

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katja KUKOVEC

**FRAKCIONACIJA STABILNIH IZOTOPOV OGLJIKA IN DUŠIKA V
FITOPLANKTONU TRŽAŠKEGA ZALIVA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CARBON AND NITROGEN STABLE ISOTOPE FRACTIONATION IN
PHYTOPLANKTON FROM THE GULF OF TRIESTE (NORTHERN
ADRIATIC SEA)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Odseku za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 17.12.2004 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Jadran Faganeli, 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

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

Članica: doc. dr. Nives OGRINC
Institut Jožef Stefan v Ljubljani, Odsek za znanosti o okolju

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katja Kukovec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 574.5 + 579.68: 543.51 (043) = 863
- KG fitoplankton/priobalna morja/Tržaški zaliv/primarna produkcija/analiza suspendirane snovi/stabilni izotopi/izotopska frakcionacija/ogljik/dušik
- AV KUKOVEC, Katja
- SA FAGANELI, Jadran (mentor)/OGRINC, Nives (somentorica)/MANDIĆ-MULEC, Ines (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2006
- IN FRAKCIONACIJA STABILNIH IZOTOPOV OGLJIKA IN DUŠIKA V FITOPLANKTONU TRŽAŠKEGA ZALIVA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 57 str., 3 pregl., 15 sl., 8 pril., 84 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V vzorcih suspendirane organske snovi (POM) iz Tržaškega zaliva iz let 2003 in 2004, ki jo sestavlja tudi fitoplanktonska organska snov, smo analizirali vsebnost ^{13}C in ^{15}N . Poleg tega smo analizirali vsebnost organskega C in celokupnega N, ogljikovih hidratov in vodotopnih proteinov v suspendirani snovi, hranilni potencial (N, P, Si), karbonatni sistem z izotopsko sestavo $^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ ter fitoplanktonsko biomaso (klorofil a). Analizirali smo tudi izotopsko sestavo nekaterih tipičnih fitoplanktonskih kultur izoliranih iz Tržaškega zaliva. Pomladansko, poletno in jesensko cvetenje fitoplanktona je imelo največji vpliv na variacije izotopske sestave POM, kjer je bil značilen višek $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ povezan z zvišanjem fitoplanktonske biomase (koncentracije klorofila a, vodotopnih proteinov, ogljikovih hidratov, C_{org} , N), spreminjanje vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ pa je bilo posledica sprememb vira anorganskega dušika pri fitoplanktonski asimilaciji, čeprav bi za natančnejšo razlago potrebovali tudi izotopsko sestavo ^{15}N amonija in nitrata. Nizke vrednosti frakcionacijskega faktorja $\epsilon = 0,8\text{‰}$ v letu 2004 v primerjavi s podatki iz literature so verjetno posledica različnih vrst in pogojev rasti fitoplanktona. Glede na koncentracijo hranil in razmerja N/P smo ugotovili večjo variabilnost v letu 2004 in kot »stresni odgovor« so v juniju prisotne visoke koncentracije suspendiranih proteinov, ogljikovih hidratov, C_{org} , suspendiranega N sovpadale z intenzivnimi agregacijskimi procesi – nastankom makroagregatov. Z merjenjem izotopskih vrednosti smo ugotovili izrazitejši doprinos kopenskega organskega materiala v letu 2004.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 574.5 + 579.68: 543.51 (043) = 863
- CX phytoplankton/costal marine waters/Gulf of Trieste/primary production/analyses of particulate matter/stable isotopes/carbon/nitrogen
- AU KUKOVEC, Katja
- 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 2006
- TI CARBON AND NITROGEN STABLE ISOTOPE FRACTIONATION IN PHYTOPLANKTON FROM THE GULF OF TRIESTE (NORTHERN ADRIATIC SEA)
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO IX, 57 p., 3 tab., 15 fig., 8 ann., 84 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Carbon and nitrogen isotopic composition of particulate organic matter (POM) was studied in 2003 and 2004 in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). In parallel, the contents of organic carbon, nitrogen, carbohydrates and water soluble proteins in particulate matter, and N, P and Si nutrients, and phytoplankton biomass (chlorophyll a) were analyzed. In comparison, the C and N isotopic composition of some cultured phytoplankton species collected from the Gulf of Trieste was also studied. The isotopic composition of POM was mostly affected by the spring, summer and autumn phytoplankton blooms. Higher $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ values were linked to higher phytoplankton biomass (higher chlorophyll a, carbohydrate, water soluble protein, C_{org} and N contents, while the variations of $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ values were most probably the consequence of variations of N nutrient sources in phytoplankton assimilation. The low value of fractionation factor ϵ , averaging 0.8‰, compared to other seas, was probably the consequence of different phytoplankton species and different growth conditions. Considering the nutrient concentrations and N/P ratios, we observed larger variability of all studied parameters in 2004. The response of stressing conditions was the appearance of high concentrations of carbohydrates, water soluble proteins, C_{org} and N in POM in June 2004 leading to intense aggregation processes producing macroaggregates. The isotopic composition of POM also revealed higher contribution of allochthonous particulate matter from fresh water inflows in 2004.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PRIMARNA PRODUKCIJA V MORJU	3
2.1.1 Fotoavtotrofi v morskem okolju	4
2.1.2 Prehranjevalna veriga	7
2.1.3 Odvisnost primarne produkcije od dostopnosti nutrientov in svetlobe	9
2.1.4 Sezonske spremembe in prehranjevalne verige	12
2.1.5 Odziv fitoplanktona na povečane zunanje vnose hranilnih snovi	14
2.2 IZOTOPSKA FRAKCIONACIJA MED PRIMARNO PRODUKCIJO	16
2.2.1 Osnove izotopske biogeokemije	16
2.2.2 Izotopi ogljika	18
2.2.3 Izotopi dušika	21
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 PODROČJE RAZISKAV	27
3.2 VZORČENJE	28
3.3 FITOPLANKTONSKE KULTURE (MIKROALG)	29
3.4 ANALIZE	30
3.4.1 Določanje izotopske sestave suspendirane organske snovi in fitoplanktonskih kultur ($\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$)	30
3.4.2 Določanje izotopske sestave raztopljenega anorganskega ogljika ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$)	30
3.4.3 Določanje organskega ogljika in totalnega dušika	31
3.4.4 Določanje klorofila a	31
3.4.5 Določanje proteinov in ogljikovih hidratov v suspendirani snovi	31
3.4.6 Določanje hranilnih soli	31
4 REZULTATI	32
4.1 $\delta^{13}\text{C}$ IN $\delta^{15}\text{N}$ V POM, DIC IN IZBRANIH VRSTAH FITOPLANKTONA	32
4.2 DINAMIKA KONCENTRACIJE Klorofila A, RAZMERJA $\text{C}_{\text{org}}/\text{N}$ V SUSPENDIRANI SNOVI, PROTEINOV IN OGLJIKOVIH HIDRATOV, RAZMERJA $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ IN RAZMERJA $\text{N}_{\text{tot}}/\text{P}_{\text{tot}}$	34
4.3 VPLIV KONCENTRACIJ NITRATA NA $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ VREDNOSTI	37
4.4 IZVOR ORGANSKE SNOVI	39
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1 VPLIV CVETENJA FITOPLANKTONA NA $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ IN $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$	41
5.2 VPLIV IZVORA ORGANSKE SNOVI NA $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ IN $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$	43
5.3 POJAV MAKROAGREGATOV	44
5.4 SKLEPI	45
6 POVZETEK	47
7 VIRI	49
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v nekaterih vrstah fitoplanktona iz Tržaškega zaliva.

Preglednica 2: Prispevek kopenske organske snovi (Y) k suspendirani organski snovi v vzorčevalnem letu 2003.

Preglednica 3: Prispevek kopenske organske snovi (Y) k suspendirani organski snovi v vzorčevalnem letu 2004.

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovne poti v evoluciji evkariontskih alg. Primarna simbioza cianobakterij z apoplastidnim gostiteljem vodi v razvoj zelenih in rdečih alg. Linija zelenih alg vodi tudi do razvoja vseh zelenih rastlin, iz linije rdečih alg pa izhajajo med drugim tudi diatomeje in kokolitoforidi. (Falkowski, 2005).

Slika 2: Biomasa v različnih habitatih (vir: Atlas, 1998).

Slika 3: Klasična in mikrobna prehranjevalna veriga.

Slika 4: Model diskriminacije izotopov ogljika (RuBisCO in ravnovesje CO₂, HCO₃⁻) (Engel in Macko, 1993).

Slika 5: Diagram sprememb $\delta^{15}\text{N}$ substrata, trenutnega in nakopičenega produkta med ireverzibilno reakcijo, kjer iz substrata nastaja produkt (Owens, 1987).

Slika 6: Piranski zaliv s točko vzorčenja.

Slika 7: Graf časovne odvisnosti koncentracije c klorofila a ($\mu\text{g/l}$).

Slika 8: Graf časovne odvisnosti C/N_{at.} vrednosti.

Slika 9: Graf časovne odvisnosti koncentracije c proteinov ($\mu\text{g/l}$).

Slika 10: Graf časovne odvisnosti koncentracije c ogljikovih hidratov ($\mu\text{g/l}$).

Slika 11: Graf časovne odvisnosti NO₃⁻/PO₄⁻ vrednosti ($\mu\text{mol/l}$).

Slika 12: Graf časovne odvisnosti N_{tot}/P_{tot} vrednosti ($\mu\text{mol/l}$).

Slika 13: $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti suspendiranega totalnega dušika v odvisnosti od koncentracije NO₃⁻. Na sliki sta narisani tudi linearni regresiji za vzorčevalni obdobji 2003 in 2004.

Slika 14: Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ suspendiranega totalnega dušika v odvisnosti od $\ln[\text{NO}_3^-]$ v vzorčevalnem letu 2004.

Slika 15: Odvisnost vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ od $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ skupaj z izotopsko sestavo planktonskih kultur in vrednostmi za kopensko ter morsko organsko snovjo.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

C_{org} - organski ogljik

DIC – raztopljen anorganski ogljik (angl. Dissolved Inorganic Carbon)

DOC – raztopljen organski ogljik

DOM – raztopljena organska snov (ang. Dissolved Organic Matter)

N_{tot} – celotni dušik

OM – organski material

P_{tot} – celotni fosfor

PN – suspendiran dušik

POC – suspendiran organski ogljik

POM – suspendirana organska snov (ang. Particulated Organic Matter)

^{13}C , ^{15}N – težji izotop ogljika oz. dušika

^{12}C , ^{14}N – lažji izotop ogljika oz. dušika

α – faktor izotopske frakcionacije

δ – izotopska sestava, vrednost

$\delta^{13}C_{DIC}$ – izotopska sestava raztopljenega anorganskega ogljika

$\delta^{13}C_{POM}$ – izotopska sestava ogljika v suspendirani organski snovi

$\delta^{15}N_{POM}$ – izotopska sestava dušika v suspendirani organski snovi

$\delta^{15}N_{NO_3^-}$ – izotopska sestava dušika v nitratu

$\delta^{13}C_{CO_2}$ - izotopska sestava ogljikovega dioksida

$\delta^{13}C_{org}$ - izotopska sestava organske snovi

$\delta^{13}C_{mor}$ – izotopska vrednost morskega organskega materiala

$\delta^{13}C_{kop}$ – izotopska vrednost kopenskega organskega materiala

ϵ – izotopski separacijski faktor

1 UVOD

Priobalna morja so pomembna področja za razumevanje biogeokemijskih kroženj, saj zajemajo približno 20% površine vseh oceanov in so lahko vir natančnih geoloških podatkov za razumevanje klimatskih in okoljskih sprememb (Ostrom in sod., 1997). Območja, kot je severni Jadran in Tržaški zaliv, so pomembna področja intenzivne primarne produkcije in naraščajoče eutrofikacije. Neposredni odraz teh sprememb je periodično pojavljanje cvetenj fitoplanktona, katerega posledica je v severnem Jadranu tudi občasno pojavljanje makroagregatov. Pri raziskavah v Tržaškem zalivu je ugotovljeno (Mozetič, 1997), da se fitoplankton na povečane zunanje vnose hranilnih snovi odzove s povečano klorofilno biomaso, abudanco in primarno produkcijo. Razumevanje mikrobnih in biogeokemijskih procesov, ki uravnavajo fitoplanktonsko biomaso in produkcijo, bi razjasnilo vzroke njihovih sprememb in posredno nastanka makroagregatov. Ugotavljanje vzrokov za variacije izotopske sestave ogljika in dušika v fitoplanktonu je ena od metod spremljanja fitoplanktona in kroženja ogljika ter dušika v morskem okolju.

Stabilni izotopi ogljika in dušika se v vedno večji meri uporabljajo v raziskavah z različno tematiko – od študija prehranjevalnih verig do ocenjevanja preteklih koncentracij ogljikovega dioksida (Sachs in sod., 1999, Thompson in Calvert, 1995; Laws in sod., 1994; Rau in sod., 1997). $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ razmerja se uporabljajo za testiranje hipotez o biogeokemičnih ciklih dušika in ogljika v morskem okolju (Altabet, 1996). Popolno razumevanje teh procesov pa zahteva poznavanje (1) izotopske sestave objekta raziskave in (2) smeri ter stopnje izotopskih sprememb med procesi, v katere so vključeni mikroorganizmi oziroma fitoplankton. Vsekakor pa so študije biogeokemijskih reakcij v naravnem okolju zahtevne zato, ker so izotopske spremembe lahko posledica številnih različnih reakcij in procesov (Ostrom in sod., 1997).

Izotopska frakcionacija ogljika pri morskem fitoplanktonu je odvisna od večih potencialnih faktorjev (Popp in sod., 1997). Študije fitoplanktona poročajo o velikem razponu $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti različnih vrst, pri različni količini svetlobe, temperaturi, stopnji rasti, prepustnosti membrane in različnih poteh fiksacije ogljika (Thompson in Calvert, 1995). Po Ostrom in sod. (1997) so spremembe v $\delta^{13}\text{C}$ suspendiranega organskega materiala povezane s spremembami v vodnih masah, vrstni sestavi fitoplanktona, temperaturi, stopnji rasti in pCO_2 . Nakatsuka in

sod. (1992) domnevajo, da je glavni faktor, ki kontrolira variacijo $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ med cvetenjem fitoplanktona, stopnja produkcije suspendiranega organskega ogljika. Spremembe raztopljenega anorganskega ogljika (DIC) (na primer v izotopski vrednosti DIC ali molekularni koncentraciji CO_2) naj ne bi bile zadosten razlog za variacije $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$. Prav tako naj ne bi imela pri tem bistvenega pomena vrstna sestava fitoplanktona.

Variacije dušikovih izotopov $\delta^{15}\text{N}$ pa naj bi predvsem odsevale vnos hranil fitoplanktona. Časovne variacije $\delta^{15}\text{N}_{\text{PON}}$ so v največji meri posledica izotopske diskriminacije med fitoplanktonskim privzemom NO_3^- (Nakatsuka in sod., 1992). Recikliranje dušika prav tako kot fiksacija N_2 zniža $\delta^{15}\text{N}$ površinskih delcev in sicer zaradi izotopske frakcionacije pri heterotrofnih procesih (Pantoja in sod., 2002).

1.1 NAMEN DELA

Cilj diplomske naloge je bil s pomočjo izotopskih in kemijskih analiz spremljati dinamiko fitoplanktonske asimilacije in produkcije v povezavi z biogeokemijskim kroženjem ogljika ter dušika. Vzorce vode iz površinske plasti na stalni postaji »Ž« v Piranskem zalivu smo odvzemali v časovnem razmaku približno 10. dni od februarja do septembra 2003 in 2004. V suspendiranemu organskemu materialu (zajema tudi fitoplanktonsko organsko snov) smo določili izotopsko sestavo, koncentracije suspendiranega organskega ogljika in suspendiranega dušika, vsebnost proteinov in ogljikovih hidratov. Vzoredno smo merili koncentracije raztopljenih hranilnih soli NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , SiO_4^{4-} ter celotni N in celotni P. Določili smo tudi koncentracijo in izotopsko sestavo raztopljenega anorganskega ogljika ter izotopsko sestavo štirih vrst kultur fitoplanktona iz Tržaškega zaliva. Z določanjem klorofila a, značilnih sprememb izotopskih vrednosti in ostalih vrednosti smo vrednotili naslednje pojave: cvetenje fitoplanktona, asimilacijo različnih virov anorganskega dušika, mikrobne razgradne procese, prisotnost hranil, prisotnost povečanega izločanja ekstracelularnih snovi in izvor organske snovi. Na podlagi ugotovljenih razlik (in analiz) v obdobju z odsotnostjo in prisotnostjo makroagregatov v morju smo lahko potrdili hipotezo, da neravnovesje hranil kot »stresno okolje« vodi do nastanka suspendiranih makroagregatov. V vodnih sistemih na izotopsko sestavo nitrata in amoniaka vplivajo številni procesi: asimilacija, denitrifikacija, nitrifikacija in mineralizacija, kar zelo otežuje prepoznavanja njenega izvora. Vseeno pa sta smer in stopnja izotopskih efektov pogosto dober pokazatelj prevladujočega mikrobnega procesa (Ostrom, 1997).

2 PREGLED OBJAV

2.1 PRIMARNA PRODUKCIJA V MORJU

Vsi avtotrofi so primarni producenti zato, ker predstavljajo vez med živim in neživim svetom. Avtotrofi fiksirajo ogljik iz CO₂ (oksidiran) v organsko vezan ogljik (reduciran). Ogljikov dioksid, ki ga primarni producenti pretvorijo v organsko snov, je osnova za skupno primarno produkcijo (Atlas, 1998). Avtotrofni organizmi, ki so odvisni od sončne energije, so fotoavtotrofi. Nekatere bakterije so sposobne redukcije anorganskega ogljika v temi brez zunanjega vira organskega ogljika. To so kemoavtotrofi. Celoten prispevek kemoavtotrofov v oceanu k nastanku organske snovi je manjši od 1 odstotka celotne primarne produkcije v določenem obdobju (Falkowski, 2005).

Celotna količina kemijske vezane energije, ki jo fitoplankton predstavlja skupaj z organsko snovjo, ki jo proizvede, pomeni celotno (bruto) primarno produkcijo (**GPP**, ang. *gross primary production*). Ta vrednost je celotna količina fiksiranega ogljika na površinsko enoto oceana. Nekaj te energije pa porabi fitoplankton v procesu dihanja za svojo rast in razvoj. Zato je končne primarne produkcije, ki je na voljo drugim, nekoliko manj kot GPP. Govorimo o neto primarni produkciji (**NPP**).

Izvožena produkcija (ang. *export production*) je organski ogljik, ki izhaja iz evfotske cone nižje v vodni stolpec. To so frakcije primarnih producentov in/ali heterotrofov, ki se potopijo pod termoklino. Toneči organski material največkrat porabljajo heterotrofni mikrobi v notranjosti oceana. V odprtih oceanih je navadno izvozne produkcije relativno malo (5-10%), v območjih bogatih z nutrienti pa je izvožene produkcije do 50%. Diatomeje in druge velike in težke celice lahko masovno cvetijo in hitro potonejo. V tem primeru pride do obogatitve globinskega dela z anorganskim ogljikom, ki nastane v procesih oksidacije in remineralizacije (Falkowski, 2005). Taka obogatitev se imenuje »biološka črpalka« in je izrednega pomena pri vzdrževanju ravnotežja z atmosferskim CO₂.

2.1.1 Fotoavtotrofi v morskem okolju

V oceanih so oksigeni fotoavtotrofi iz taksonomsko ločenih skupin. Večinoma gre za enocelične fotosintetske organizme, ki lebdiijo in se premikajo s tokom, imenujejo se **fitoplankton**. Za razliko od kopenskih rastlin imajo predstavnike v relativno majhnem številu vrst, ki pa so filogenetsko ločene. Prevladujoči fototrofni organizmi v večini vodnih okoljih so mikroorganizmi; v oksičnih območjih so to predvsem cianobakterije in enocelične alge, v anoksičnih območjih pa anoksiogene fototrofne bakterije (Brock, 1997). V priobalnih morjih je glavna primarna produkcija v vodnem stolpcu zaradi fitoplanktona, medtem ko je na dnu možna primarna produkcija zaradi makrofitov in mikroskopskih alg (bentoški avtotrofi).

