosphere*, 52: 1287-1293

Lojen S. 1996. Fazni prehodi in izotopska frakcionacija lahkih prvin v recentnem sedimentu Blejskega jezera. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Naravoslovnotehniška fakulteta, Oddelek za geologijo: 151 str.

Lojen S., Ogrinc N., Dolenc T. 1997. Carbon and nitrogen stable isotope fractionation in the sediment of Lake Bled (Slovenia). *Water, Air and Soil Pollution*, 99: 315-323

Lojen S., Ogrinc N., Dolenc T. 1999. Decomposition of sedimentary organic matter and methane formation in the recent sediment of Lake Bled (Slovenia). *Chemical Geology*, 159: 223-240

Luther G. W., Sundby B., Lewis B. L., Brendel P. J., Silverberg N. 1997. Interactions of manganese with the nitrogen cycle: alternative pathways to dinitrogen. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 19: 4043-4053

Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall: 1088 str.

Mayer B. 2005. Assessing sources and transformations of sulphate and nitrate in the hydrosphere using isotope techniques. V: *Isotopes in the water cycle: past, present and future of a developing science*. Aggarwal P. K., Gat J. R., Fröhlich K. F. O. (eds.). Dordrecht, Springer: 67-90

Mayer B., Boyer E. W., Goodale C., Jaworski N. A., van Breemen N., Howarth R. W., Seitzinger S., Billen G., Lajtha K., Nadelhoffer K., van Dam D., Hetling L. J., Nosal M., Keith P. 2002. Sources of nitrate in rivers draining sixteen watersheds in the northeastern U.S.: isotopic constraints. *Biogeochemistry*, 57/58: 171-197

Meyers P. A., Teranes J. L. 2001. Sediment organic matter. V: *Tracking environmental change using lake sediments. Volume 2: Physical and geochemical methods*. Last W.M., Smol J.P. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 239-269

Modin O., Fukushi K., Yamamoto K. 2007. Denitrification with methane as external carbon source. *Water Research*, 41: 2726-2738

Montoya J. P., Carpenter E. J., Capone D. G. 2002. Nitrogen-fixation and nitrogen isotope abundances in zooplankton of the oligotrophic North Atlantic. *Limnology and Oceanography*, 47: 1617-1628

Montoya J. P., McCarthy J. J. 1995. Isotopic fractionation during nitrate uptake by phytoplankton grown in continuous culture. *Journal of Plankton Research*, 17: 439-464

Mook W. G., Bommerson J. C., Staverman W. H. 1974. Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide. *Earth and Planetary Science Letters*, 22, 2: 169-176

Nielsen L. P. 1992. Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microbiology Ecology*, 357-362

Niftrik L. A., Fürst J. A., Sinninghe Damsté J. S., Kuenen J. G., Jetten M. S. M, Strous M. 2004. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 233, 1: 7-13

Nishio T., Koike I., Hattori A. 1982. Denitrification, nitrate reduction and oxygen consumption in coastal and estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 3: 648-653

Ogorelec B., Bole B., Leonidakis J., Cermelj B., Mišič M., Faganeli J. 2006. Recent sediment of Lake Bled (NW Slovenia): sedimentological and geochemical properties. *Water, Air and Soil Pollution*, 6: 505-513

Ogrinc N., Fontolan G., Faganeli J., Covelli S. 2005. Carbon and nitrogen isotope compositions of organic matter in coastal marine sediments (the Gulf of Trieste, N Adriatic Sea): indicators of sources and preservation. *Marine Chemistry*, 95: 163-181