Globalno porazdelitev fitoplanktonskega klorofila spremljajo in določajo satelitsko glede na barvo morja. V odvisnosti od temperature in koncentracije klorofila določajo globalno neto primarno produkcijo (Falkowski, 2005).

Najpogostejše skupine fitoplanktona:

Diatomeje ali kremenaste alge

So glavni primarni producenti spomladi. Rjavo obarvane, enocelične alge, ki živijo v sladki vodi, v morju in v zemlji. So enocelične ali v verižicah, plavajoče ali pritrjene na površino, celično steno imajo iz silicija in pektina, velikosti 0.01 - 0.2 mm. Obstaja preko 1200 različnih vrst diatomej.

Dinoflagelati ali oklepni bičkarji

Enocelični bičkarji, ki živijo predvsem v toplejših morjih. So manjši od diatomej in nenavadnih oblik (tirogi, sodčkasti, krilati, ledvičasti). Lahko parazitirajo ali so simbionti s koralami ali fotosintetizirajo. Pri prekomernem razmnoževanju v spomladanskem času lahko pride do obarvanja in svetlikanja morja zaradi morske iskrnice (*Noctiluca miliaris*).

Kokolitoforidi

So najmanjši morski protozoji. Ti pomembni enocelični producenti v oligotrofnih morjih – uspevajo tudi v z nutrienti revnih območjih. Imajo oklep iz apnenca, so zelo ornamentni in so lahko v želatinastem ovoju. So avtotrofi ali heterotrofi, veliko jih je običkanih.

Silikoflagelati

Običajni v hladnejših morjih. So enocelični avtotrofi ali heterotrofi. Imajo silikatni oklep.

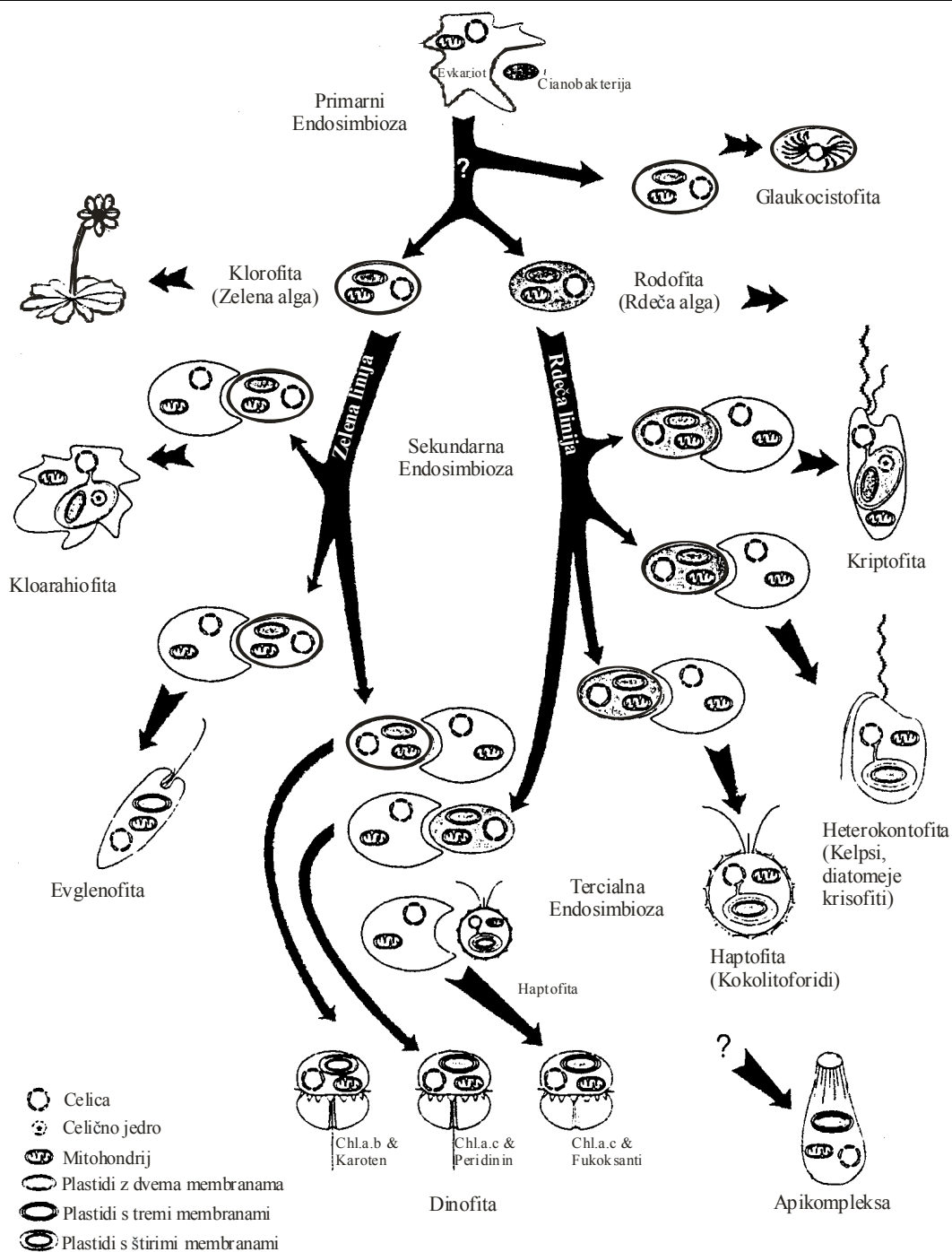
Cianobakterije

Cianobakterije, imenovane tudi modrozeleni cepčivke ali modrozeleni alge, spadajo med evbakterije (za razliko od prejšnjih skupin, ki spadajo med evkariotske mikroorganizme). To je skupina avtotrofnih bakterij z enako fotosintezo kot pri višjih rastlinah. Vsebujejo klorofil a in fikobiline, ne pa klorofila b. Fotosintetska barvila so vgrajena v znotrajcelične membrane tilakoide, ki pa niso v kloroplastih kot pri rastlinah. Nekatere cianobakterije so enocelične, pri drugih so celice povezane v skupnem želatinastem ovoju - galerti, številne pa so nitaste, lahko imajo bičke. Ti oksigeni fototrofi številčno prevladujejo med fotoavtotrofi v morskem okolju, kar je zasluga njihove izredne prilagodljivosti. So dominantne poleti, nekatere fiksirajo dušik (imajo heterociste) – na primer *Anabaena*. Celična stena je iz hitina, lahko imajo plinske vakuole. V morju so najpomembnejše *Syneccoccus* in *Prochlorococcus*.

Glede na velikost ločimo:

- pikoplankton (<2 µm): cianobakterije, bakterije;
- nanoplankton (2-20 µm): diatomeje, kokolitoforidi, silikoflagelati;
- mikropoplankton (20-200 µm): diatomeje, dinoflagelati.

V vodnem sistemu lahko govorimo o **kontinuumu organske snovi** (mreži iz polimernih vlaken) v rangu delcev od nanometra do centimetra. V tem matriksu so bakterije razporejene v obliki manjših aktivnih otočkov (ang. *hot spots*), kar omogoča visoko bakterijsko raznolikost in aktivnost. Ker je organska snov vodnih sistemov primarno polimerna, imajo bakterije, ki so se adaptirale na tako okolje, različne površinsko vezane encime (proteaze, glukozidaze, lipaze, fosfataze, nukleaze). Zaradi delovanja **ekstracelularnih encimov** bakterije nenehno spreminjajo organsko snov, ne da bi pri tem prišlo do znatnega pretoka organske snovi v bakterijsko celico. Tako pri pojavu morske sluzi bakterije izločajo veliko hidrolaz, vendar je zaradi počasne rasti in majhne porabe ogljika večji del organskega materiala raztopljen v obliki sluzi, kar posledično zmanjšuje sedimentacijo tega materiala (Stopar in Mandič-Mulec, 1999).



Slika 1: Osnovne poti v evoluciji evkariontskih alg. Primarna simbioza cianobakterij z apoplastidnim gostiteljem vodi v razvoj zelenih in rdečih alg. Linija zelenih alg vodi tudi do razvoja vseh zelenih rastlin, iz linije rdečih alg pa izhajajo med drugim tudi diatomeje in kokolitoforidi. (Falkowski, 2005).

Kroženje ogljika je lahko dodatno regulirano preko delovanja bakterijskih encimov. Na primer, delovanje proteaz in nukleaz je dokazano večje od delovanja glukozidaz. To pomeni, da je življenjski čas proteinov krajši kot življenjski čas polisaharidov. Zaradi tega se poveča hitrost kroženja in količina dostopnega dušika in fosforja, kar omogoča večjo primarno produkcijo.

Zanimiva je **interakcija med bakterijami in diatomejami**, ki lahko zelo spremeni površinske karakteristike diatomej. Na primer bakterije, ki gostujejo na površini diatomej izločajo veliko hidrolaz, ki zmanjšujejo sluz diatomej. Zmanjšanje sluzi zmanjšuje agregacijo in posledično tonjenje, kar lahko poveča obstojnost cvetenja fitoplanktona (Stopar in Mandič-Mulec, 1999).

2.1.2 Prehranjevalna veriga

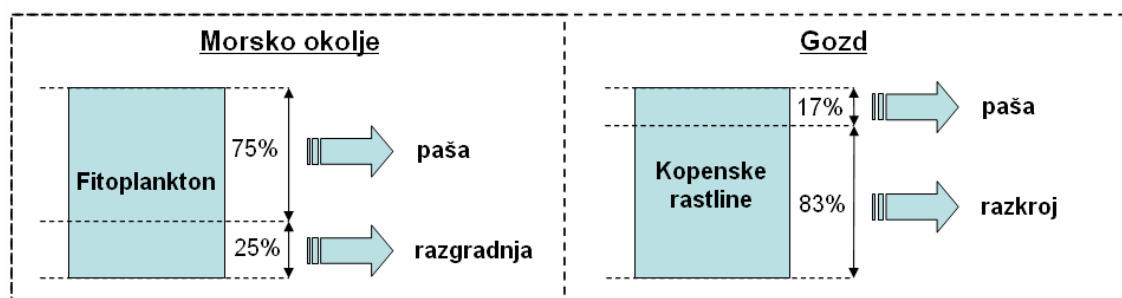
Vsaka prehranjevalna veriga temelji na primarnih producentih (Atlas, 1998). Glavna metabolna pot fotosintetske fiksacije CO₂ je Calvinov cikel.

Neposredno hranjenje s **primarnimi producenti** imenujemo **paša** (ang. *grazing*), pasejo pa se **herbivori (primarni konzumenti)**. V naslednjem trofičnem nivoju so predatorji ali **karnivori (sekundarni konzumenti)**, ki so plen večjih predatorjev ali karnivorov (terciarni konzumenti). Le 10 –15% vse biomase enega trofičnega nivoja se prenese v naslednjega; 85 – 90% se porabi v respiraciji oziroma se izgubi skozi izločke, feces ali z odmrtnjem organizma (pri razgradnji slednjih so najpomembnejši mikroorganizmi). Veliko konzumentov se hrani z organizmi iz različnih trofičnih nivojev (določene ribe se hranijo z manjšimi ribami in planktonom). Nekateri primarni producenti (fototrofni flagelati) so hkrati konzumenti (fagotrofni flagelati). Sekundarni producenti so tudi heterotrofne bakterije, ki se hranijo z izločki fototrofov ali z raztopljenjo organsko snovjo (ang. *Dissolved Organic Matter* - **DOM**), ki ostane pri hranjenju drugih konzumentov (Atlas, 1998). Ostanke hranjenja rastlinojedega zooplanktona in izločki DOM iz fitoplanktonskih celic se izločajo v vodni stolpec. DOM prav tako z izločki prispevajo druge praživali. Heterotrofne bakterije ves ta material reciklirajo in tako izboljšajo učinkovitost energijske porabe ter prispevajo k ohranjanju ključnih elementov v prehranjevalni verigi.

Prav sposobnost asimilacije DOC (raztopljen organski ogljik) je ključen prispevek bakterij v prehranjevalni verigi (mikrobni zanki). Tako je ogljik v obliki, ki je dostopna višjim trofičnim nivojem.

Nedavne raziskave kažejo, da ekstremno majhne planktonske oblike vršijo večino primarne in sekundarne produkcije ter respiracije v oceanih. Tako **nanoplankton** (< 20 µm) in **pikofitoplankton** (< 2 µm) predstavljata večino fitoplanktonske biomase. Zaradi ekstremno majhnih velikosti tako primarnih (fototrofnih) kot sekundarnih (heterotrofnih) producentov v morskem okolju, so fagotrofni protozoji (mikroflagelati, ciliati, foraminifere, radiolaria) tisti, ki predstavljajo pomembno zvezo med drobnimi producenti in višjimi trofičnimi nivoji prehranjevalne verige. Imenujemo jih **bakterivori** (Atlas, 1998).

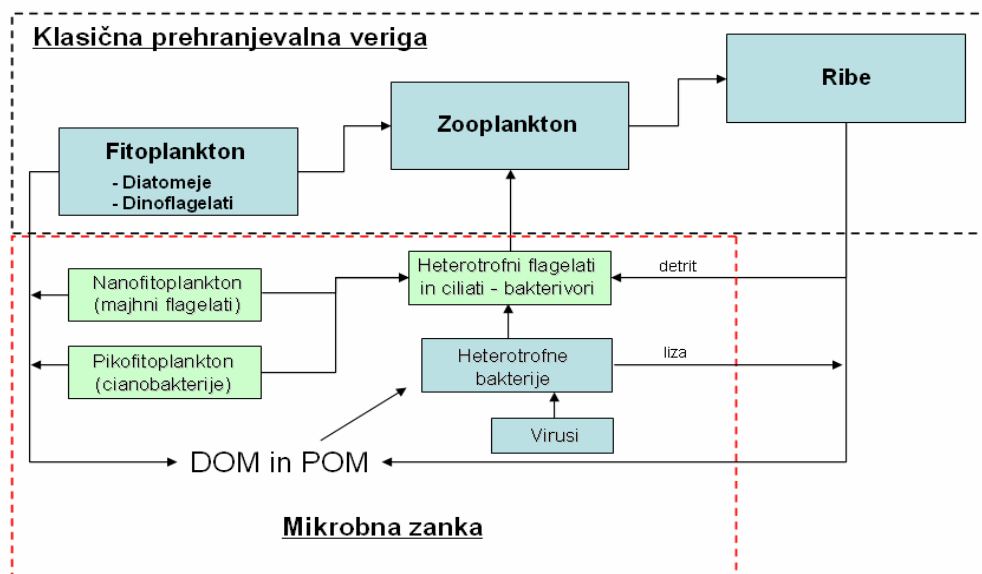
Razgradnja v prehranjevalni verigi vključuje razkroj nepopolno razgrajene organske snovi, kot na primer fekalnih izločki ali uree, in razkroj mrtvih ostankov organizmov. Delež biomase, ki se reciklira z razkrojem v primerjavi s tistim, ki ga porabijo konzumenti, se razlikuje glede na habitat (slika 2).



Slika 2: Biomasa v različnih habitatih (vir: Atlas, 1998).

2.1.2.1 Klasična in mikrobna prehranjevalna veriga

Pri klasični prehranjevalni verigi gre za povezavo med fitoplanktonom – zooplanktonom – ribami. Sloni na davnih raziskavah, kjer so plankton lovili z mrežami, kamor so se ujeli le delci večji od 0,03 mm (velike diatomeje, dinoflagelati in drugo). Vendar pa predstavljajo ti »klasični« avtotrofi (diatomeje, dinoflagelati) le manjši delež fotosintetske aktivnosti. Njih pojedjo večji predstavniki zooplanktona in ribe, kar predstavlja klasično prehranjevalno verigo. Prevladujoči (50-70%) nanofitoplankton (majhni flagelati) in pikofitoplankton (cianobakterije) pa so plen heterotrofnih flagelatov in ciliatov, kar predstavlja **mikrobno zanko**.



Slika 3: Klasična in mikrobna prehranjevalna veriga.

2.1.3 Odvisnost primarne produkcije od dostopnosti nutrientov in svetlobe

Vsa energija, ki je v oceanu na voljo, torej izvira iz primarnih producentov. Od njih je odvisno, koliko energije in tudi kakšni elementi bodo v prehranjevalni verigi.

Fitoplanktonska produktivnost od dostopnosti svetlobe in hranil (nutrientov) ter razmerja med primarno produkcijo in izgubami, ki so posledica paše, lize, njihovih izločkov.

Nutrienti (**esencialni elementi**) so elementi, ki jih organizmi uporabljajo za rast in s tem produkcijo organske snovi (Faganeli, 1999). Esencialni elementi so tisti, ki jih organizmi prevzemajo z aktivnim transportom, **neesencialni** pa so tisti, katerih porazdelitev je odvisna od geokemičnih procesov. V oceanografiji se izraz **nutrienti** uporablja izključno za N, P in Si. Glavne sestavine (C, S, O, H), vključene v biološke procese, so v morski vodi prisotne v veliki količinah in njihova uporaba povzroči le neznatne spremembe koncentracij. **N, P in Si** (predvsem za diatomeje) se porabljajo v bioloških procesih dokler ne postajajo limitni. Nadaljnja rast organizmov je nato omejena v skladu z Liebigovim zakonom, ki pravi, da je

rast organizma pri stalni svetlobi in temperaturi odvisna od elementa prisotnega v najnižji koncentraciji. Esencialni elementi v sledovih (Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Mo) v splošnem ne omejujejo rasti, ker jih organizmi le malo uporabljajo, izjemi sta Fe in Mn v nekaterih morjih. Raziskave vsebnosti C, N in P v morski vodi in morskem fitoplanktonu so pokazale, da je povprečno molsko razmerje **C:N:P** v morski vodi 1017:15:1 in v fitoplanktonu 106:16:1 (Redfieldovo razmerje). Številne raziskave (Faganeli, 1999) so pokazale, da je verjetno N tisti element, ki omejuje fitoplanktonsko rast pred P, čeprav jo P lahko omejuje v daljšem časovnem obdobju, ker prihaja v morje s sladkovodnimi pritoki kot posledica prepravevanja kamnin. Fosfor se regenerira hitreje kot dušik in ta hitreje kot ogljik zaradi nižje energije vezi C-P glede na C-N in C-C (Faganeli, 1999). Limitativnost Si za diatomeje, ki je potreben za tvorbo lupin iz opala, je odvisna od koncentracije Si glede na razpoložljiv N in P.

2.1.3.1 Dušik kot limitni dejavnik

Morje je pomemben rezervoar dušika. Rezervoar anorgansko vezanega dušika, predvsem NH_4^+ in NO_3^- je majhen. Fitoplankton pri intenzivni rasti porablja celoten raztopljen N in P v morski vodi. Nadaljnja rast fitoplanktona potrebuje dodaten (»nov«) dušik ali pa remineraliziran dušik. **Primarna produkcija, ki temelji na uporabi NO_3^- , je nova produkcija, tista, ki temelji na uporabi NH_4^+ , pa regenerirana produkcija.** Limitativnost dušika se nanaša predvsem na novo produkcijo (Faganeli, 1999).

V evfotski coni sta dva glavna vira nutrientov. V lokalnih procesih razgradnje (tako mikroorganizmov kot ostalih organizmov) nastajajo določene količine anorganskih virov (tudi dušika). Drug vir nutrientov pa predstavljajo tokovi globokomorskih vodnih plasti (ang. upwelling) in pritoki kopenskega materiala z rekami ter padavinami (Falkowski, 2003).

Oblika anorganskega dušika, ki ga fitoplankton asimilira, je povezana s tema glavnima viroma nutrientov. Fiksacija dušika je v morju relativno nizka, prav tako nastaja v procesu nitrifikacije malo nitrata glede na potrebe fitoplanktona. Zato je dušik, ki nastane kot produkt lokalne remineralizacije, porabljen (asimiliran) še preden se utegne oksidirati. To je vzrok, da je večina regeneriranega dušika v obliki amonija ali uree. Nasprotno je globlje v morju na voljo dovolj časa, da se anorganski dušik oksidira. Prav tako so kopenski izvori bogatejši z nitratom (Falkowski, 2003).

N:P razmerje je namreč v večini glavnih morskih bazenov ustaljeno na vrednosti 14,7. To razmerje je posledica bioloških procesov in ne obratno. Po Redfieldu so tokovi nutrientov povezani z elementno stehiometrijo organske snovi, ki potone v notranjost oceana. V notranjosti oceana je razmerje anorganskega dušika (v obliki NO_3^-) proti PO_4^{2-} v raztopljeni fazi zelo blizu razmerju teh dveh elementov v živem planktonu. Od tod Redfieldova hipoteza, da asimilacija fitoplanktona določa anorgansko razmerje N:P v oceanu, oziroma da je razmerje teh dveh elementov v raztopljeni fazi posledica toneče in remineralizirane (oksidirane) organske snovi. Ogljik in dušik sta v živih organizmih največkrat v kemijsko reducirani obliki, medtem ko sta v remineralizirani obliki največkrat oksidirana. Zveza je stehiometrijsko prikazana kot:



Reakcija naj bi v globokem morju potekala v desno, v evfotski coni pa v levo. Odstopanja od opisane stehiometrijske enačbe so pogosta, ker elementna sestava fitoplanktona variira, pa tudi razgradnja organsko vezanega N in P je hitrejša od C. Zato je tudi razmerje C:N:P v sedimentirani organski snovi višje (Falkowski, 2005).

Elementna sestava morskega fitoplanktona je konstantna že od razvoja fitoplanktona. Redfieldovo razmerje N:P v POM 16:1 je zgornja meja, ki je v notranjosti oceana ni. Primanjkljaj raztopljenega anorganskega dušika v primerjavi s topnim fosfatom predstavlja rahlo neravnovesje med fiksacijo N_2 in denitrifikacijo na časovni skali 10^3 - 10^4 let. Tako lahko zaključimo, da je prav razmerje med fiksacijo N_2 in denitrifikacijo ključno za izmenjavo CO_2 med atmosfero in oceanom (Falkowski, 2005). V sedimentih ostaja le malo trajno deponiranega dušika.

Vodni bazeni z nizkimi koncentracijami nutrientov so oligotrofni, evtrofni pa so tisti bazeni, kjer prihajajo vnosi vod bogatih z nutrienti iz okolice. Človekova dejavnost z vnosom z nutrienti bogatimi vodami (tudi odpadnimi) ima pomembno vlogo v evtrofikaciji obalnih morij.

2.1.4 Sezonske spremembe in prehranjevalne verige

Temperatura in slanost vplivata na gostoto morske vode. Z višanjem temperature se gostota zmanjšuje, s povečanjem slanosti pa povečuje. Redkejša voda je lažja in je zato nad težjo hladnejšo in gostejšo vodo.

Pozimi hlajenje površinske vode poveča njeno gostoto in voda tone ter se meša z globljimi plastmi vode, ki so bogate s hranilnimi snovmi. Nutrientov je torej dovolj, kljub temu sta nizki fitoplanktonska biomasa in primarna produkcija. Limitna je namreč svetloba. Majhen vpadni kot sončnih žarkov, kratki dnevi in dobra premešanost vodnih plasti so razlogi za manjšo dostopnost svetlobe. Pozimi se fitoplankton zaradi dobre premešanosti več časa nahaja globlje v vodnem stolpcu, pod kompenzacijsko globino in je zato omejen s svetlobo. Kompenzacijska globina je tista globina, pri kateri je fotosinteza enaka respiraciji (to je takrat, ko je na voljo le še 1% površinske svetlobe). Do kompenzacijske globine je t.i. evfotska cona. Pozimi je evfotska cona plitvejša zaradi krajših, oblačnejših dni (Oh, what a tangled web we weave!, 2001).

Spomladi, ko se površinska plast vode segreje in postane manj gosta, se vzpostavi termoklina (in piknoklina). Vertikalna razslojenost zadrži fitoplankton v površinskem delu. Več svetlobe in obilje nutrientov ustvarita razmere za obilno rast fitoplanktona. Rezultat je pomladansko cvetenje. Namnožijo se predvsem diatomeje in dinoflagelati (del »klasične« prehranjevalne verige), posledično pride do povečanja biomase herbivorov in nadaljnjih trofičnih nivojev. Zaradi povečane biomase se penetracija svetlobe zmanjša in evfotska cona manjša. V fazi pospešene rasti pa fitoplankton hitro porabi nutrienete, ki so na voljo v evfotski coni. Zaradi vzpostavljene razslojenosti pa so vertikalni tokovi nutrientov iz globine omejeni. Na odprtem morju je nitrat najpogostejši limitni faktor za rast diatomej in dinoflagelatov. Zaradi pomanjkanja nitrata število diatomej in dinoflagelatov upade, kar vpliva zaviralno tudi na ostale dele klasičnega prehranjevalnega spleta. Drugače pa je v mikrobni zanki. Izločki zooplanktona in ostalih konzumentov povečajo koncentracijo NH_4^+ , nano- in ultraplankton se začneta razmnoževati. Rezultat je cvetenje drobnega fitoplanktona. Plenilci slednjega so navadno flagelati in ciliati (bakterivori), ki se posledično namnožijo.

Poleti močno segrevanje površine morij stratifikacijo še poveča. Pomanjkanje hranil kljub veliki količini svetlobe povzroči nizko stopnjo fitoplanktonske rasti. Na pomanjkanje hranil se fitoplankton prilagaja tudi s pomikanjem vzdolž vodnega stolpca. Tako se klorofilni maksimum ustvari ob t.i. nitriklini. S porabo nitrata se nitriklina pomika navzdol, dokler ne doseže kompenzacijske globine, kjer je limitni dejavnik zopet svetloba. Tako lahko organizmi, ki sestavljajo »klasično« prehranjevalno verigo, še vedno obstajajo, vendar so prisiljeni na življenje v večjih globinah. Sicer je poletni fotosinteza določena s količino nutrientov, ki pride v to, z nutrienti revno, površinsko območje. Anorganski nutrienti nastanejo v procesu remineralizacije, ki jo vršijo bakterije. Nastajajo nitrat, nitrit, amoniak, fosfat, kalij, silikat, železo idr. nutrienti potrebni za rast fitoplanktona. Hitrost razgradnje zooplanktonskega fekalnega peleta in mrtvega fitoplanktona v površinskih slojih določa hitrost fitoplanktonske rasti v tem območju. Prav tako je pomembno neposredno izločanje amoniaka (Oh, what a tangled web we weave!, 2001).

Jeseni se površina morja ponovno ohladi. Gostotno mešanje vodnih mas povzroči povečan donos nitrata in drugih hranil ter posledično cvetenje fitoplanktona. Krajši dnevi, nižje sonce na horizontu, povečano mešanje in večje število herbivorov v primerjavi z okoliščinami spomladi so razlogi za manj intenzivno cvetenje.

V okviru prehranjevalnih verig ima pomembno vlogo bakterioplankton. Poleg uporabe DOM in vključevanje le-te nazaj v prehranjevalni sklop delujejo kot razkrojevalci organskega materiala in s tem prispevajo k ohranjanju elementov v zgornjih plasteh vodnega stolpca, nujno potrebnih za rast fitoplanktona.

Biološke procese (pomladansko in druga cvetenja, prekop iz klasične na mikrobnno prehranjevalno verigo, pomikanje klorofilnega maksimuma vzdolž vodnega stolpca) torej usmerjajo fizikalni (spremembe v količini sončne svetlobe, vertikalna stratifikacija, mešanje vodnega stolpca) in kemični procesi (dostopnost hranil, nastanek nitrikline, prekop iz porabe NO_3^- na porabo NH_4^+).

Bimodalna dinamika primarne produkcije (spomladanski in jesenski višek), ki je značilna za morja zmernege pasu v letni časovni skali, je v severnem Jadranu nekoliko spremenjena zaradi sladkovodnega vnosa hranil (Gilmartin s sod., 1990). Primarna produkcija je najvišja v obdobjih največjega pretoka Pada v pozno spomladanskih mesecih (maj, junij) in jeseni

(oktober, november). Podobno dinamiko z občasno največjo junijsko primarno produkcijo opazimo tudi v Tržaškem zalivu (Mozetič, 1993).

2.1.5 Odziv fitoplanktona na povečane zunanje vnose hranilnih snovi

V najširšem pomenu je **evtrofikacija** nekega vodnega sistema posledica vnosa hranilnih snovi kopenskega izvora, kar neposredno vpliva na povečano primarno produkcijo in kopičenje biomase v prehranjevalni verigi. Dolgoročnejše posledice evtrofikacije so lahko veliko bolj neprijetne in škodljive: sprememba sestave planktonske združbe z zmanjšanjem raznovrstnosti, masovna namnožitev ene ali nekaj fitoplanktonskih vrst (cvetenja ali *blooms*), posedanje fitoplanktonske biomase na dno in bakterijska razgradnja, ki lahko privede do pomanjkanja kisika in pogina bentoških organizmov (Mozetič, 1997).

Nova primarna produkcija ekosistema kot posledica zunanjih vnosov hranilnih snovi je približno enaka regenerirani primarni produkciji (kjer se porabljajo v vodnem stolpcu regenerirane hranilne snovi), kar nakazuje občutljivost severnega Jadrana za nadaljnje antropogeno povečevanje vnosa hranilnih snovi (Gilmartin, 1990). V Tržaškem zalivu delež nove in regenerirane primarne produkcije še ni popolnoma raziskan (Cantoni et al., 2003), vendar podobnost s severnim Jadranom in dosedanje raziskave potrjujejo vpliv sladkovodnih pritokov na povečano koncentracijo hranilnih snovi v morju in s tem dinamiko fitoplanktonske združbe (Olivotti in sod., 1986; Malej, 1995).

Izmed vseh oblik evtrofikacije, ki se pojavljajo v severnem Jadranu, je zaenkrat najmanj razjasnjen fenomen **sluzastih makroagregatov** (ang. *gelatinous macroaggregates* ali mucus). V kolikšni meri je pojavljanje sluzastih agregatov povezano z onesnaževanjem morja ni jasno, saj so znana poročila o »umazanem morju«, ki je mašilo ribiške mreže že leta 1729 (Fonda Umani, 1989). Tudi neredno pojavljanje sluzastih agregatov v 20. stoletju priča o tem, da je za njihov razvoj bolj kot kumulativna masa sladke vode in v njej raztopljenih hranilnih snovi, najverjetneje pomembnejši rečni pretok (Degobbis, 1995).

Kljub različnim hipotezam o izvoru in nastanku sluzastih makroagregatov, so si znanstveniki zdaj enotni, da je osnovna sestavina agregatov organska snov, ki izvira iz fitoplanktona (Mingazzini & Thake, 1995).

Pri raziskavah v Tržaškem zalivu je ugotovljeno (Mozetič, 1997), da se **fitoplankton na povečane zunanje vnose hranilnih snovi odzove približno v tednu dni s povečano klorofilno biomaso, abundanco in primarno produkcijo, pri čemer je za ohranitev visoke produktivnosti in biomase pomembna tudi vzpostavitev stabilnega vodnega stolpca**. V vseh primerih povečanega sladkovodnega vnosa hranilnih snovi se povečata število in delež diatomej v primerjavi s sicer pravladujočimi mikroflagelati. Pikoplanktonske cianobakterije postanejo uspešnejše v hranilno osiromašenem okolju, kjer so koncentracije hranilnih snovi prenizke za večji fitoplankton. Hranilne snovi rečnega izvora pokrijejo potrebe dnevne primarne produkcije le na izlivnem območju v zgornjem oslajenem sloju. Tudi padavine povzročijo spremembe v taksonomski sestavi združbe, saj se poveča delež diatomej.

2.2 IZOTOPSKA FRAKCIONACIJA MED PRIMARNO PRODUKCIJO

Stabilni izotopi C in N so se izkazali za učinkovite indikatorje biogeokemičnih procesov v številnih oceanskih in estuarijskih študijah (Ostrom in sod., 1997). Popolno razumevanje teh procesov pa zahteva poznavanje (1) izotopske sestave snovi raziskave in (2) smeri ter stopnje izotopskih sprememb med procesi, v katere so vključeni mikroorganizmi oziroma fitoplankton. Vsekakor pa so študije biogeokemičnih reakcij v naravnem okolju zahtevne zato, ker so izotopske spremembe lahko posledica številnih različnih reakcij in procesov (izotopsko razmerje lahko spremeni na primer fotosinteza, trofični prehod ali razgradnja) (Altabet, 1996).

2.2.1 Osnove izotopske biogeokemije

Izotopsko sestavo oziroma razmerje med deležem težjega in lažjega izotopa v spojini izražamo s takoimenovano **vrednostjo δ** , ki predstavlja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (*vz*) glede na izbrani standard (*st*) in jo izražamo v promilih, ‰:

$$\delta X = \frac{R_{vz} - R_{st}}{R_{st}} \times 1000 \quad \dots(1)$$

V zgornji enačbi pomeni X težji izotop elementa (^{13}C , ^{15}N), R pa razmerje med težjim in lažjim izotopom v vzorcu in standardu ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). Mednarodne standarde določa Mednarodna agencija za atomsko energijo (IAEA) na Dunaju in Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo (NIST). Izbrani so tako, da imajo izotopska razmerja čimbolj podobna povprečni razširjenosti določenega izotopa v naravi (Engel in Macko, 1993). Za ogljik je bil privzet karbonatni standard fosila *Belemnite Americana* iz kredne formacije PeeDee v Južni Karolini (PDB – Pee Dee Belemnite) z vrednostjo $R_{st} = 0,0112372$ (Craig, 1957), za dušik pa je kot standard privzet zračni dušik (AIR) z vrednostjo $R_{st} = 0,0036765$ (Coplen, 1996). Zaradi premajhne količine PDB v naravi so izdelali umetni karbonat z enako izotopsko sestavo in ga označili z VPDB (VPDB – Vienna Pee Dee Belemnite), zato se vsi rezultati podajajo na vrednost VPDB (Coplen, 1996).

Pogosto se pri izotopskih vrednostih substanc uporablja izraz »osiromašen« s ^{13}C ali ^{15}N . To pomeni, da določena (osiromašena) substanca vsebuje relativno manj težjega izotopa ^{13}C ali ^{15}N . Ekvivalenten izrazu osiromašen je tudi termin »lahek«. Nasprotno pa za substanco, ki vsebuje relativno več težjega izotopa, rečemo, da je obogatena (ali težja). Razumeti pa je treba, da noben od omenjenih izrazov (obogaten, osiromašen, lahek) ne daje podatkov o absolutni količini ^{13}C ali ^{15}N .

Izraz **frakcionacija** izraža različno porazdelitev izotopov med reaktante in produkte, ki med reakcijo nastanejo. Proces, ki vodi do frakcionacije, pa je **izotopski efekt**. Slednji je povezan z večino vseh bioloških, kemijskih in fizikalnih procesov, ki vključujejo stabilne izotope. Ni nujno, da je frakcionacija vidna vedno, kadar je prisoten izotopski efekt.

Obstajata dve vrsti izotopskega efekta, ki vodita k frakcionaciji: (A) fizikalen izotopski efekt; in (B) kemijski izotopski efekt. Slednjega lahko naprej delimo na efekt, ki se zgodi med: (a) ravnotežjem; in (b) ireverzibilno kemijsko reakcijo. Fizikalna frakcionacija, ki se dogaja na primer med difuzijo, je posledica dejstva, da se lažji izotop premika hitreje od težjega. Kemijska frakcionacija pa se zgodi zato, ker ima kemijska vez, ki vključuje težji izotop, nižjo vibracijsko frekvenco, oziroma je vez močnejša od ekvivalentne pri lažjem izotopu.

Veliko encimskih reakcij v fotosintezi in drugih biosintetskih poteh je povezanih z izotopskim efektom. Med potekom reakcij pride do različnega razporejanja izotopa oziroma do izotopske frakcionacije med substratom in produktom. Večina biokemijskih reakcij favorizira lažji izotop. Negativna izotopska frakcionacija se kaže kot osiromašenje s težjim izotopom v produktu v primerjavi s substratom.

Razliko med izotopsko sestavo dveh snovi opišemo s faktorjem izotopske frakcionacije, α . V primeru ireverzibilne reakcije, kjer prehaja spojina A v spojino B ($A \rightarrow B$), faktor izotopske frakcionacije, α , izrazimo z:

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

kjer sta R_A in R_B koncentracijski razmerji med težjim in lažjim izotopom ogljika ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) v spojini A in spojini B.

Ob upoštevanju zgornje enačbe lahko izrazimo frakcionacijski faktor α z vrednostmi δ in dobimo:

$$\alpha_{A-B} = \frac{1000 + \delta A}{1000 + \delta B} \quad \dots(3)$$

kjer sta δA in δB izotopski sestavi spojin A in B. Zaradi lažje primerjave se frakcionacijske faktorje pogosta izraža v promilih (‰) z vrednostmi ε in sicer:

$$\begin{aligned} \varepsilon &= (\alpha - 1) \times 1000 \\ \delta_B &= \delta_A - \varepsilon \end{aligned} \quad \dots(4)$$

Za anorganske reakcije je ε funkcija reakcijskih pogojev, predvsem temperature. Pri bioloških procesih pa je ε pogosto ne le funkcija encimske biokemije, temveč tudi fiziologije organizma.

2.2.2 Izotopi ogljika

2.2.2.1 Frakcionacija med fotosintezo

Primarni encim odgovoren za fiksacijo anorganskega ogljika je ribuloza 1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO), ki katalizira reakcijo med ribulozo 1,5-bifosfatom in CO₂, pri čemer nastaneta dve molekuli 3-fosfoglicerata kot del Calvin-Bensonovega ciklusa. Encim močno diskriminira težji izotop ¹³C, tako da so vrednosti izotopske frakcionacije do 27‰ v primerjavi z izotopsko vrednostjo izvornega ogljika. Obsegi dejanske frakcionacije so spreminjajoči, saj so odvisni od dostopnosti ogljika in transporta anorganskega ogljika v celico ter specifične karboksilatne poti (Falkowski, 2005). Ne glede na obseg se neto učinek fiksacije anorganskega ogljika kaže v obogatitvi bazena anorganskega ogljika z ¹³C, medtem ko je nastali organski ogljik obogaten z ¹²C.

Izotopska frakcionacija fotosintetskega ogljika (27‰) združuje izotopski efekt med difuzijo CO₂ v rastlino (celico) in kombiniran izotopski efekt, ki poteka med fiksacijo CO₂ z RuBisCO in fosfoenolpiruvat (PEP) karboksilazo. Rastline, ki uporabljajo C₄ pot fotosinteze imajo alternativni encim, fosfoenolpiruvat karboksilazo (PEP karboksilaza) za prvi korak fiksacije CO₂ (v C₃ rastlinah, tudi morskemu fitoplanktonu, je RuBisCO edini encim, ki veže CO₂).

Izotopski efekt, povezan s tem encimom (2.2‰) je veliko manjši od efekta RuBisCO, zato imajo C₄ rastline bolj pozitivno izotopsko sestavo v obsegu od -8 do -18‰, povprečno -17‰ (Engel in Macko, 1993).

Izotopska frakcionacija v vodnih rastlinah je bolj kompleksna. Difuzija CO₂ v rastlino ali celico je pogosto omejujoč korak, saj CO₂ difundira v vodi počasneje kot v zraku. Večina vodnih rastlin ima membransko vezane mehanizme, ki aktivno transportirajo raztopljeni anorganski ogljik (DIC) v fotosintezirajočo celico, kar omogoča visoko intenziteto fotosinteze majhnim koncentracijam DIC (največ v obliki CO₂ in HCO₃⁻) navkljub. Kadar so koncentracije DIC nizke, rastlina vključi CO₂ ali HCO₃⁻ črpalko, ki kopiči DIC v celici za fotosintezo. Posledica aktivnega transporta DIC-a v celico je velik notranji bazen substrata pripravljenega za fotosintezo. Večina tega akumuliranega CO₂ ne zapusti celice dokler se z encimom RuBisCO ne fiksira. Izotopska frakcionacija ogljika povezana z algami je zato relativno majhna (~5‰), čeprav je primarni encim za CO₂ fiksacijo RuBisCO (Engel in Macko, 1993).