- Ogrinc N., Lojen S., Faganeli J. 1997. The sources of dissolved inorganic carbon in pore waters of lacustrine sediment. *Water, Air and Soil Pollution*, 99: 333-341
- Ogrinc N., Lojen S., Faganeli J. 2002. A mass balance of carbon stable isotopes in an organic-rich methane-producing lacustrine sediment (Lake Bled, Slovenia). *Global and Planetary Change*, 33: 57-72
- Ostrom N. E., Macko S. A., Deibel D., Thompson R.J. 1997. Seasonal variation in the stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry of a coastal cold ocean environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 14: 2929-2942
- Ostrom N., Long D. T., Bell E. M., Beals T. 1998. The origin and cycling of particulate and sedimentary organic matter and nitrate in Lake Superior. *Chemical Geology*, 152: 13-28
- Owens N. J. P. 1987. Natural variations in ^{15}N in the marine environment. *Advances in Marine Biology*, 24: 389-451
- Pennock J. R., Velinsky D. J., Ludlam J. M., Sharp J. H., Fogel M. L. 1996. Isotopic fractionation of ammonium and nitrate during uptake by *Skeletonema costatum*: implications for $\delta^{15}\text{N}$ dynamics under bloom conditions. *Limnology and Oceanography*, 41, 3: 451-459
- Popp B. N., Laws E. A., Bidigare R. R., Dore J. E., Hanson K. L., Wakeham S. G. 1998. Effect of phytoplankton cell geometry on carbon isotopic fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62: 69-77
- Postgate J. R. 1998. Nitrogen fixation. 3rd ed. Cambridge, Cambridge University Press: 1-59
- Remec-Rekar Š., Bat M. 2003. Jezera. V: Vodno bogastvo Slovenije. Uhan J., Bat M. (ur). Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje: 39-45
http://www.arso.gov.si/vode/publikacije%20in%20poro%C4%8Dila/Vodno_bogastvo_3jezera.pdf (12. jun. 2009)
- Rysgaard S., Risgaard-Petersen N., Nielsen L .P., Revsbech N. P. 1993. Nitrification and denitrification in lake and estuarine sediments measured by the ^{15}N dilution technique and isotope pairing. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 7: 2093-2098
- Sodja E. 2008. »Meritve s sondo – Blejsko jezero, September 2008«. Bled, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje, Sektor za kakovost voda. Edita.Sodja@gov.si (osebni vir, 17. sep. 2008)
- Sprynskyy M., Lebedynets M., Zbytniewsky R., Namiešnik J., Buszewski B. 2005. Ammonium removal from aqueous solution by natural zeolite, Transcarpathian mordenite, kinetics, equilibrium and column tests. *Separation and Purification Technology*, 46: 155-160
- Steingruber S. M., Friedrich J., Gächter R., Wehrli B. 2001. Measurement of denitrification in sediments with the ^{15}N isotope pairing technique. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 9: 3771-3778
- Strojan I. 2008. Hidrologija: pretoki rek v oktobru. Naše okolje. Bilten Agencije Republike Slovenije za okolje, 15, 10: 43-46
http://www.arso.gov.si/o%20agenciji/knji%C5%BEnica/mese%C4%8Dni%20bilten/NASE%20OKOLJE2008_10.pdf (12. jun. 2009)

Talbot M. R. 2001. Nitrogen isotopes in paleolimnology. V: Tracking environmental change using lake sediments. Volume 2: Physical and geochemical methods. Last W.M., Smol J.P (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 401-439

Teranes J. L., Bernasconi S. M. 2000. The record of nitrate utilization and productivity limitation provided by $\delta^{15}\text{N}$ values in lake organic matter – A study of sediment trap and core sediments from Baldeggersee, Switzerland. *Limnology and Oceanography*, 45, 4: 801-813

Thornton A., Pearce P., Parsons S. A. 2007. Ammonium removal from solution using ion exchange on to MesoLite, an equilibrium study. *Journal of Hazardous Materials*, 147: 883-889

Tiedje J.M. 1994. Denitrifiers. V: Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and biochemical properties. Weaver R.W. (ed.). Madison, Soil Science Society of America: 245–267

van Luijn F., Boers P. C. M., Lijkema L., Sweerts J.-P. R. A. 1999. Nitrogen fluxes and processes in sandy and muddy sediments from a shallow eutrophic lake. *Water Research*, 33, 1: 33-42

Verstraete W., Philips S. 1998. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution*, 102, S1: 717-726

Voss M., Altabet M. A., Bodungen B. v. 1996. $\delta^{15}\text{N}$ in sedimenting particles as indicator of euphotic zone processes. Part 1. *Deep-Sea Research*, 43, 1: 33-47

Wada E., Hattori A. 1976. Natural abundance of ^{15}N in particulate organic matter in the north Pacific ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40: 249-251

Wang Y., Lin F., Pang W. 2008. Ion exchange of ammonium in natural and synthesized zeolites. *Journal of Hazardous Materials*, 160: 371-375