2.2.2.2 Interpretacija izotopske sestave ogljika organske snovi v okolju

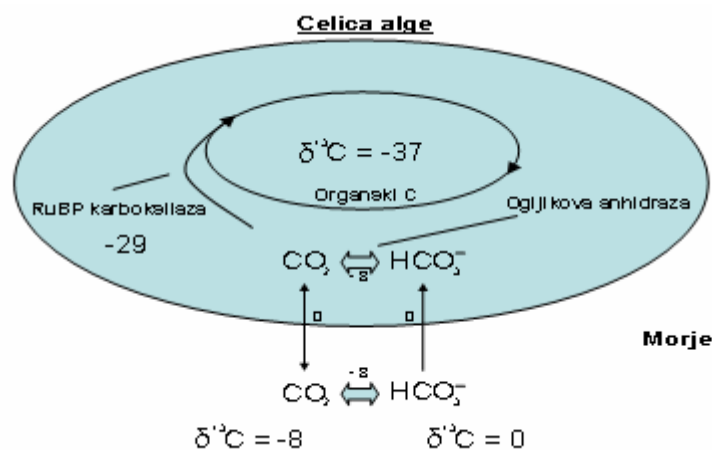
Izotopska sestava ogljika v organski snovi v vodnih sistemih in sedimentih se pogosto uporablja za sledenje poti organskega materiala od izvora do ponora (Engel in Macko, 1993). Suspendirana organska snov (POM), ki vključuje detrit, fitoplankton, mikroheterotrofe in zooplankton je prav tako pogosto predmet analiz. $\delta^{13}\text{C}$ morskega POM je v območju -20 do -28‰, tipična morska $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ vrednost naj bi bila -22‰ (Altabet, 1996), v Tržaškem zalivu pa je povprečna $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ vrednost -21‰ (Ogrinc in sod., 2005). Vzroki za take vrednosti izotopske sestave so različni.

Mešanje kopenskega organskega ogljika ($\delta^{13}\text{C} = -27‰$, Ogrinc in sod., 2005) z *in situ* izhajajočim ogljikom lahko vpliva na izotopsko vrednost organskega materiala ob izlivih rek (Engel in Macko, 1993). Na odprtem oceanu pa so $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti biomase neodvisne od kopenskih izvorov.

Drug možen regulator izotopske sestave POC (suspendiranega organskega ogljika) je izotopska sestava DIC (raztopljenega anorganskega ogljika), ki je na voljo za rast organizmov. Študije so pokazale (Quay in sod., 1986), da je $\delta^{13}\text{C}$ v DIC površinskih vod

določen z ravnovesjem med fotosintetsko porabo in respiratorno produkcijo. Med pomladjo in poletjem, ko je stopnja fotosinteze visoka, je DIC obogaten z ^{13}C , medtem ko jeseni, ko je respiracija dominantna, postane $\delta^{13}\text{C}$ vrednost DIC bolj negativna, saj je bila organska snov remineralizirana.

Verjetno se izotopske vrednosti POC ne more pripisati zgolj mešanju dveh po izvoru različnih organskih snovi (kopenske in morske) ali izotopski sestavi DIC. Kot že omenjeno, je izotopska frakcionacija med fotosintezo odvisna od koncentracije CO_2 , ki je v celici na voljo za fiksacijo. Zaradi bazičnega pH (8.2) morske vode je večina DIC v obliki HCO_3^- in ne CO_2 (ki jo katalizira RuBisCO). Pri nizkih koncentracijah DIC fitoplankton začne z aktivnim transportom hidrogenkarbonata. Notranji (v celici) bazeni DIC so zato obogateni z ^{13}C , saj je izotopska vrednost HCO_3^- za ~ 8‰ bolj pozitivna od vrednosti raztopljenega CO_2 . Posledično se zmanjša tudi izotopska frakcionacija ogljika.



Slika 4: Model diskriminacije izotopov ogljika (RuBisCO in ravnovesje CO_2 , HCO_3^-) (Engel in Macko, 1993).

Wong in Sackeltt (1978) sta dobila velik razpon v $\delta^{13}\text{C}$ vrednostih pri 17 različnih vrstah morskega fitoplanktona in sicer med -22,1 in -35,4‰, kar pripisujeta različnim metabolnim potem tega fitoplanktona.

Izotopska frakcionacija ogljika pri morskem fitoplanktonu je torej odvisna od več potencialnih faktorjev (Rau in sod. 1996). Slednji vključujejo transport CO_2 v celico (pasivni ali aktivni) in intracelularno encimsko frakcionacijo ter:

- obliko celic

-
- stopnjo rasti
 - permeabilnost membrane za CO₂
 - temperaturo, pH, slanost.

Dokazali so (Rau in sod., 1996) obratnosorazmerno odvisnost med izotopsko sestavo morske $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ in koncentracijo CO_{2 (aq)}, pod pogoji zmanjšane koncentracije CO_{2 (aq)} pa aktivni prevzem anorganskega ogljika in uporabo HCO₃⁻.

V raziskavi so Popp in sod. (1997) zaključili, da so alge (*Synechococcus*) v njihovem eksperimentu zadovoljevale potrebe po ogljiku tako z difuzijo kot tudi z aktivnim transportom CO_{2 (aq)} čez plazmalemo. Menijo, da se lahko izotopsko frakcionacijo ogljika v morskem fitoplanktonu kvantificira s poznavanjem (1) ϵ_f (diskriminacije povezane s fiksacijo CO₂), (2) stopnje rasti, (3) koncentracije CO_{2 (aq)} in (4) razmerja volumna in površine.

Tudi druge študije fitoplanktona poročajo o velikem razponu $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti različnih vrst, pri različni količini svetlobe, temperaturi, stopnji rasti, prepustnosti membrane in različnih poteh fiksacije ogljika (Faganeli in sod., 1989; Thompson in Calvert, 1995; Rau in sod., 1997).

Pomanjkanje dušika se je izkazalo za dejavnik, ki aktivira mehanizem za koncentriranje HCO₃⁻ v fitoplanktonu. Z zviševanjem stopnje pomanjkanja dušika se namreč znižuje količina karboksilatnih encimov. Izotopska frakcionacija je torej odvisna tudi od dostopnosti svetlobe in nutrientov, saj slednja vpliva na stopnjo fotosintetske produktivnosti, ki kontrolira intracelularne koncentracije DIC (Engel in Macko, 1993).

Fiziološke osnove za razumevanje povezanosti CO_{2 (aq)} in $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ je potrebno razložiti natančneje (Altabet, 1996).

2.2.3 Izotopi dušika

2.2.3.1 Frakcionacija med fotosintezo

Izotopska diskriminacija med anorganskim virom in organskim dušikom v fotosintetskih organizmih je rezultat frakcionacije, ki poteka v primarni asimilaciji določenega vira dušika (N₂, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺). Fiksacija anorganskega dušika poteka med fotosintezo preko različnih encimskih poti; je pa razumevanje izotopskih pojavov v zvezi z asimilacijo dušika še

precej na začetku v primerjavi z meritvami CO₂-fiksirajočih encimov. Prav tako ima tudi ravnovesje med NH₄⁺ in NH₃ velik vpliv na frakcionacijo izotopov poleg kinetičnega encimskega efekta (Engel in Macko, 1993).

Amoniak se lahko vključi v glutamat z encimom glutamat dehidrogenazo. **Glutamin sintetaza** je drugi ključni encim pri asimilaciji amoniaka in je odgovoren za ta proces pri fitoplanktonu in bakterijah. NO₂⁻ in NO₃⁻ sta prvotno reducirana z nitrat in nitrit reduktazama do NH₃, ki se lahko fiksira v organsko snov. Vendar kompleksni reakcijski mehanizmi z vidika izotopske frakcionacije teh dveh encimov še niso jasni (Engel in Macko, 1993). Podobno velja za encim nitrogenazo, ki je odgovoren za fiksacijo atmosferskega N₂.

Problemi pri meritvah v naravi pa so sledeči; suspendirani dušik, predvsem fitoplankton in alge, je lahko pomešan tako z različnimi fotosintetskimi in nefotosintetskimi organizmi kot tudi z detritom. Prav tako so interpretacije podatkov lahko težavne zaradi majhnega števila podatkov o δ¹⁵N anorganskega dušika v morskem okolju. Ob dejstvu, da frakcionacija določenega elementa poteka samo v primeru, da je tega elementa v izobilju, so naslednje težave jasne. Dušikovi nutrienti so pogosto limitni, zato so zgolj meritve izotopske sestave organskega in anorganskega dušika lahko zavajajoče (Engel in Macko, 1993).

Regenerirana produkcija je odvisna od privzema NH₄⁺ in DON, medtem ko privzem NO₃⁻ in N₂ fiksacija prispevata k **novi produkciji** (Pantoja in sod., 2002).

2.2.3.2 Asimilacija amonija in frakcionacija

Po teoretičnih predpostavkah naj bi produkt postal osiromašen s ¹⁵N glede na substrat (Owens, 1987). Prihaja pa do izjem, kot na primer pri fitoplanktonski asimilaciji amonija. Tako naj bi se po podatkih Wada in Hattori (1978) izotopska sestava fitoplanktona pri asimilaciji amonija gibala med -9,6 do +7,3‰. Zaradi kationske izmenjave (kjer se v adsorbirani NH₄⁺ frakciji zadrži več težjega ¹⁵N v primerjavi z lažjim ¹⁴N) prihaja do obogatitve fitoplanktona v primerjavi z substratom (amonijem), kar je v nasprotju s frakcionacijsko teorijo. Macko s sod. (1987) navaja naslednje podatke; izotopska frakcionacija med asimilacijo NH₄⁺ pri algah zelo variira (od 0 do -27‰). Najvišje vrednosti (od 0 do -13‰) so bile izmerjene, ko so bile koncentracije NH₄⁺ v ravnem okolju milimolarne. Nasprotno pa so bile nizke vrednosti (od -19 do -27‰) izmerjene v kulturi

diatomej pri mikromolarnih koncentracijah NH_4^+ . Nekaj modelov, ki so bili razviti za opis frakcionacije raztopljenega anorganskega dušika med rastlinsko asimilacijo, temelji na difuzijskem transportu čez celično membrano in encimski kinetiki (Engel in Macko, 1993). Ker so koncentracije amonija v sladkih in slanih vodah pod $100 \mu\text{M}$, mora model vsebovati tudi mehanizme aktivnega transporta. Pri meritvah izotopske frakcionacije glutamin sintetaze je potrebno upoštevati izotopski efekt ravnovesja med NH_3 in NH_4^+ , saj je NH_3 oblika dušika, ki jo encim uporabi.

Visoke vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ suspendirane organske snovi naj bi bile posledice asimilacije s ^{15}N obogatene amonija (Ostrom in sod., 1999). Poleg tega **k visokim vrednostim $\delta^{15}\text{N}$ prispevajo še izločanje dušikovih spojin iz fitoplanktona, paša mikrozooplanktona in mikrobna razgradnja** (vse komponente mikrobne zanke).

2.2.3.3 Asimilacija nitrata in frakcionacija

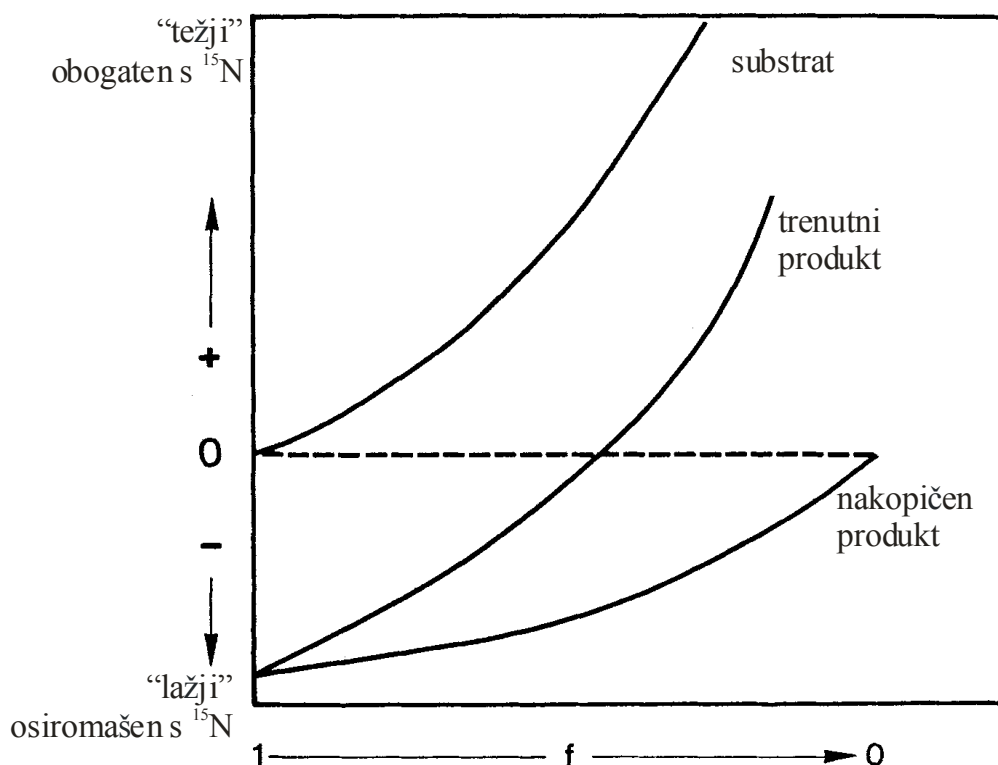
Po podatkih Wada an Hattori (1978) naj bi bile $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti fitoplanktona, ki asimilira nitrat, vrednosti izotopske frakcionacije nitrata med $-1,4$ in $-18,5\text{‰}$ (Owens, 1987). Izotopska frakcionacija med fitoplanktonskim privzemom NO_3^- vodi do značilno nižjih $\delta^{15}\text{N}$ vrednostih suspendiranega dušika (PN) v primerjavi z NO_3^- (ϵ za NO_3^- je lahko tudi do 19‰). Izotopska frakcionacija je odvisna od vrste fitoplanktona. Diatomeje naj bi imela višji ϵ (9 do 12‰), medtem ko naj bi bil ϵ pri drugih vrstah povprečno med 1 in 3‰ (Altabet, 1996). **Kadar je na voljo malo NO_3^- , so vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ višje. Višje δN vrednosti NO_3^- pa vplivajo na višje $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti novo nastalega PN. Višje $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti novo nastalega PN pa so lahko tudi posledica preklopa iz asimilacije NO_3^- na NH_4^+ (ki naj bi imel večjo vsebnost težjega izotopa v primerjavi z NO_3^-)** (Owens, 1987). Analogno z vertikalnimi variacijami $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ s koncentracijo NO_3^- , so $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti PN v evfotski coni najnižje na spodnji meji te cone, kjer je koncentracija NO_3^- najvišja, proti površini pa rastejo z manjšanjem koncentracije nitrata.

Nitrat obogaten s ^{15}N je torej povezan z denitrifikacijo in asimilativno redukcijo nitrata (Sutka in sod., 2003). Denitrifikacija naj bi bila povezana z visokim ϵ (okoli 30‰), vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ nitrata pa naj bi bile okoli 18‰ . Asimilativna redukcija pa naj bi imela ϵ nekoliko nižji (od 0 do 19‰).

V nasprotju, pa pri cvetenju fitoplanktona prihaja tekom časa do večjih sprememb v vrednostih $\delta^{15}\text{N}$ v nitratu in PN. Te spremembe so posledica pomanjkanja nutrientov in frakcionacije povezane s porabo NO_3^- . Gre za proces podoben **Reyleighovi frakcionaciji** in ga lahko zapišemo v obliki enačbe:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3-(f)} = \delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3-(f=1)} - \varepsilon \cdot \ln(f) \quad \dots(5)$$

kjer f predstavlja frakcijo porabljenega substrata – razmeje med trenutno in začetno koncentracijo nitrata ($[\text{NO}_3^-]_{\text{trenutni}}/[\text{NO}_3^-]_{\text{začetni}}$). V zaprtem sistemu postaja nakopičen produkt postopoma manj osiromašen s ^{15}N , tako da je takrat, ko ves substrat zreagira, $\delta^{15}\text{N}$ produkta identična $\delta^{15}\text{N}$ substrata na začetku reakcije (Owens, 1987). Drugače povedano, izotopska diskriminacija se manjša in v kolikor reakcija poteče popolnoma, ni opazna nikakršna obogatitev niti osiromašenje produkta v primerjavi s substratom. Ob tem pa je bil izotopski efekt ves čas reakcije prisoten.



Slika 5: Diagram sprememb $\delta^{15}\text{N}$ substrata, trenutnega in nakopičenega produkta med ireverzibilno reakcijo, kjer iz substrata nastaja produkt (Owens, 1987).

2.2.3.4 Fiksacija N₂ in frakcionacija

Stopnja izotopskega efekta pri fiksaciji dušika je majhna, pogosto je frakcionacija nezaznavna (Owens, 1987). Posledica tega je, da so vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ pri organskem dušiku, nastalem iz fiksiranega atmosferskega dušika, blizu atmosferskim, kar pomeni blizu 0‰.

2.2.3.5 Interpretacija izotopske sestave dušika organske snovi v okolju

Razporeditev dušikovih spojin v morju je odvisna od fizikalnih, kemijskih in bioloških faktorjev (Pantoja in sod., 2002). V evfotski coni je razporeditev odvisna od:

- vnosa nitrata iz globlin
- privzema anorganskega dušika s strani fitoplanktona
- heterotrofne mineralizacije organskega dušika
- izgube dušika zaradi tonjenja suspendiranega organskega dušika (PON) in vertikalnih migracij organizmov
- transporta DON in
- biološke N₂ fiksacije.

Izotopska sestava fototrofnega organskega materiala je torej odvisna od encimske frakcionacije, difuzije in izotopskega efekta ravnotežja, ki določa izotopski sestavo med primarno produkcijo. Problemi z interpretacijo meritev $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti izhajajo tudi iz spremenljivosti organizmov, ki preklopijo na primer iz porabe nitrata na porabo amonija (Engel in Macko, 1993).

Kljub pomanjkanju informacij o izotopski frakcionaciji dušika pri fototrofni asimilaciji v naravnem okolju, so bili podatki o $\delta^{15}\text{N}$ vrednostih partikuliranega dušika v primerjavi z $\delta^{15}\text{N}$ raztopljenega organskega dušika koristni pri sledenju fiksacije N₂, denitrifikacije, nove primarne produkcije iz regeneriranega dušika in trofičnih transferjev v morskih ekosistemih (Engel in Macko, 1993).

Določitev stopnje fiksacije N₂ je težavna, saj je vzorčenje cianobakterij v morju težavno, čeprav pa se z uporabo indirektnih metod ugotavlja, da je N₂ fiksacija pomembnejša kot je veljalo in sicer tako kot takojšen vir dušika v površinskem oceanskem sistemu kot tudi s prispevanjem k novemu dušiku v notranjosti oceana (Pantoja in sod., 2002). Študije (Sutka in sod., 2003) so pokazale pomembno vlogo fiksacije v primarni produkciji, **nizke vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ - naj bi nakazovale fiksacijo.**

Njihovi rezultati (Sutka in sod., 2003) kažejo na nitrifikacijo kot alternativno razlago nizkih $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ - vrednosti, za razliko od fiksacije pa nitrifikacija ne prispeva k večjemu rezervoaru dostopnega dušika. Sklopljena procesa nitrifikacije/denitrifikacije naj bi prispevala k izgubi dušika v evfotski coni in v kolikor se izkaže ta izguba za pomembno, ima povezanost teh dveh procesov velik vpliv na PP in izvoz organskega materiala.