Waser N.A.D., Harrison P.J., Nielsen B., Calvert S.E., Turpin D.H. 1998. Nitrogen isotope fractionation during uptake and assimilation of nitrate, nitrite, ammonium and urea by a marine diatom. *Limnology and Oceanography*, 43, 2: 215-224

Whiticar M. J., Faber E. 1986. Methane oxidation in sediment and water column environments - Isotope evidence. *Organic Geochemistry*, 10: 759-768

Wong W., Sackett W. M., Benedict C. R. 1975. Isotope fractionation in photosynthetic bacteria during carbon dioxide assimilation. *Plant Physiology*, 55: 475-479

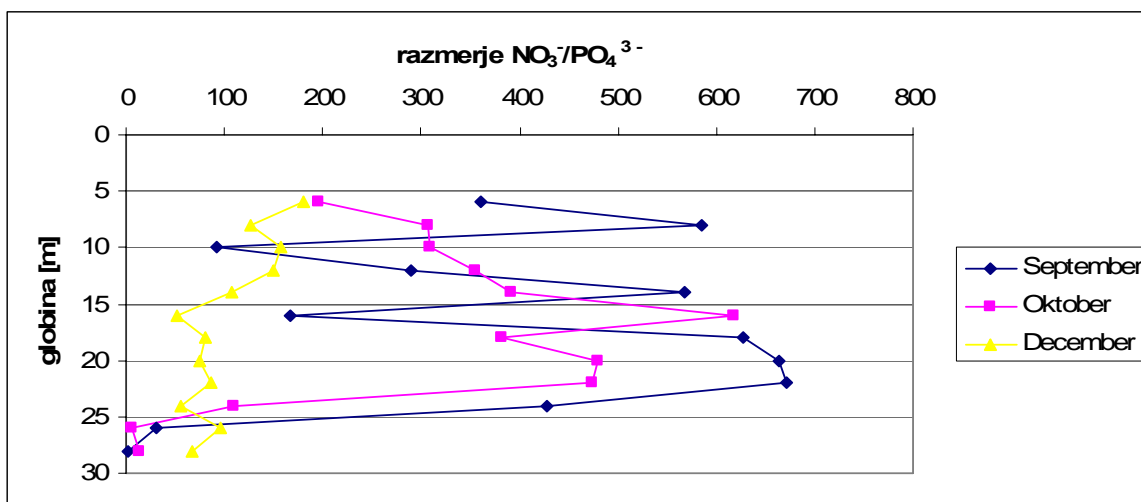
Zehr J. P., Ward B. B. 2002. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3: 1015-1024

Zumft W. G., Körner H. 1997. Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 43-58

Zupančič B. 2009. »Padavine na območju naselja Bled«. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje. Boris.Zupancic@gov.si (osebni vir, 2. jun. 2009)

PRILOGE

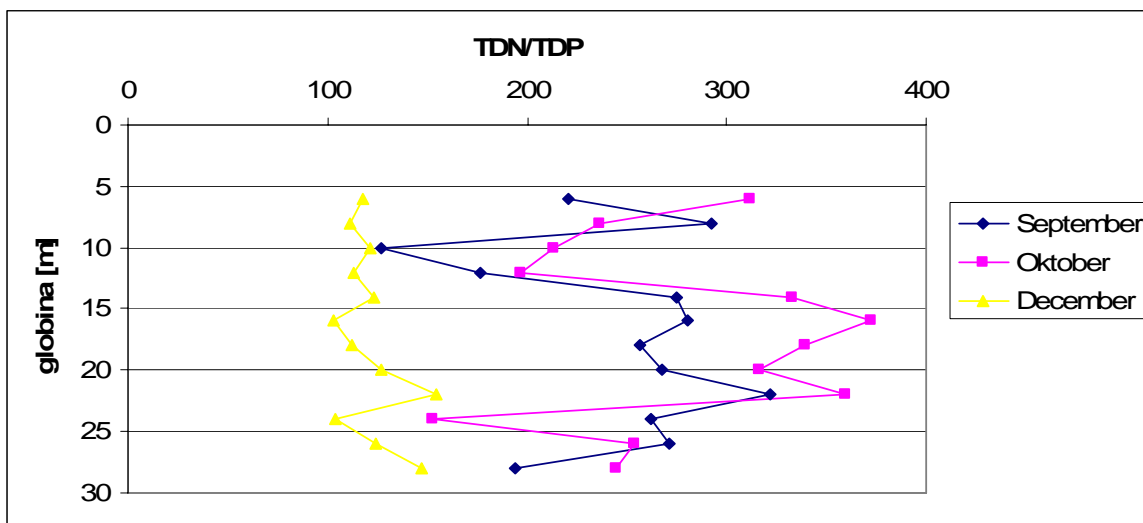
Priloga A



Priloga A: Molska razmerja med koncentracijami nitrata in fosfata v mesecih vzorčenja po globini vodnega stolpca Blejskega jezera

Slika prikazuje razmerja med koncentracijami nitrata in fosfata. Vrednosti so neprimerno višje od Redfieldovega razmerja dušika in fosforja, ki znaša 16:1. Najnižje vrednosti dosežejo sicer prav septembra (1,4) na globini 28 m in oktobra (6,6) na globini 26 m, vendar je tu velika poraba nitrata zaradi denitrifikacije. Do teh globin se razmerje sicer počasi, a vztrajno zmanjšuje. Decembra je povprečno razmerje 102 ± 45 , septembra 445 ± 210 in oktobra 362 ± 145 z maksimalnimi vrednostmi 671 (september) in 617 (oktober). V obeh primerih smo izpustili vrednosti iz anoksičnih globin 26 m in 28 m. Septembra je očitno veliko nihanje razmerij med posameznimi globinami. Ponovno se izpostavlja globina 16 m, kjer smo že prej opazili povečanje koncentracije fosfata in padec DOP (slika 14).

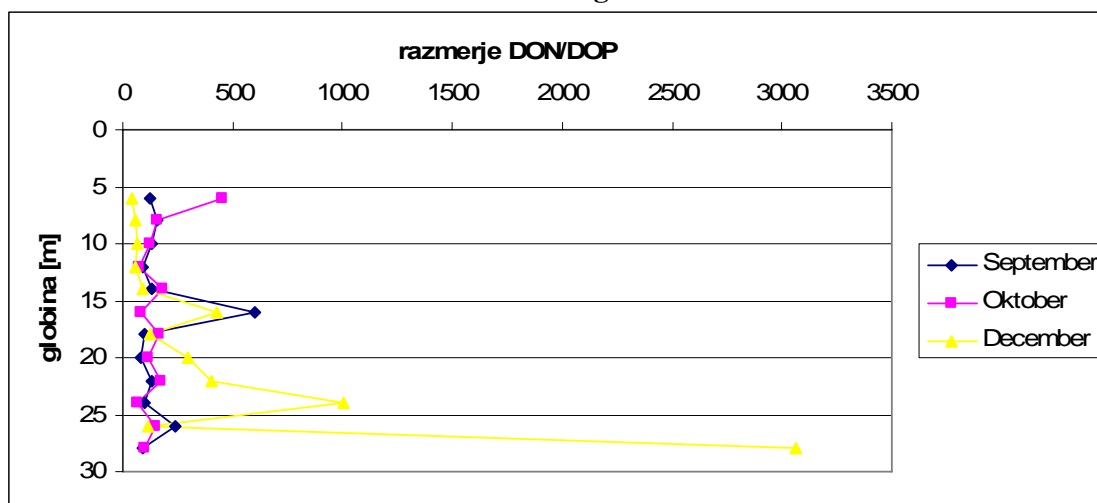
Priloga B



Priloga B: Molska razmerja med celotnim raztopljenim dušikom in fosforjem v mesecih vzorčenja po globini vodnega stolpca Blejskega jezera

Podobno kot razmerje oksidiranih oblik obeh elementov predstavimo še razmerje med celotnim dušikom in celotnim fosforjem. Na prilogi B lahko sledimo precej podobnemu gibanju kot pri grafu razmerja med NO_3^- in PO_4^{3-} . Zanimivo je, da se tokrat povišana razmerja na 16 m pojavijo oktobra. Potrebno je opozorilo, da ta razmerja ne povedo ničesar o absolutnih izmerjenih koncentracijah, lahko pa iz različnih razponov na abscisi sklepamo na deleže ostalih zvrsti posameznega elementa.