Različne raziskave so pokazale tudi močnejši kopenski signal ob izlivih rek zgodaj spomladi, ko so tokovi najmočnejši. Terestična organska snov, ki jo prinese v Tržaški zaliv reka Soča, je navadno osiromašena z dušikom, izotopske vrednosti pa so naslednje: $\delta^{15}\text{N} = 1,7\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C} = -26\text{‰}$. Značilni vrednosti fitoplanktona Tržaškega zaliva pa sta: $\delta^{15}\text{N} = 7,3\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C} = -21\text{‰}$ (Ogrinc in sod., 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PODROČJE RAZISKAV

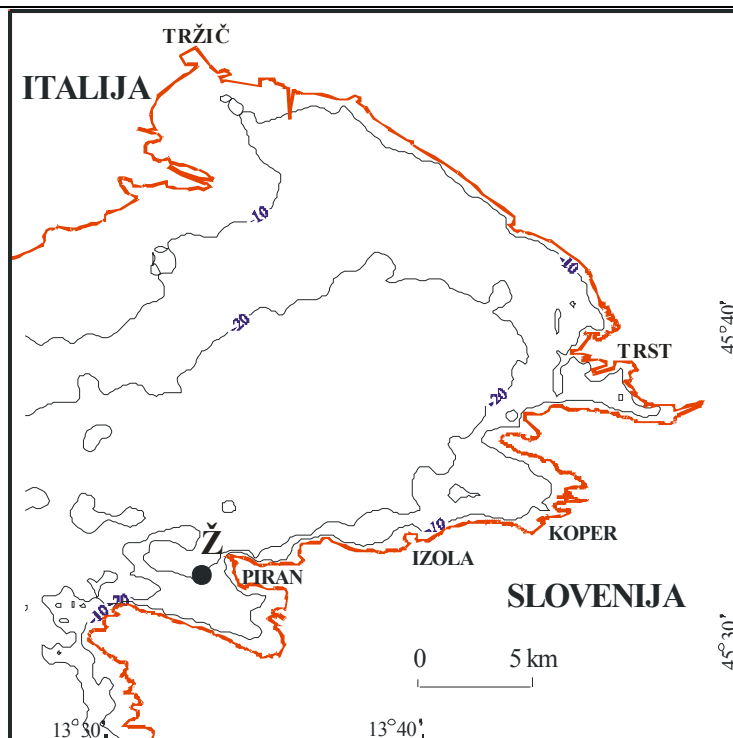
Tržaški zaliv omejujeta rt Savudrija na jugu in Gradež na severu. Je majhen (približno 500 m²) in najplitvejši (maksimalna globina je 25m) severovzhodni del severnega Jadrana (Ogrinc in sod., 2003). Smer toka v zalivu je pretežno nasprotna smeri urinega kazalca s hitrostjo 2-3 cm s⁻¹ (Malačič, 1991). Površinska plast (debeline približno 5 m) je podvržena vetrovnim tokovom, ki se gibljejo ob vzhodnih vetrovih v nasprotni smeri urinega kazalca, ob zahodnih pa v smeri urinega kazalca (Malačič, 1991). Slanost vode v zalivu je med 33 in 38,5, značilen je velik temperaturni razpon za površinski (6-25°C) in pridneni sloj (6-20°C). Struktura vodnega stolpca se spreminja sezonsko; za zimsko in zgodnje spomladansko obdobje je značilna izrazita vertikalna in horizontalna premešanost, od maja do septembra pa se v vodnem stolpcu vzpostavi vertikalna temperaturna in gostotna razslojenost, ki se lahko v poletnem času občasno poruši zaradi močnih kratkotrajnih neviht (Malej in sod., 1997). Posledica razslojenosti v poznem poletju je pogosta hipoksija (občasno anoksija) v pridnenem sloju (Faganeli in sod., 1985). Največji dotok sladke vode Tržaškega zaliva predstavlja reka Soča s povprečnim pretokom 197 m³ s⁻¹ (INTERREG II, 2001). Koncentracije hranilnih soli, še posebej nitrata in silikata, sledijo sezonskemu nihanju rečnih vnosov (na pomlad) in obilnejšim padavinam (jeseni). Koncentracija hranilnih soli je največja v površinskem sloju spomladi in jeseni ter poleti v pridnenem sloju pod termoklino, kot posledica regeneracijskih procesov (Mozetič, 1997).

Sezonska spremenljivost se kaže tudi v taksonomski strukturi fitoplanktonske združbe. V večjem delu leta prevladujejo mikroflagelati (Fanuko, 1981). To so goli, avtotrofni bičkarji, ki po velikosti sodijo med nanoplankton (2-20 µm) (Mozetič, 1997). Taksonomsko pripadajo različnim razredom. Občasno se pojavijo izraziti diatomejski viški (*Bacillariophyceae*, diatomeje ali kremenaste alge), ki so omejeni na krajša časovna obdobja in največkrat predstavljajo tudi absolutne viške celotne fitoplanktonske združbe. Praviloma so ti viški sezonsko omejeni na pomlad in jesen, kar je značilno za obalna morja zmernege pasu (Fanuko, 1981), vendar je bliskovit porast diatomej v Tržaškem zalivu povezan tudi s kratkotrajnimi poletnimi nevihtami, povečanim vnosom hranilnih snovi in premešanjem razslojenega vodnega stolpca (Malej in sod., 1997). Takšne nenadne spremembe lahko spremenijo sestavo in gostoto fitoplanktona. V zimskih mesecih prevladujejo kokolitoforidi

(red *Coccosphaerales*). Dinoflagelati (*Dinophyceae* ali oklepni bičkarji) so vedno prisotni (Mozetič, 1993). Silikoflagelati (*Dictyochosphaerales*) so prisotni jeseni in pozimi in še tedaj v zelo majhnem številu. Enocelične prokariotske cianobakterije imajo manjši višek spomladi in izrazit višek v poletnih mesecih, ko njihov delež pri fiksaciji anorganskega ogljika v hranilno osiromašenem okolju preseže 70% (Malej in sod., 1995)

3.2 VZORČENJE

Vzorke vode smo odvezemali v površinski plasti (v globini 0,3 m) na stalni postaji »Ž« v Piranskem zalivu (slika 6) s plastičnimi posodami v obdobju od februarja do septembra 2003 in 2004 v časovnem razmaku približno 10 dni. Največ meritev smo opravili v juniju, to je v času intenzivnega sluzenja morja oziroma največje prisotnosti sluzastih makroagregatov. Vzorec morske vode iz površinske plasti (6 x po 1 liter iz 10 litrskega izhodnega vzorca) smo takoj po prihodu v laboratorij prefiltrirali skozi predhodno prežgan filter (4 ure pri temperaturi 480°C) iz steklenih vlaken Whatman GF/F (s povprečnimi porami 0,7 µm) ali skozi membranski filter Millipore HA (s povprečnimi porami 0,45 µm) za določanje klorofila a pri maksimalnem vakuumu 1,33 Pa, tako da ni prišlo do poškodb celic. Delce na filtru Whatman GF/F smo spirali z destilirano vodo, da smo odstranili soli. Liofilizirane vzorce smo nato uporabili za določanje izotopske (¹³C in ¹⁵N) sestave suspendirane snovi, koncentracije suspendiranega organskega ogljika (POC) in suspendiranega dušika (PN) ter vsebnost proteinov in ogljikovih hidratov v suspendirani snovi.



Slika 6: Piranski zaliv s točko vzorčenja.

Za določanje izotopske sestave raztopljenega anorganskega ogljika smo vzorce vode filtrirali skozi membranski filter s premerom por 0,45 μ m. V odvzetih nefiltriranih vzorcih smo vzporedno merili še koncentracije raztopljenih hranilnih soli NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, SiO₄⁴⁻ ter celotni-N (N_{tot}) in celotni-P (P_{tot}).

3.3 FITOPLANKTONSKE KULTURE (MIKROALG)

Mikroalge vrst *Scrippsiella trochoidea*, *Prorocentrum minimum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Skeletonema costatum*, izolirane iz mrežnega (najlonska mreža s porami 53 μ m) fitoplanktona v Tržaškem zalivu, so rasle v kulturah z obogateno morskovo vodo (medij "f/2"; Guillard in Ryther, 1962) pod 20 W fluorescentnimi žarnicami z 12 urnim dnevno-nočnim ciklom pri konstantni temperaturi 18 °C v Laboratoriju za morskovo biologijo v Nabrežini pri Trstu. V stacionarni fazi rasti smo kulture mikroalg prefiltrirali skozi predhodno prežgan stekleni filter Whatman GF/F, mikroalge na filtru splaknili z destilirano vodo in liofilizirali.

3.4 ANALIZE

3.4.1 Določanje izotopske sestave suspendirane organske snovi in fitoplanktonskih kultur ($\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$)

Vzorci za določitev izotopske sestave ogljika POC in fitoplanktonskih kulturah, $\delta^{13}\text{C}$, smo pripravili po sledečem postopku: vzorce smo nakisali z 1M HCl, da smo odstranili anorganski ogljik, in posušili. Nato smo jih zatehtali v posebne cinkove kapsule. Vzorce za določitev izotopske sestave PN in fitoplanktonskih kulturah, $\delta^{15}\text{N}$, smo brez predhodne predpriprave zatehtali v cinkove kapsule. Nato smo meritve izvedli na masnem spektrometru Europa 20-20 s preparativnim nastavkom ANCA-SL za trdne in tekoče vzorce. Rezultati meritev izotopskih vrednosti so podani z vrednostmi δ relativno glede na mednarodne standarde (za ogljik VPDB, za dušik je to atmosferski dušik) in izraženi v ‰. Pravilnost poteka meritev smo preverjali z delovnimi standardi in referenčnimi materiali. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ preverjamo z delovnim standardom ureo katerega povprečna $\delta^{13}\text{C}$ vrednost je $-30,5 \pm 0,2\text{‰}$, za dušik pa uporabljamo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ z vrednostjo $\delta^{15}\text{N} = 2,5 \pm 0,3\text{‰}$ in referenčnim materialom NBS 22 z vrednostjo $\delta^{13}\text{C} = -29,7 \pm 0,1\text{‰}$ ter IAEA N1 z vrednostjo $\delta^{15}\text{N} = 0,4 \pm 0,3\text{‰}$. Natančnost meritev znaša $\pm 0,1\text{‰}$ za $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti in $\pm 0,3\text{‰}$ za $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti.

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

Metoda je razvita na osnovi kemijske reakcije med nasičeno kislino H_3PO_4 in vodo, kjer se raztopljeni anorganski ogljik pretvori v CO_2 (Capasso in sod., 2003). Vzorce za določitev izotopske sestave raztopljenega anorganskega ogljika, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$, smo pripravili tako, da smo v ampule s septumom volumna 12 ml dodali 2 kapljici nasičene H_3PO_4 in jih prepihali s helijem, da smo se znebili vpliva CO_2 iz zraka. Tako pripravljene ampule smo prelili s 6 ml vzorca in izotopsko sestavo sproščenega CO_2 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 $-10,8 \pm 0,2\text{‰}$. 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‰, nato delovni standard Na_2CO_3 in set 10-tih vzorcev. Napaka meritev tako pripravljenih vzorcev znaša $\pm 0,2\%$.

3.4.3 Določanje organskega ogljika in totalnega dušika

Vsebnost organskega ogljika in totalnega dušika v liofiliziranih in nakisanih (z 1 M HCl) vzorcih smo določali z elementnim analizatorjem C, H, N, O, S Carlo Erba mod. EA 1108 pri sežigni temperaturi 1020 °C (Hedges in Stern, 1984). Napaka meritev je $\pm 3\%$.

3.4.4 Določanje klorofila a

Koncentracijo klorofila a smo določili v ekstraktih z 90% acetonom fluorimetrično pri $\lambda_{\text{vzb.}} = 485 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{em.}} = 685 \text{ nm}$ (Holm-Hansen in sod., 1965). Napaka meritev je $\pm 5\%$.

3.4.5 Določanje proteinov in ogljikovih hidratov v suspendirani snovi

Vsebnost proteinov smo določali v ekstraktih z destilirano vodo kolorimetrično z metodo Coomassie Brilliant Blue (Setchell, 1981) z uporabo Piercovega reagenta (ZDA) in kazeina (Sigma, ZDA) kot standarda. Vsebnost totalnih ogljikovih hidratov smo določali v hidrolizatih z 1 M H_2SO_4 (3,5 ure pri 100 °C; Pakulski in Benner, 1992) kolorimetrično z 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidrokloridom - MBTH (Burney in McSeiburth, 1977). Kot standard smo uporabili D-glukozo (Sigma, ZDA). Napaka meritev je $\pm 5\%$.

3.4.6 Določanje hranilnih soli

Hranilne soli NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} in SiO_4^{4-} smo določali kolorimetrično, celotni-N in -P v vodi pa kolorimetrično po oksidaciji s $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ s standardnimi postopki (Grasshoff in sod., 1983). Napaka meritev je $\pm 3\%$.

4 REZULTATI

4.1 $\delta^{13}\text{C}$ IN $\delta^{15}\text{N}$ V POM, DIC IN IZBRANIH VRSTAH FITOPLANKTONA

Vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ so bile na začetku obeh vzorčevalnih obdobjih podobne (Priloga A). Do razlik je prišlo v poletnih mesecih, ko so bile vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ v letu 2003 ($-21,8\%$) višje od povprečne vrednosti istega obdobja naslednjega leta ($-22,9\%$). Do novembra so se vrednosti v obeh vzorčevalnih obdobjih ponovno znižale in dosegle tipične pomladanske vrednosti.

V letu 2004 so potekale meritve DIC koncentracij in izmerili smo tudi $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$. Časovne variacije vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ so v obdobju junij-avgust nihale v razponu od -2% do $-6,1\%$ v začetku junija in se nato ustalile na približno 0% . V nasprotju z vrednostjo $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ je večina variacij vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ posledica variacij vrednosti ϵ v fiksaciji C in ne sprememb v izotopski sestavi anorganskega vira (DIC), saj je v morju DIC prisoten relativno v izobilju. K variacijam vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v razponu do 3% prispeva ravnotežni izotopski efekt, odvisen od temperature, med HCO_3^- in $\text{CO}_2(\text{aq})$. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{HCO}_3^-}$ so za okoli 9% višje od raztopljenega CO_2 . V primeru, ko je vrednost $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ približno $1,5\%$, je vrednost $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ med -7 in -10% (Altabet, 1996). Ob intenzivni fotosintezi fitoplanktona zaradi večje porabe CO_2 ostajajo v vodi nižje koncentracije DIC, ki pa je zaradi frakcionacije obogaten s ^{13}C in ima torej višjo vrednost $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$. V našem primeru lahko pri višjih vrednostih $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ sklepamo na nižjo koncentracijo DIC oziroma na porabo DIC med cvetenjem poleti 2004. Izrazit padec vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ v začetku junija pa lahko pomeni pomik od ravnotežja med HCO_3^- in CO_2 zaradi razgradnje organske snovi (Priloga B).

Vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ so bile v celotnem meritvenem obdobju leta 2004 nižje (povprečna $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ je $4,4\%$) kot leta 2003 ($6,5\%$), z izjemo izjemnega znižanja julija 2003, ki ga najbrž lahko pripišemo fiksaciji N_2 (Priloga C).

Izotopsko sestavo ogljika in dušika smo izmerili tudi v nekaterih vrstah fitoplanktona v Tržaškem zalivu. Rezultati so zbrani v Preglednici 1.

Preglednica 1: Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v nekaterih vrstah fitoplanktona iz Tržaškega zaliva.

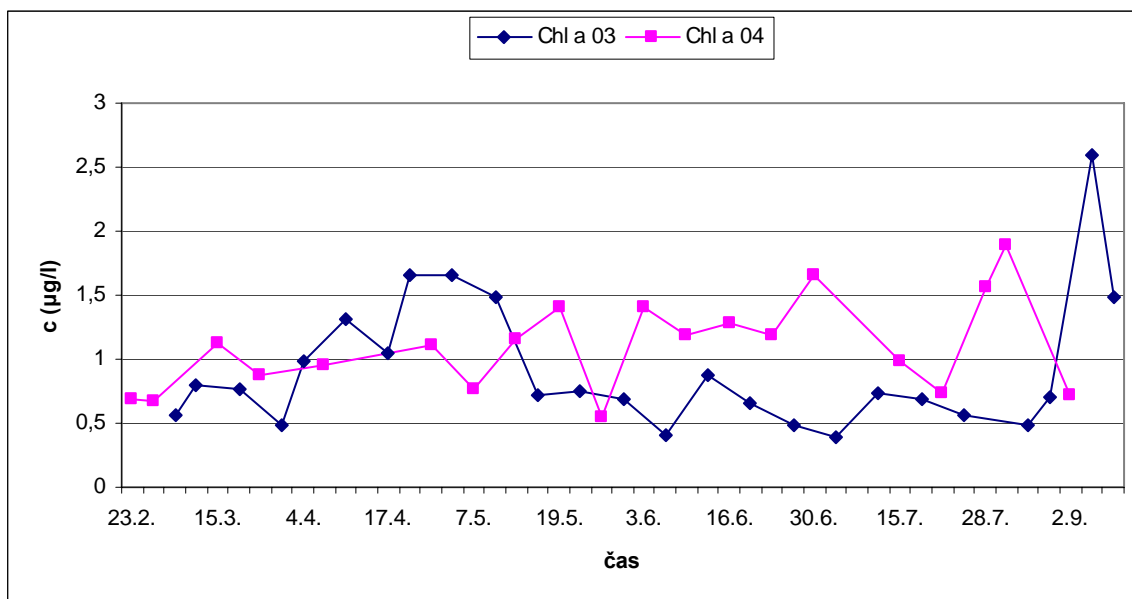
Oznaka	Vrsta fitoplanktona	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
SCR	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	-20.0	3.7
PMNK	<i>Prorocentrum minimum</i>	-18.1	3.8
THPN	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-25.4	1.2
SKE	<i>Skeletonema costatum</i>	-24.4	0.0
POM	suspendirana organska snov	-24.3	5.9

SCR je dinoflagelat, ki je na UNESCO-vi listi označen kot pogost povzročitelj škodljivega cvetenja na prehodu zime v pomlad v z nutrienti bogatimi vodami. PMNK je potencialno toksičen dinoflagelat, ki povzroča spomladansko cvetenje rdeče barve v priobalnih morjih širom po svetu. THPN in SKE sta morski diatomeji razširjeni po vseh svetovnih oceanih. Nobena od kultur se ne ujema z vrednostjo suspendirane organske snovi, zato ne moremo sklepati o prevladi določene fitoplanktonske vrste.

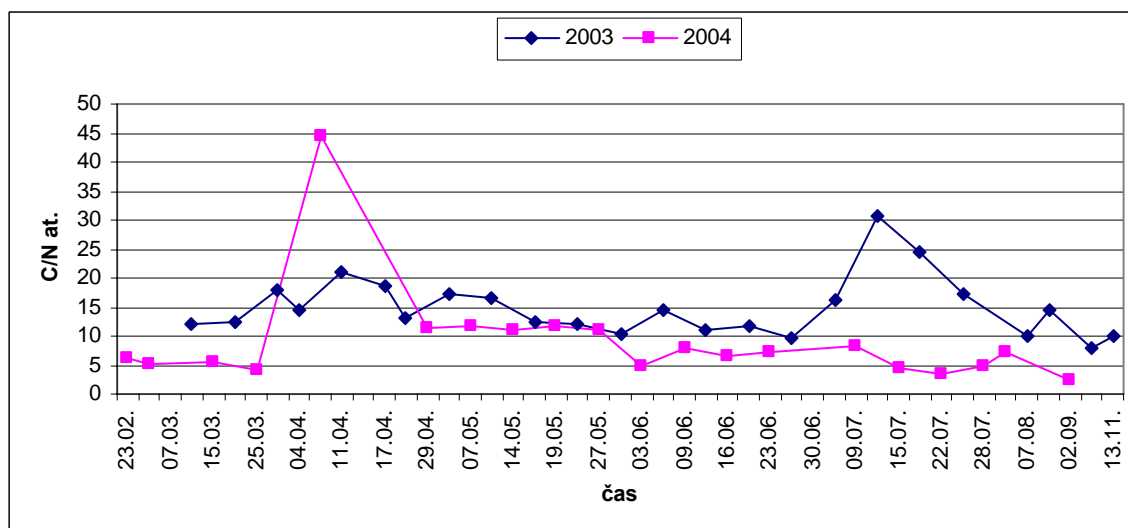
Samo na podlagi časovne odvisnosti $\delta^{13}\text{C}$ vrednost POM ne moremo ugotoviti določenega procesa (na primer cvetenja fitoplanktona), prav tako ne moremo ugotoviti bistvenih razlik med obema letoma raziskave. Določene trende pa lahko vidimo v povezavi z gibanjem koncentracij klorofila a, C_{org} , N_{tot} , vodotopnih proteinov, totalnih ogljikovih hidratov in vrednosti koncentracij anorganskih nutrientov (nitrati, fosfati).

4.2 DINAMIKA KONCENTRACIJE KLOROFILA A, RAZMERJA C_{org}/N V SUSPENDIRANI SNOVI, PROTEINOV IN OGLJIKOVIH HIDRATOV, RAZMERJA NO_3^-/PO_4^{3-} IN RAZMERJA N_{tot}/P_{tot}

V letu 2003 sta izrazita spomladanski (april,maj) in novembrski višek koncentracije klorofila a. Drugače pa je v letu 2004, kjer so najvišje koncentracije klorofila a izmerjene v juniju in avgustu (vmes v juliju koncentracije padejo).



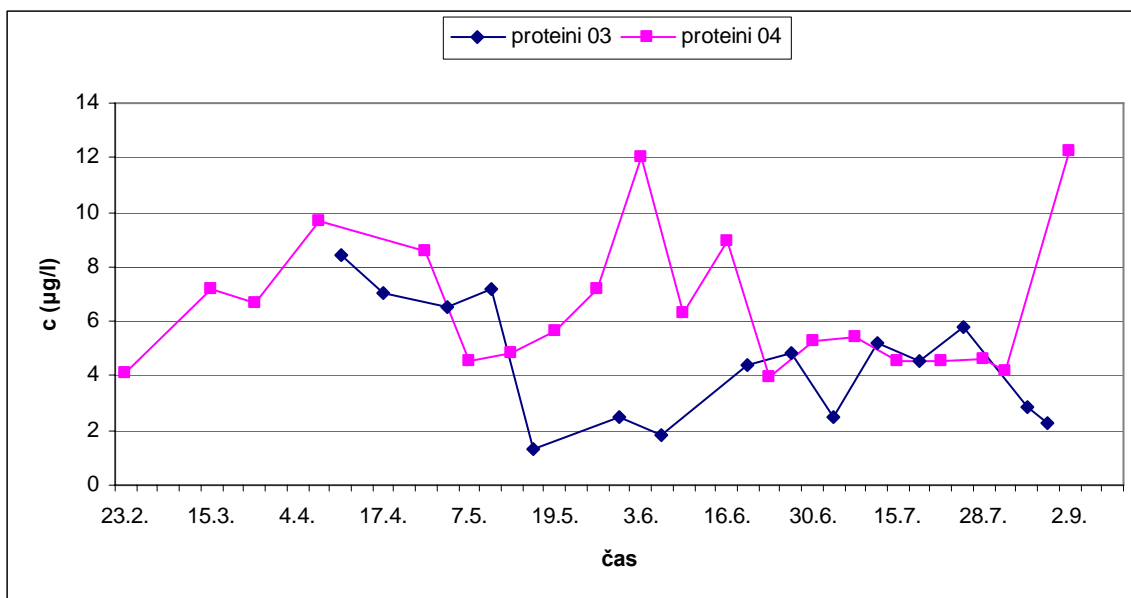
Slika 7: Graf časovne odvisnosti koncentracije c klorofila a (µg/l).



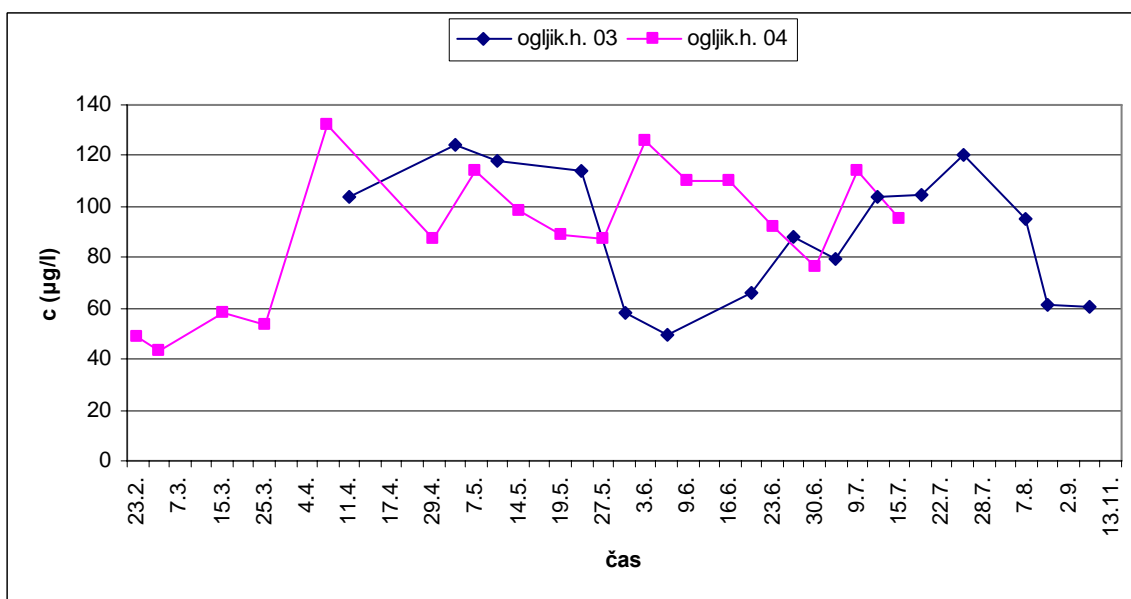
Slika 8: Graf časovne odvisnosti C/N_{at} vrednosti.

Višek razmerja C/N_{at} je bil v letu 2003 julija (30,8), v letu 2004 pa aprila (45).

Največje razlike v koncentracijah vodotopnih proteinov in totalnih ogljikovih hidratov med letoma 2003 in 2004 so bile v mesecu juniju. V tem obdobju leta 2004 so bile prisotne najvišje koncentracije (dva viška), v letu 2003 pa najnižje. Sicer so bile v letu 2003 povišane koncentracije tako proteinov kot ogljikovih hidratov v mesecih april-maj in julij-avgust.

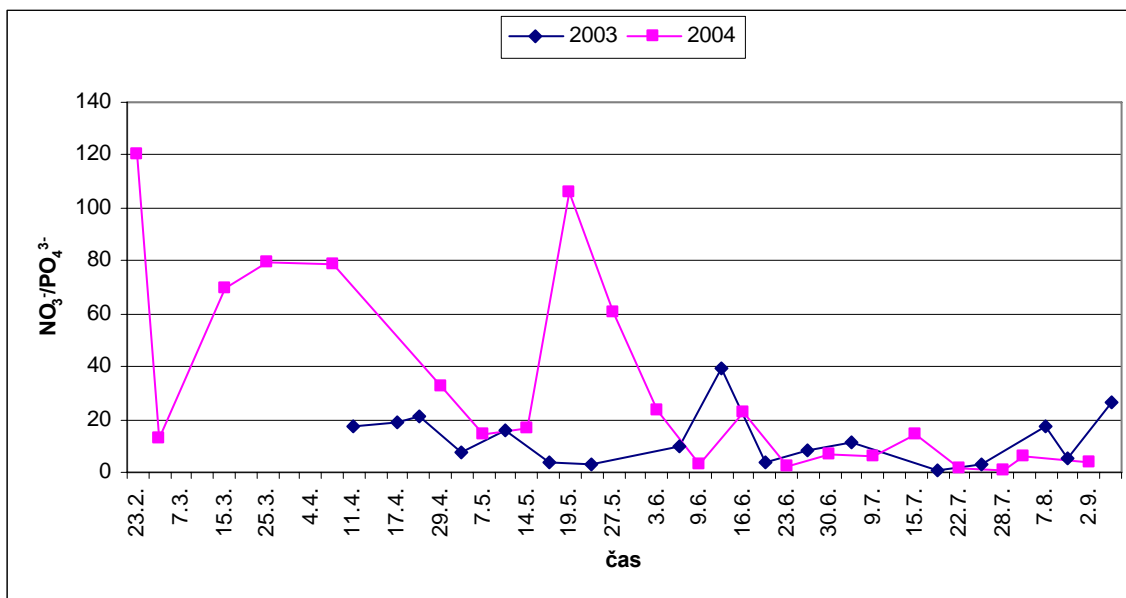


Slika 9: Graf časovne odvisnosti koncentracije c proteinov (µg/l).

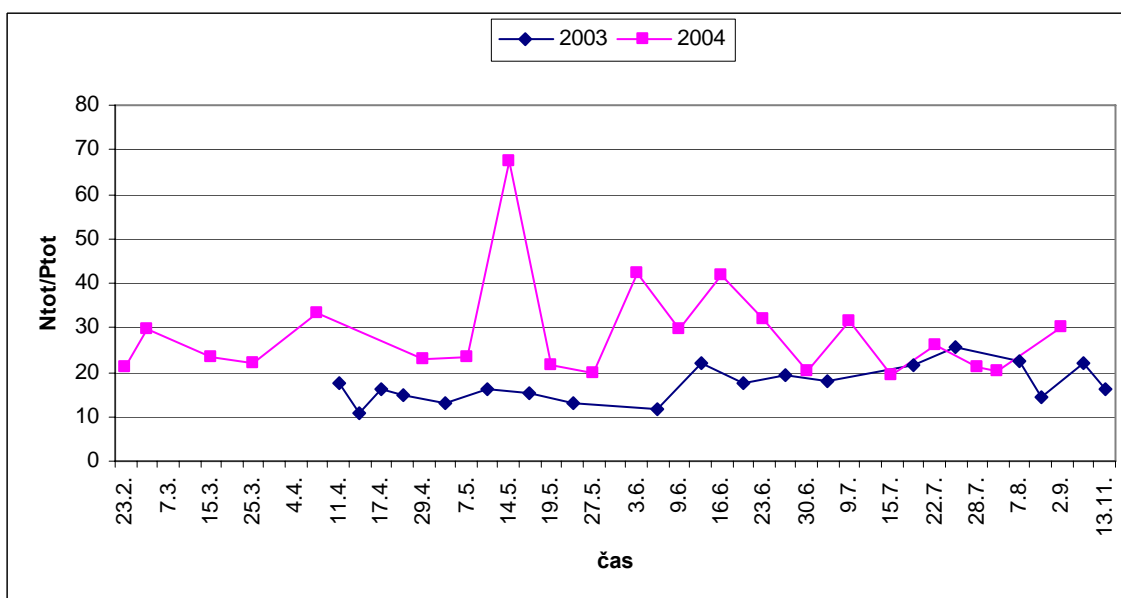


Slika 10: Graf časovne odvisnosti koncentracije c ogljikovih hidratov (µg/l).

Variacije razmerja $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ so bistvene za rast fitoplanktona. Iz dobljenih vrednosti je jasna razlika med obema obdobjema vzorčenja. Izrazita so spomladanska nihanja v 2004. V letu 2004 je bila izjemno visoko začetno razmerje koncem februarja (120,5), ponovna viška pa v drugi polovici marca (79,3) in nato maja (106,0). Od junija dalje so bile vrednosti pod 23.



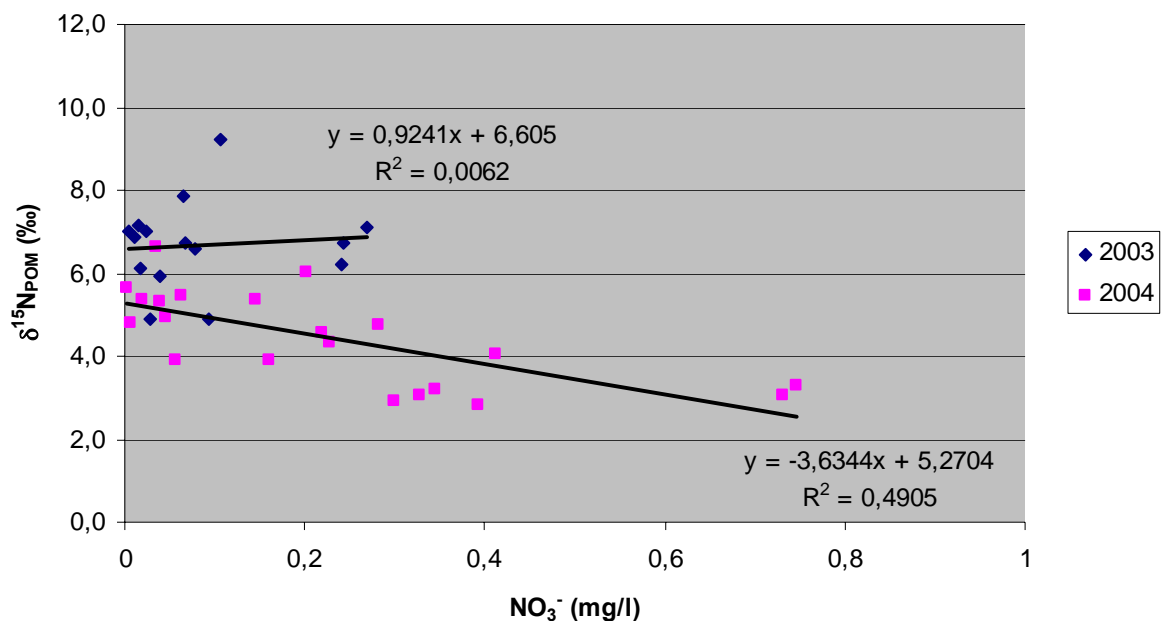
Slika 11: Graf časovne odvisnosti $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^-$ vrednosti ($\mu\text{mol/l}$).



Slika 12: Graf časovne odvisnosti $N_{\text{tot}}/P_{\text{tot}}$ vrednosti ($\mu\text{mol/l}$).

V letu 2003 je bilo povprečno molsko razmerje $N_{\text{tot}}/P_{\text{tot}}$ 17,3 z višjimi vrednostmi od sredine junija dalje. Povprečno razmerje v letu 2004 pa je bilo 28,7, z viškom v sredini maja (67,2) in relativno višjimi vrednostmi junija.

4.3 VPLIV KONCENTRACIJ NITRATA NA $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ VREDNOSTI



Slika 13: $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti suspendiranega totalnega dušika v odvisnosti od koncentracije NO_3^- . Na sliki sta narisani tudi linearni regresiji za vzorčevalni obdobji 2003 in 2004.

Iz zgornjega grafa je razvidno, da v letu 2003 ni značilne odvisnosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ od koncentracije nitrata. Negativna korelacija v letu 2004 pa morda kaže asimilacijo nitrata. Kadar so koncentracije nitrata visoke, fitoplankton asimilira nitrat in vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ padejo.

Da bi raziskali povezavo med $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ vrednostmi in koncentracijami NO_3^- smo uporabili tudi Rayleighjevo frakcionacijo. Kot smo omenili že v uvodu, z modelom Rayleighjeve destilacije lahko opišemo spremembo izotopske sestave substrata in nastalega produkta pri asimilaciji dušika:

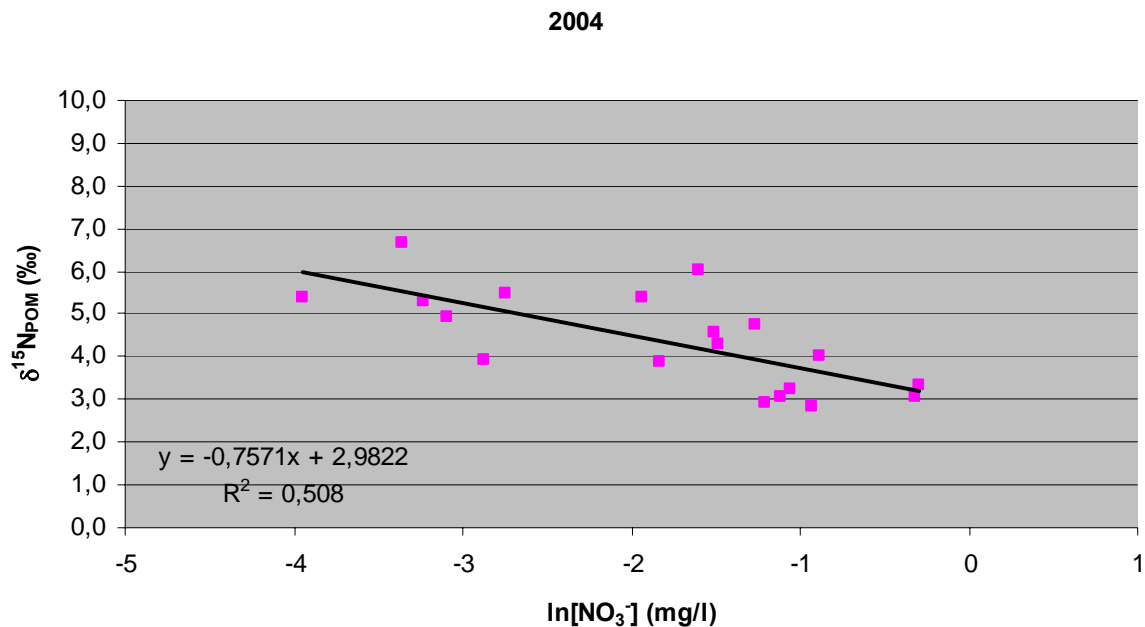
$$\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3-(f)} = \delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3-(f=1)} - \varepsilon \cdot \ln(f) \quad \dots(6)$$

in za nastali organski produkt uporabimo enačbo:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3-} - \varepsilon \quad \dots(7)$$

kjer je f ostanek frakcije NO_3^- , ε je biološki frakcionacijski faktor porabe NO_3^- za fitoplanktonizražen v ‰. Enačbi, ki jih združimo, zahtevata linearno povezavo med vrednostmi $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ in $\ln[\text{NO}_3^-]$, kjer naklon premice predstavlja frakcionacijski faktor

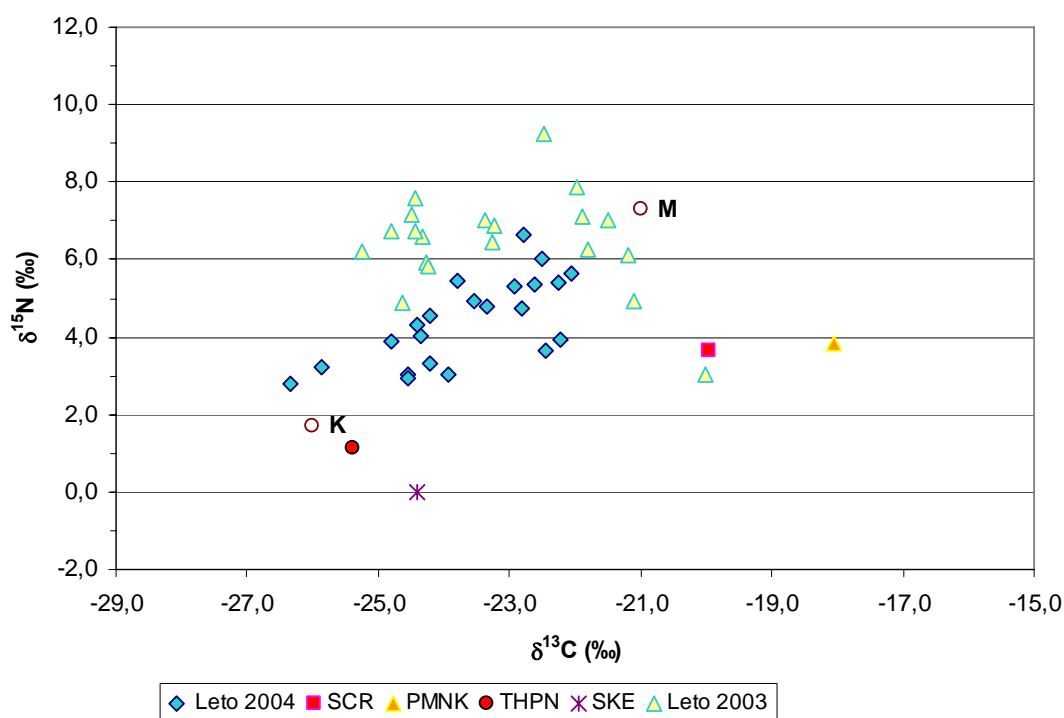
ε. Poudariti je potrebno, da Rayleighov model opisuje sistem, ko je količina reaktanta omejena. V našem primeru pa imamo stalen doprinos nitrata, kar pomeni, da je izračunan frakcionacijski faktor le približen.