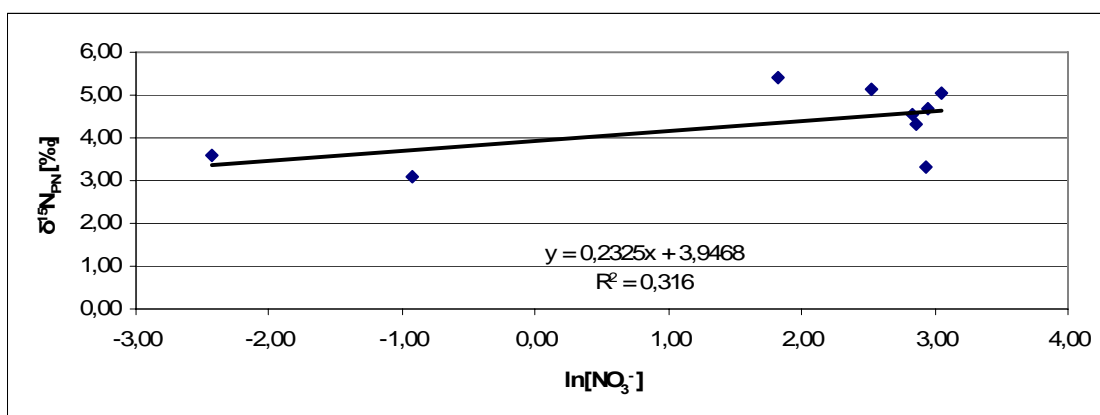
Priloga C



Priloga C: Molsko razmerje med koncentracijami DON in DOP v mesecih vzorčenja po globini vodnega stolpca Blejskega jezera

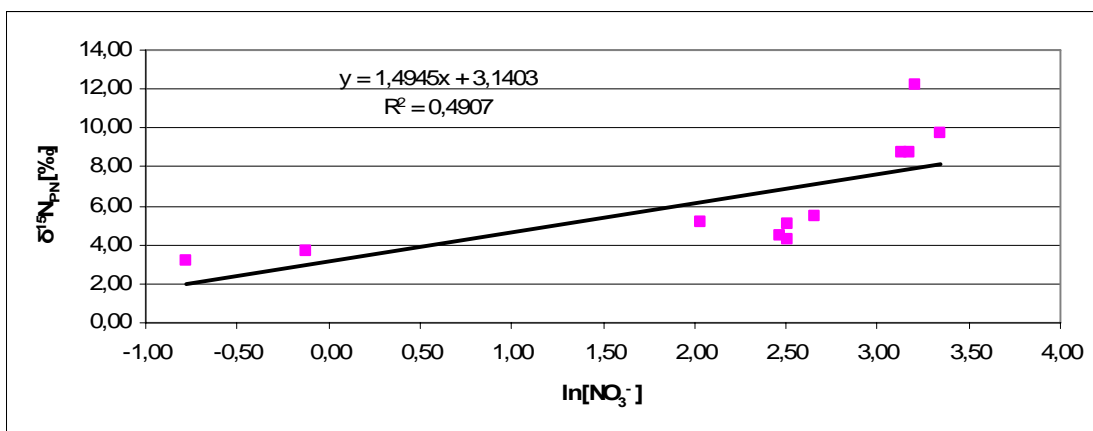
Zaradi vrste naših meritev ne moremo določiti razmerja med koncentracijami suspendiranega dušika in fosforja. Najbližje temu parametru lahko predstavimo razmerje med koncentracijami DON in DOP (priloga C), ki je v povprečju manjše kot razmerje nitrat/fosfat in kaže manj intenzivne spremembe po globini (povprečji sta 165 ± 145 ter 153 ± 101 za september in oktober). Izpostaviti velja le vrednost decembra na globini 28 m, kjer je razmerje kar 3067!