Slika 14: Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ suspendiranega totalnega dušika v odvisnosti od $\ln[\text{NO}_3^-]$ v vzorčevalnem letu 2004.

Linearno odvisnost med vrednostmi $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ in $\ln[\text{NO}_3^-]$ podaja slika 14. Izračunana vrednost $\epsilon = 0,8\text{‰}$ je nizka v primerjavi s podatki iz literature. Inkubacijski eksperimenti različnih kultur kažejo na velik razpon v vrednostih ϵ med filogenetskimi skupinami (med 1 in 9‰; Montoya, 1990) in pogoji rasti (med 0 in 16‰; Wada in Hattori, 1978). Vrednosti ϵ na odprtih in obalnih morjih so bile ocenjene na podlagi sezonskih vzorčevanj med 4 in 9‰ (Altabet in Francois, 1993; Savoye in sod., 2003), nekoliko nižje vrednosti $\epsilon = 2,5\text{‰}$ so dobili v ekvatorialnem Pacifiku (Altabet in Francois, 1994) in v sladkovodnem okolju ($\epsilon = 3,0\text{‰}$; Teranes in Bernasconi, 2005). Nizka vrednost ϵ je možna posledica drugih fitoplanktonskih vrst, drugačnih pogojev rasti ali pa posledica drugih procesov.

4.4 IZVOR ORGANSKE SNOVI



Slika 15: Odvisnost vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ od $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ skupaj z izotopsko sestavo planktonskih kultur in vrednostmi za kopensko ter morsko organsko snovjo.

Iz grafa, kjer nanašamo vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v odvisnosti od $\delta^{13}\text{C}$ v suspendirani snovi (Slika 15), lahko določimo različne izvore organske snovi. Iz slike je razvidno, da vsi rezultati padejo v območje med kopenskim in morskim (fitoplanktonskim) izvorom organske snovi. Na sliki so prikazane tudi vrednosti izotopske sestave posameznih fitoplanktonskih kultur izoliranih iz Tržaškega zaliva. Nadalje opazimo, da je bila v letu 2003 v poletnem mesecu nizka izotopska sestava dušika ($\delta^{15}\text{N} = 3.0\text{‰}$) in višja izotopska sestava ogljika ($\delta^{13}\text{C} = -20.0\text{‰}$) verjetno povezana s prisotnostjo dinoflagelatov SCR *Scrippsiella trochoidea*.

Prispevek kopenskega oziroma morskega (fitoplanktonskega) organskega materiala lahko izračunamo z izotopsko masno bilanco ogljika. Izotopska masna bilanca dušika za to ni najbolj primerna, ker je dušik bolj izpostavljen različnim biogeokemijskim procesom in se zato tudi njegova izotopska sestava bolj spreminja. Za izračun uporabimo naslednji enačbi:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{mor}} \times X + \delta^{13}\text{C}_{\text{kop}} \times Y, \quad \dots(8)$$

$$1 = X + Y$$

Za skrajni vrednosti kopenskega in fitoplanktonskega organskega materiala sem uporabila naslednji vrednosti (Ogrinc in sod., 2005); $\delta^{13}\text{C}_{\text{kop}} = -26\text{‰}$ in $\delta^{13}\text{C}_{\text{mor}} = -21\text{‰}$, X predstavlja delež morske organske snovi, Y pa delež kopenske organske snovi. Rezultati izračuna so zbrani v Preglednici 2 in 3.

Preglednica 2: Prispevek kopenske organske snovi (Y) k suspendirani organski snovi v vzorčevalnem letu 2003.

Čas	13.3	21.3.	27.3.	4.4.	11.4.	17.4.	25.4.	30.4.	8.5.	15.5.	29.5.	5.6.
Y ₂₀₀₃ (delež)	0,73	0,64	0,69	0,66	0,85	0,72	0,76	0,65	0,67	0,70	0,65	0,48

Čas	12.6.	27.6.	4.7.	10.7.	18.7.	25.7.	7.8.	29.8.	4.11.	5.11.	13.11
Y	0,18	0,44	0,02	0,00	0,10	0,04	0,16	0,20	0,45	0,69	0,30

V letu 2003 je večji delež kopenskega materiala prisoten spomladi, čeprav je manjši od doprinosa v naslednjem letu.

Preglednica 3: Prispevek kopenske organske snovi (Y) k suspendirani organski snovi v vzorčevalnem letu 2004.

Čas	23.2.	5.3.	15.3.	25.3.	8.4.	29.4.	7.5.	14.5.	19.5.	27.5.	3.6.	9.6.
Y ₂₀₀₄ (delež)	0,29	0,67	0,97	1,00	0,59	0,76	0,68	0,64	0,71	0,71	0,30	0,36

Čas	16.6.	23.6.	30.6.	9.7.	15.7.	22.7.	28.7.	4.8.	2.9.
Y	0,36	0,51	0,56	0,39	0,33	0,47	0,21	0,24	0,25

Iz rezultatov je razvidno, da je skozi celotno leto prisoten vnos kopenske organske snovi. Pred obdobjem pojava makroagregatov je vnos najvišji, najnižjega pa zasledimo v poletnem obdobju, čeprav so vidna obdobja vnosa kopenskega tudi v poletnem času.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 VPLIV CVETENJA FITOPLANKTONA NA $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ IN $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$

Kot je razvidno iz časovnih variacij merjenih parametrov v obeh obdobjih raziskave je biomasa fitoplanktona oz. primarna produkcija najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na časovne variacije vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ in $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ v južnem delu Tržaškega zaliva.

Leta **2003** sta na podlagi meritev koncentracij klorofila a vidna dva viška; spomladanski (april, maj) in jesenski (september). V aprilu so prav tako visoke koncentracije vodotopnih proteinov in totalnih ogljikovih hidratov, viške dosežeta tudi C_{org} in N. Začetna koncentracija NO_3^- je bila visoka, ki se je nato do junija enakomerno zniževala. Prav tako se je začetna visoka koncentracija PO_4^{3-} nato znižala. Aprila je prišlo do znižanja vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ (4,9‰). Podobno je bil minimum $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ povezan s povišanimi koncentracijami PON in izrazitim znižanjem koncentracije nitrata v Zalivu Conception v Kanadi (Ostrom in sod., 1997). Avtorji domnevajo, da je vzrok frakcionacije N fitoplanktonska asimilacija nitrata. Pri tem naj bi fitoplankton, ki raste nad ali rahlo pod nitrikline, kjer nitrat ni omejujoči dejavnik, vezal lažji izotop N. Mariotti s sod. (1984) je v svojih raziskavah v obalnem morju Severnega morja proučeval sezonske variacije vsebnosti ^{15}N suspendirane organske snovi. Tako so bile vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ takoj po spomladanskem cvetenju fitoplanktona okoli +4‰, junija in julija na višku cvetenja pa od +10 do +12‰. Do visoke stopnje frakcionacije naj bi prihajalo vse dokler je na voljo dovolj anorganskega dušika, v pogojih pomanjkanja dušika (na vrhuncu cvetenja) pa je frakcionacija majhna in izotopska sestava fitoplanktona je posledično podobna izotopski sestavi substrata (amonija ali nitrata). Tako naj bi bile vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ med cvetenjem višje kot pred njim. Alternativna možnost je, da fitoplankton asimilira amonij, ko zmanjka nitrata. V kolikor je amonij bogatejši s ^{15}N kot nitrat, je to lahko razlaga za povišane vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ ob cvetenju (Owens, 1987).

Vrednost $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ po višjih vrednostih marca, je v začetku aprila padla in se sredi meseca ponovno dvignila in ostala približno konstantna do junija. Vzrok za tako dinamiko lahko poiščemo v dinamiki sezonskih sprememb vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ v hladnem obalnem morju (Ostrom in sod., 1997), kjer je značilen višek $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ jasno povezan z visoko koncentracijo klorofila a, PON in POC ter nižjo koncentracijo DIC v obdobju marec-april. Gre najbrž za porabo DIC v visoki primarni produkciji in je značilen dvig vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ najverjetneje

posledica znižane koncentracije raztopljenega CO₂. Altabet (1996) ugotavlja, da poviševanje $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ med cvetenjem fitoplanktona ni posledica izotopske obogatitve substrata, temveč je neposredno odvisno od koncentracije CO_{2(aq.)}. Drug faktor, ki tudi lahko vpliva na $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ vrednosti, je sprememba v vrstni mikrobnii sestavi med cvetenjem (prehod od diatomej k flagelatom (Altabet, 1996). Nakatsuka in sod. (1992) so s časovnim opazovanjem vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ in $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ opredelili tri faze v cvetenju fitoplanktona:

1. zgodnja faza cvetenja, ko je nitrata še vedno v izobilju in so vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ in $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ še visoke,
2. poznejša faza cvetenja, ko nitrat postane limiten in so vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ visoke a $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ nizke in
3. faza kvazi-stacionarnega stanja, nekaj dni po izčrpanju nitrata, ko je vrednost $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ nizka, a $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ visoka.

Podobno spreminjanje smo opazili tudi pri naših raziskavah v mesecu marcu in aprilu. Čeprav pa se vzorec poleti in jeseni ni ponovil. Julija so bile prisotne visoke vsebnosti C_{org}, a nizke N z izrazitim viškom molskega razmerja C/N (30,8). Prav tako so bile visoke koncentracije proteinov in ogljikovih hidratov. Po razmeroma visokih koncentracijah NO₃⁻ in PO₄³⁻ je nastopil maksimum vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ (-20‰), kar kaže na cvetenje fitoplanktona, in izrazit padec $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ (3‰). Fiksacija atmosferskega dušika ($\delta^{15}\text{N}=0‰$) lahko znatno prispeva k nižji vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v morju (Pantoja in sod., 2002). Nizke vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v fitoplanktonu v obalnem morju nakazujejo pomembnost fiksacije kot izvora dušika v primarni produkciji (Ostrom in sod., 1997). Alternativno pa so lahko nižje vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ tudi posledica razgradnih procesov. Recikliranje dušika prav tako zniža vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ površinskih delcev in sicer zaradi izotopske frakcionacije v heterotrofnih procesih. Zooplankton naj bi izločal NH₄⁺ z nižjo vrednostjo $\delta^{15}\text{N}$, kot jo ima njegov vir hrane, hkrati pa postaja vrednost $\delta^{15}\text{N}$ tkiva samega zooplanktona za pribl. 3‰ višja od njegove hrane. Amoniak z nižjo vrednostjo $\delta^{15}\text{N}$ uporabi fitoplankton in ga tako zadrži v površinskem rezervoarju dušika. Bogati $^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ se izvozi (potone), na površini pa ostaja POM z nižjo vrednostjo $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ (Pantoja in sod., 2002).

Septembra 2003 pa cvetenje nakazuje višek v koncentraciji klorofila a, višje koncentracije nitrata in fosfata. Sicer pa $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ pade, $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ so visoke, nizke so vrednosti C_{org} in N, prav tako so nizke koncentracije ogljikovih hidratov in proteinov.

Sicer so za razliko od 2003 v **2004** najvišje koncentracije klorofila a poleti junija in spet konec julija. V začetku junija se je koncentracija klorofila a povečala zaradi cvetenja fitoplanktona in vzporedno z njo sta nastopila viška koncentracije totalnih ogljikovih hidratov in vodotopnih proteinov vzporedno z nastankom makroagregatov. V začetku meseca je bil izrazit padec koncentracije NO_3^- , kar kaže na njegovo porabo v fitoplanktonski produkciji. V začetku meseca je bil prisoten višek vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ ($-22,5\%$) in nato tudi $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ ($6,7\%$), kar kaže na poznejšo oziroma že stacionarno fazo v cvetenju fitoplanktona (Nakatsuka in sod., 1992). Proti koncu meseca je bilo opaziti povišanje koncentracij NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , N_{tot} in P_{tot} ter razmerja $\text{N}_{\text{tot}}/\text{P}_{\text{tot}}$ zaradi remineralizacije nutrientov ter znižanje koncentracij SiO_4^{4-} zaradi porabe v asimilaciji diatomej. V začetku avgusta je bil prisoten ponovni maksimum koncentracije klorofila a ob znižani vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ na $3,9\%$.

5.2 VPLIV IZVORA ORGANSKE SNOVI NA $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ IN $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$

V morskih okoljih so variacije razmerja C/N posledica razgradnje in mineralizacije odmrlega planktona (Saino in sod., 1992; Boyd in sod., 1999) ter mešanja organske snovi iz različnih izvorov (Ogrinc in sod., 2005). Znana je bakterijska preferenčna mineralizacija N glede na C (Newton in sod., 1994). Prav tako imajo zooplanktonski fekalni peleti višje razmerje C/N kot pa zaužiti fitoplankton (Checkley in Entzenroth, 1985). V Tržaškem zalivu so Salvi in sod. (1998) in Ogrinc in sod. (2005) ugotovili, da mešanje organskih snovi različnih izvorov, morskih in kopenskih, vpliva na razmerje C/N predvsem v severnem delu zaliva, ki je pod vplivom večjih rečnih pritokov (Soče in Timave). Značilna morsko C/N razmerje naj bi bilo 8 in C/N razmerje kopenskega izvora 18 (Ogrinc in sod., 2005).

Iz izračunov izotopske masne bilance ogljika je razvidno, da je skozi celotno leto 2004 prisoten vnos kopenske organske snovi. Pred obdobjem pojava makroagregatov je vnos najvišji, najnižjega pa zasledimo v poletnem obdobju, čeprav so vidna obdobja vnosa kopenskega tudi v poletnem času. Višek C/N razmerja aprila 2004 je verjetno posledica vnosa kopenske organske snovi, medtem ko je julijski višek C/N v 2003 posledica razgradnih procesov.

Nižja izotopska sestava suspendiranega totalnega dušika je lahko posledica doprinosa alohtone (rečne in kopenske) organske snovi oz. dušika (Ogrinc in sod., 2005), kar nakazuje tudi pozitivna korelacija med $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ in $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ v letu 2004 (Slika 15). Drugi možnosti sta relativna poraba (pomanjkanje) nitrata (Altabet in Francois, 1994) ali pa tudi preferenčna asimilacija NH_4^+ v fitoplanktonu (Checkley in Entzeroth, 1985). Iz naših rezultatov je razvidno, da so bile v letu 2004 povišane koncentracije NH_4^+ glede na leto 2003. Naraščanje koncentracij NH_4^+ je povezano z razgradnjo organske snovi, kar pomeni, da je izotopska sestava NH_4^+ nižja v primerjavi z nitratom. Tako imajo organizmi, ki asimilirajo amonij, nižjo izotopsko sestavo. Iz naših rezultatov je razvidno, da povišane koncentracije NH_4^+ niso povezane s padanjem izotopske sestave suspendiranega totalnega dušika in nizke vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ verjetno niso posledica asimilacije NH_4^+ v fitoplanktonu. Za detajlnejšo interpretacijo bi morali izmeriti še izotopsko sestavo nitrata in amonija.

5.3 POJAV MAKROAGREGATOV

Obe obdobji raziskave sta se vidno (fenomenološko) ločili po pojavljanju makroagregatov v letu 2004. V vzorčevalnem obdobju v letu **2003 je bilo glede na leto 2004 bolj stabilno, z manj padavinami in brez prisotnosti sluzastih makroagregatov**. V letu 2004 smo izmerili v povprečju višje koncentracije hranilnih soli, ki so bile posledica predvsem večje količine padavin (ARSO) in s tem večjih rečnih pretokov glede na isto vzorčevalno obdobje predhodnega leta. Povprečne koncentracije klorofila a ($1,1 \pm 0,36 \mu\text{g/l}$) so bile tudi višje od tistih iz predhodnega leta ($0,2 \pm 0,38 \mu\text{g/l}$). Pri tem smo zabeležili v letu 2003 višje koncentracije pred mesecem junijem, v letu 2004 pa v juniju, to je v času intenzivnih agregacijskih procesov, in v kasnejšem vzorčevalnem obdobju. Junijske koncentracije suspendiranega organskega ogljika so bile tudi višje v letu 2004 s prisotnostjo makroagregatov.

Raziskave kažejo, da fitoplanktonske celice sproščajo znatne količine organske snovi, med katerimi so ogljikovi hidrati kvantitativno pomembni (Verdugo in sod., 2004). Ekstracelularne ogljikove hidrate sproščajo živi organizmi v okolje v vseh fazah rasti (Myklestad in sod., 1989), zasledimo pa razlike med posameznimi vrstami. Rezultati študija fitoplanktonskih kultur kažejo tendenco porasta vsebnosti ogljikovih hidratov (v suspendiranem in raztopljenem ogljiku) skozi rastni cikel in staranje kultur (Ittekkot in sod.,

1981; Ittekkot, 1982). Velike količine raztopljenih polisaharidov se sproščajo tudi v času fitoplanktonskega cvetenja, njihova sestava pa se medtem tudi spreminja (Ittekkott in sod., 1981).

Rast in metabolizem fitoplanktona sta pravzaprav funkciji razmerja **N/P**. Nizke koncentracije fosfata in visoka razmerja N/P, označena kot **stresni faktor** za fitoplanktonsko rast in bakterijsko sposobnost razgradnje raztopljene organske snovi, so na splošno značilna za severni Jadran (Cozzi in sod., 2004). Laboratorijske raziskave kažejo, da taka neravnovesja koncentracij hranil ("stresno" okolje) vodijo do povečanega izločanja ekstracelularnih izločkov (Myklestad in Haug, 1972). Nekateri avtorji (Cozzi in sod., 2004) menijo, da so za tak "stresni" fitoplanktonski odgovor bolj pomembne spremembe koncentracij limitirajočega hranila in razmerij kot pa njihovo stalno pomanjkanje. Naši rezultati kažejo **večjo variabilnost razmerja $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ v vzorčevalnem obdobju leta 2004**, tj. v letu s prisotnostjo sluzastih makroagregatov. Največje spremembe merjenih parametrov smo zasledili po 19. maju, ko smo izmerili zelo visoko razmerje med raztopljenim nitratom in fosfatom ($\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$). Temu je sledil padec koncentracije klorofila a ("odziv na stres") ter nadaljnji porast koncentracij suspendiranega organskega ogljika, suspendiranega celotnega dušika, suspendiranih ogljikovih hidratov ter suspendiranih proteinov. **Obdobje intenzivnih agregacijskih procesov (junij 2004)** je tako sovpadalo s prisotnostjo visokih koncentracij suspendiranih ogljikovih hidratov ($109,7 \pm 13,7 \mu\text{g/l}$), suspendiranega C_{org} ($24,0 \pm 3,5\%$) in suspendiranega celotnega dušika ($3,8 \pm 1,4\%$), ki so bile precej višje od tistih izmerjenih v juniju 2003 ($68,0 \pm 19,2 \mu\text{g/l}$; $12,6 \pm 7,2$; $1,3 \pm 1,0 \mu\text{g/l}$). Podoben trend kažejo tudi koncentracije suspendiranih proteinov.

5.4 SKLEPI

Analiza suspendirane snovi iz spomladanskega in poletnega obdobja v Tržaškem zalivu v letih brez in s prisotnostjo sluzastih makroagregatov kaže torej različno kemijsko sestavo. Leta je posledica različnih pogojev v okolju, ki bistveno prispevajo k biološki in nadalje h kemični sestavi suspendirane snovi.

Rezultati potrjujejo hipotezo, da neravnovesje hranil in posledično variabilnost njihovih razmerij $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ predstavljajo »stresna okolja« za fitoplankton. Posledično verjetno prihaja do povečanja izločanja fitoplanktonskih ekstracelularnih izločkov, ki vodijo do

visokih koncentracij raztopljene organske snovi ter nadalje do oblikovanja koloidne organske snovi in tvorbe makroagregatov. V času intenzivnih agregacijskih procesov, tj. v juniju 2004, smo izmerili najvišje koncentracije ogljikovih hidratov, suspendiranega organskega ogljika in dušika.