Priloga D



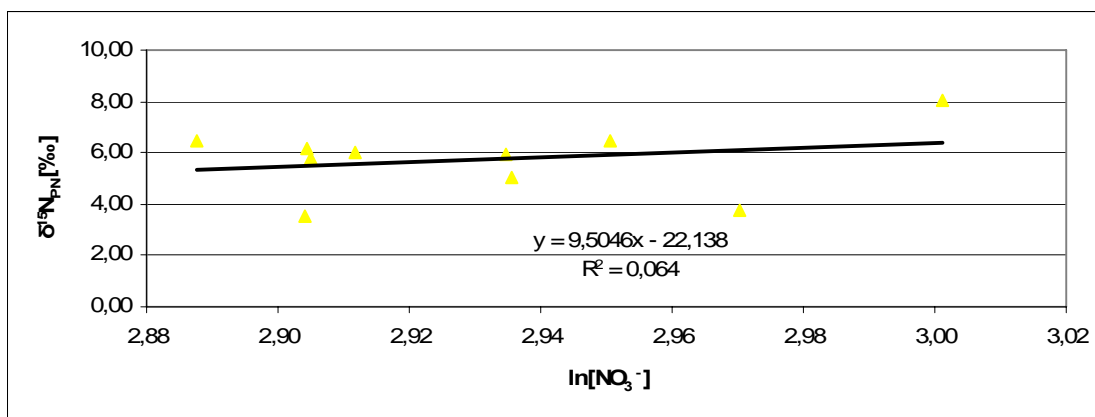
Priloga D: $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ v odvisnosti od $\ln[\text{NO}_3^-]$ septembra 2008. Pri risanju nismo upoštevali vrednosti iz suboksičnega in anoksičnega dela vodnega stolpca Blejskega jezera

Priloga E



Priloga E: $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ v odvisnosti od $\ln[\text{NO}_3^-]$ oktobra 2008. Pri risanju nismo upoštevali podatka za 16 m, kjer je bila $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}} = 12,2 \text{ ‰}$

Priloga F



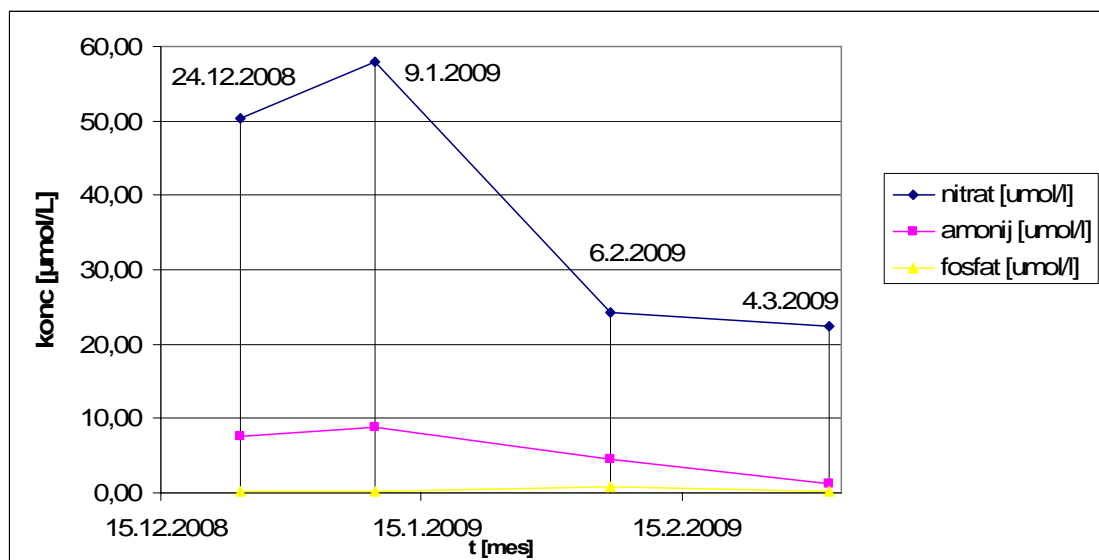
Priloga F24: $\delta^{15}\text{N}_{\text{PN}}$ v odvisnosti od $\ln[\text{NO}_3^-]$ decembra 2008

Priloga G

Priloga G: Spreminjanje koncentracij nitrata, amonija in fosfata v inkubacijskih posodah. Navedene so tudi izotopske vrednosti partikulatne snovi, od katerih manjka podatek za datum 9.1.2009. Poudariti velja, da časovna vrsta ni ekvidistantna

datum	nitrat [$\mu\text{mol/L}$]	amonij [$\mu\text{mol/L}$]	fosfat [$\mu\text{mol/L}$]	$\delta^{15}\text{N}_{\text{TPN}}$ (‰)
24.12.2008	50,3	7,52	0,29	3,8
09.01.2009	57,9	8,91	0,20	NA
06.02.2009	24,3	4,52	0,73	68,4
04.03.2009	22,5	1,19	0,11	7,6

Priloga H



Priloga H: Časovno spreminjanje koncentracij nitrata, amonija in fosfata med inkubacijskim poskusom