Doprinos organske snovi iz kopnega je bil bolj izrazit v letu 2004 kot v letu 2003. Največji doprinos kopenskega organske snovi je zaslediti v zimskem in zgodnje spomladanskem času, kjer predstavlja približno 70%, v poletnem času pa prevladuje morski plankton.

Glede vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v POM sklepamo, da je njihova dinamika odvisna od primarne produkcije. V letu 2003 so bile najvišje vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ izmerjene julija in avgusta. To je lahko vezano na koncentracije $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ ali spremembo v vrstni mikrobnih sestavi med cvetenjem (prehod od diatomej k flagelatom) (Altabet, 1996). $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ je bila izrazito najnižja julija, kar bi lahko pomenilo fiksacijo dušika. Nižje vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ leta 2004 v primerjavi s prejšnjim letom lahko kažejo na večji doprinos kopenskega organskega materiala. Na izotopsko sestavo N_{POM} v letu 2004 prav tako verjetno vpliva doprinos kopenske organske snovi, glede vira anorganskega dušika pa ne moremo podati nobenih zaključkov, saj bi za ugotovitev preferenčne uporabe nitrata oziroma amonija v asimilaciji fitoplanktona potrebovali še izotopske vrednosti teh anorganskih virov dušika.

6 POVZETEK

Obalna morja so pomembna področja za razumevanje biogeokemijskih kroženj, saj zajemajo približno 20% površine vseh oceanov. Poleg visoke primarne produkcije so ta področja podvržena dodatnim antropogenim vplivom. Zaradi človekovih dejavnosti prihaja do dodatnega vnosa hranil, ki skupaj z rečnim vnosom nutrientov, vplivajo na primarno produkcijo in naraščajočo evtrofikacijo. Neposredni odraz teh sprememb je periodično pojavljanje cvetenj fitoplanktona, katerega posledica je v severnem Jadranu tudi občasno pojavljanje makroagregatov. V Tržaškem zalivu se fitoplankton na povečane zunanje vnose hranilnih snovi odzove s povečano biomaso, abundanco in primarno produkcijo. Razumevanje mikrobnih in biogeokemijskih procesov, ki uravnavajo fitoplanktonsko biomaso in produkcijo, bi razjasnilo vzroke njihovih sprememb in posredno nastanka makroagregatov.

Stabilni izotopi ogljika (C) in dušika (N) so danes uspešni pokazatelji mikrobnih in biogeokemijskih procesov v morju. Za razumevanje teh procesov je potrebno poznati izotopsko sestavo izvorne snovi in spremembe, ki nastopajo v mikrobnem procesu. Študij teh procesov je večkrat težaven zaradi številnih reakcij in procesov, ki potekajo v naravnem okolju. Tako so lahko variacije izotopske sestave ^{13}C v fitoplanktonu posledica vrstne sestave, temperature in karbonatnega ravnotežja v morju. Variacije ^{15}N so običajno večje in omogočajo natančno opredelitev prevladujočega mikrobnega procesa v kroženju N, ki v morju obsega asimilacijo, nitrifikacijo, denitrifikacijo, mineralizacijo in fiksacijo atmosferskega N_2 . Uporaba stabilnih izotopov C in N tako omogoča tudi proučevanje procesov primarne produkcije in asimilacije pred in med cvetenjem fitoplanktona in posredno tudi nastanka makroagregatov.

Glavni namen pričujočega dela je bil preučiti mikrobne in biogeokemijske procese, ki uravnavajo izotopsko sestavo C in N v fitoplanktonu v Tržaškem zalivu. V ta namen smo v vzorcih suspendirane organske snovi (POM) iz Tržaškega zaliva, ki vključuje tudi fitoplanktonsko organsko snov, analizirali vsebnost ^{13}C in ^{15}N . Vzorci suspendirane organske snovi so bili odvzeti s približno tedensko frekvenco na površini na fiksni postaji v južnem delu Tržaškega zaliva (pri Piranu) v obdobju marec-september 2003 (obdobje brez makroagregatov) in marec-september 2004 (obdobje s prisotnostjo makroagregatov).

Vzporedne analize so obsegale vsebnost organskega C in totalnega N, ogljikovih hidratov in vodotopnih proteinov v suspendirani snovi, hranilni potencial (N, P, Si), karbonatni sistem z izotopsko sestavo ^{13}C ter fitoplanktonsko biomaso. Vzporedno smo analizirali aksenične kulture nekaterih tipičnih fitoplanktonskih vrst izoliranih iz Tržaškega zaliva.

Analiza suspendirane snovi iz spomladanskega in poletnega obdobja v Tržaškem zalivu v letih brez in s prisotnostjo sluzastih makroagregatov kaže različno kemijsko sestavo, ki so posledica različnih pogojev v okolju. Rezultati raziskav potrjujejo hipotezo, da neravnovesje hranil in posledično variabilnost njihovih razmerij $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ predstavljajo »stresna okolja« za fitoplankton. Pri tem prihaja do povečanja koncentracij raztopljene organske snovi, ki je posledica povišanega izločanja ekstracelularnih izločkov in lize fitoplanktona in posledično do tvorbe makroagregatov. Kakšni procesi in v kolikšni meri vplivajo na dinamiko vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ in $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ nam ni uspelo ugotoviti. Vpliv organske snovi iz kopnega v letu 2003 ni tako izražen, kar je verjetno posledica meteoroloških razmer. Večji del suspendirane organske snovi (POM) v poletnem obdobju pripisujemo nastanku fitoplanktona. Nizka izotopska sestava dušika ($\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}} = 3.0\text{‰}$) in višja izotopska sestava ogljika ($\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}} = 20.0\text{‰}$) nakazuje na prisotnost fiksacije N_2 iz ozračja. Vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ v letu 2004 kažejo, na porabo nitrata, ki ga fitoplankton asimilira. Poleg tega na izotopsko sestavo vpliva še doprinos kopenske organske snovi, ki je najbolj izrazita zgodaj spomladi in v jesenskem času pade. Ugotovili smo, da je vrednost frakcionacijskega faktorja $\epsilon = 0,8$, ki vpliva na izotopsko sestavo N v fitoplanktonu, nižja kot drugod. To pripisujemo različnim vrstam in pogojem rasti fitoplanktona. Za podrobnejšo interpretacijo rezultatov bi potrebovali tudi meritve izotopske sestave nitrata in amonija. Kljub temu, da so te meritve v nekaterih študijah vključene, pa še vedno niso popolnoma razjasnjeni procesi, ki vplivajo na izotopsko sestavo C in predvsem N v suspendirani organski snovi in s tem v fitoplanktonu v morju.

7 VIRI

Altabet M.A. 1996. Nitrogen and carbon 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.). London, John Wiley & Sons Ltd.: 155-184

Altabet M.A., Francois R. 1993. The use of nitrogen isotopic ratio for reconstruction of past changes in surface ocean nutrient utilization. V: Carbon cycling in the glacial ocean: constraints on the ocean's role in global change; quantitative approaches in paleoceanography. Zahn R., Kaminski M., Labeyrie L., Pederson T.F. (eds.). Berlin, Germany, Springer-Verlag: 281-306

Altabet M.A., Francois R. 1994. Sedimentary nitrogen isotopic ratio as a recorder for surface ocean nitrate utilization. *Global Biogeochemical Cycles*, 8: 103-116

Atlas R.M., Bartha R. 1998. Microbial ecology: fundamentals and applications. Menlo Park, California, Benjamin/Cummings Science Publishing: 694 str.

Boyd P.W., Sherry N.D., Bergens J.A., Bishop J.K.B., Calvert S.E., Charette M.A., Giovannoni S.J., Goldblatt R., Harrison P.J., Moran S.B., Roy S., Soon M., Strom S., Thibault D., Vergin K.L., Whitney F.A., Wong C.S. 1999. Transformation of biogenic particles from pelagic to the deep ocean realm. *Deep-Sea Research Part II - Topical Studies in Oceanography*, 46: 2761-2792

Burney C.M., McSeiburth J.N. 1977. Dissolved carbohydrates in seawater. II. A spectrophotometric procedure for total carbohydrate analysis and polysaccharide determination. *Marine Chemistry*, 5: 15-28

Butcher S.S., Charlson R.J., Orians G.H., Wolfe G.V. 1992. Global biogeochemical cycles. London, Academic Press: 379 str.

Cantoni C., Cozzi S., Pecchiar I., Cabrini M., Mozetič P., Catalano G., Fonda Umani S. 2003. Short-term variability of primary production and inorganic nitrogen uptake related

to the environmental conditions in a shallow coastal area (Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea). *Oceanologica Acta*, 26: 565-575

Capasso G., Favara R., Grassa F., Inguaggiato S., Longo M. 2003. Automated techniques for preparation and measuring stable carbon isotope of total dissolved inorganic carbon in water samples ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$). V: 7th International Conference on Gas Geochemistry, Freiberg, Germany, 22-26 Sept. 2003. Programme & Abstract Book. Katlenburg, Lindau, Copernicus GmbH: 38-38

Checkley D.M., Entzenroth L.C. 1985. Elemental and isotopic fractionation of carbon and nitrogen by marine, phytoplankton copepods and implications to the marine nitrogen cycle. *Journal of Plankton Research*, 7: 553-568

Coplen T.B. 1996. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon and oxygen isotope-ratio data. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60: 3359-3360

Cozzi S., Ivančić I., Catalano G., Djakovac T., Degobbi D. 2004. Dynamics of the oceanographic properties during mucilage appearance in the Northern Adriatic Sea: analysis of the 1997 event in comparison to other events. *Journal of Marine Systems*, 50: 223-241

Craig H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analyses of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12: 133-149

Degobbi D., Fonda Umani S., Franco P., Malej A., Precali R., Smolaka N. 1995. Changes in the northern Adriatic ecosystem and the hypertrophic appearance of gelatinous aggregates. *Science of the Total Environment*, 165: 43-58

Engel M.H., Macko S.A. 1993. *Organic geochemistry: principles and applications*. New York, London, Plenum Press: 861 str.

Faganeli J. 1999. Osnove geomikrobiologije in mikrobnе biogeokemije. Študijsko gradivo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 55 str.

Faganeli J., Avčin A., Fanuko N., Malej A., Turk V., Tušnik P., Vrišer B., Vukovič A. 1985. Bottom layer anoxia in the central part of the Gulf of Trieste in the late summer of 1983. *Marine Pollution Bulletin*, 16: 75-78

Faganeli J., Pezdič J., Fanuko N. 1989. Chemical and isotopic composition of some phytoplankton species. *Biološki vestnik*, 37, 4: 9-20

Faganeli J., Kovač N., Leskovšek H., Pezdič J. 1995. Sources and fluxes of particulate organic matter in shallow coastal waters characterized by summer macroaggregate formation. *Biogeochemistry*, 29: 71-88

Falkowski P.G. 2005. Biogeochemistry of primary production in the sea. V: *Biogeochemistry: Treatise on Geochemistry, Volume 8*. Schlesinger W.H., Holland H.D., Turekian K.K. (eds.). Oxford, UK, Elsevier, Pergamon Oxford: 185-213

Fanuko N. 1981. Prispevek k poznavanju fitoplanktona v Tržaškem zalivu. *Biološki vestnik*, 29: 67-82

Fonda Umani S., Ghirardelli E., Specchi M. 1989. Gli episodi di «mare sporco» nell'Adriatico da 1729 ai nostri giorni. Trieste, RAFVG: 178 str.

Fraga F. 2001. Phytoplanktonic biomass synthesis: application to deviations from Redfield stoichiometry. *Scientia Marina*, 65: 153-169

Fry B., Wainright S.C. 1991. Diatom sources of ¹³C-rich carbon in marine food webs. *Marine Ecology Progress Series*, 76: 149-157

Gilmartin M. 1991. Observations on particulate organic carbon and nitrogen concentrations in the northern Adriatic Sea. *Thalassia Jugoslavica*, 23: 39-49

Grasshoff K. 1983. Determination of nutrients. Methods of seawater analysis. Grasshoff P.N., Ehrhardt M., Kremling K. (eds.). Weinheim, Verlag Chemie: 125-187

Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1966. Studies on marine planktonic diatoms. Canadian Journal of Microbiology, 8: 229-239

Guo L., Tanaka T., Wang D., Tanaka N., Murata A. 2004. Distributions, speciation and stable isotope composition of organic matter in the southeastern Bering Sea. Marine Chemistry, 91: 211-226

Holm-Hansen O., Lorenzen C.J., Holmes R.W., Strickland J.D.H. 1965. Fluorimetric determination of chlorophyll. Journal de Conseil International de l'Exploration de la Mer, 30: 3-15

INTERREG. II, 2001. Northern Adriatic Monitoring Programme 1998-2001. Trieste, EU/RAFVG, CD-ROM: 202+264

Ittekkot V., Brockman U., Michaelis W., Degens E.T. 1981. Dissolved free and combined carbohydrates during a phytoplankton bloom in the northern North Sea. Marine Ecology Progress Series, 4: 299-305

Ittekkot V. 1982. Variations of dissolved organic matter during a plankton bloom: qualitative aspects based on sugar and amino acid analyses. Marine Chemistry, 11: 143-158

Laws E.A., Popp B.N., Bidigare R.R., Kennicutt M.C., Macko S.A. 1994. Dependence of phytoplankton carbon isotopic composition on growth rate and $[CO_2]_{aq}$: Theoretical considerations and experimental results. Geochimica et Cosmochimica Acta, 59, 6: 1131-1138

Macko S., Estep M.L.F., Hare P.E., Hoerning T.C. 1987. Isotopic fractionation of nitrogen and carbon in the synthesis of amino acids by microorganisms. Chemical Geology (Isotope Geosciences Section), 65: 79-92

Malačič V. 1991. Estimation of the vertical eddy diffusion coefficient of heat in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *Oceanologica Acta*, 14: 23-32

Malej A., Mozetič P., Malačič V., Terzić S., Ahel M. 1995. Phytoplankton responses to freshwater inputs in a small semi-enclosed gulf (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Marine Ecology Progress Series*, 120: 111-121

Malej A., Mozetič P., Malačič V., Turk V. 1997. Response of summer phytoplankton to episodic meteorological events (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Marine Ecology*, 18: 273-288

Mariotti A., Lancelot C., Billen G. 1984. Natural isotopic composition of nitrogen as a tracer of origin for suspended organic matter in the Scheldt estuary. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48: 549-555

Mingazzini M., Thake B. 1995. Summary and conclusions of the workshop on marine mucilages in the Adriatic sea and elsewhere. *Science of the Total Environment*, 165: 9-14

Montoya J.P. 1990. Natural abundance of ^{15}N in marine and estuarine plankton; Studies of biological isotopic fractionation and plankton processes. Ph.D. thesis. Cambridge, Harvard University: 214 str.

Mozetič P. 1993. Vloga posameznih velikostnih razredov fitoplanktona pri biomasi in produkciji južnega dela Tržaškega zaliva. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 94 str.

Mozetič P. 1997. Odziv neritičnega fitoplanktona na dodatke hranil v naravnih in kontroliranih pogojih. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 184 str.

Mozetič P., Turk V., Malej A. 1998. Nutrient-enrichment effect on plankton composition. *Annales, Series Historia Naturalis*, 8, 13: 31-42

Mozetič P., Fonda-Umani S., Cataletto B., Malej A. 1998. Seasonal and inter-annual plankton variability in the Gulf of Trieste (northern Adriatic). *ICES Journal of Marine Science*, 55: 711-722

Myklestad S., Haug A. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt, I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 9: 125-136

Myklestad S., Holm-Hansen O., Vårum K.M., Volcani B.E. 1989. Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. *Journal of Plankton Research*, 11: 763-773

Nakatsuka T., Handa N., Wada E., Wong C.S. 1992. The dynamic changes of stable isotopic ratios of carbon and nitrogen in suspended and sedimented particulate organic matter during a phytoplankton bloom. *Journal of Marine Research*, 50: 267-296

Ogrinc N., Faganeli J., Pezdic J. 2003. Determination of organic carbon remineralization in near-shore marine sediment (Gulf of Trieste, Northern Adriatic) using stable carbon isotopes. *Organic Geochemistry*, 34: 681-692

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

Oh, what a tangled web we weave! Dr. C'S remarkable ocean world. Fullerton, Fullerton College (marec 2001)

<http://www.oceansonline.com/oceanicfoodwebs.htm> (januar 2002): 12 str.

Olivotti R., Faganeli J., Malej A. 1986. Eutrophication of coastal waters – Gulf of Trieste. *Water Science and Technology*, 18: 303-316

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

Owens N.J.P. 1987. Natural Variations in ^{15}N in the marine environment. *Advances in Marine Biology*, 24: 389-451

Pakulski J.D., Benner R. 1992. An improved method for the hydrolysis and MBHM analysis of dissolved and particulate carbohydrates in seawater. *Marine Chemistry*, 40: 143-160

Pantoja S., Repeta J., Sachs J.P., Sigman D.M. 2002. Stable isotope constrains on the nitrogen cycle of the Mediterranean Sea water column. *Deep-Sea Research I – Oceanographic research papers*, 49: 1609-1621

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, 1: 69-77

Quay P.D., Emerson S.R., Quay B.M., Devol A.H. 1986. The carbon cycle for Lake Washington - A stable isotope study. *Limnology and Oceanography*, 31: 596-611

Rau G.H., Riebesell U., Wolf-Gladrow D. 1996. A model of photosynthetic ^{13}C fractionation by marine phytoplankton based on diffusive molecular CO_2 uptake. *Marine Ecology Progress Series*, 133: 275-285.

Rau G.H., Riebesell U., Wolf-Gladrow D. 1997. $\text{CO}_{2\text{aq}}$ -dependent photosynthetic ^{13}C fractionation in the ocean: A model versus measurements. *Global Biogeochemical Cycles*, 11, 2: 267-278

Sachs J.P., Repeta D.J., Goericke R. 1999. Nitrogen and carbon isotopic ratios of chlorophyll from marine phytoplankton. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63, 9: 1431-1441

Saino T. 1992. ^{15}N and ^{13}C natural abundance in suspended particulate organic matter from a Kuroshio warm-core ring. *Deep-Sea Research I – Oceanographic Research Papers*, 39: S347-S362

Salvi C., Melis R., Celio M., Faganeli J. 1998. Suspended matter in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea) during the occurrence of macroaggregates in 1991. *Bollettino di Geofisica Teorica ed Applicata*, 39: 219-241

Savoye N., Aminot A., Treguer P., Fontugne M., Naulet N., Kerouel R. 2003. Dynamics of particulate organic matter $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ during a spring phytoplankton blooms in a macrotidal ecosystem (Bay of Seine, France). *Marine Ecology Progress Series*, 255: 27-41

Setchell F.W. 1981. Particulate protein measurements in oceanographic samples by dye binding. *Marine Chemistry*, 10: 301-313

Stopar D., Mandić-Mulec I. 1999. Mikrobna ekologija voda (izbrana poglavja). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 61 str.

Sutka R.L., Ostrom N.E., Ostrom P.H., Phanikumar M.S. 2004. Stable nitrogen isotope dynamics of dissolved nitrate in a transect from the North Pacific Subtropical Gyre to the Eastern Tropical North Pacific. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68, 3: 517-527

Teranes J.L., Bernasconi S.M. 2005. 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: 801-813

Thompson P.A., Calvert S.E. 1995. Carbon isotope fractionation by *Emiliana huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 40, 4: 673-679

Turk V., Mozetič P., Malej A. 2001. Seasonal variability in phytoplankton and bacterioplankton distribution in the semi-enclosed temperate gulf (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Annales, Series Historia Naturalis*, 11: 53-64

Velinsky D.J., Fogel M.L. 1999. Cycling of dissolved and particulate nitrogen and carbon in the Framvaren Fjord, Norway: stable isotopic variations. *Marine Chemistry*, 67: 161-180

Verdugo P., Alldredge A.L., Azam F., Kirchman D.L., Passow U., Santschi P.H. 2004. The oceanic gel phase: a bridge in the DOM-POM continuum. *Marine Chemistry*, 92: 67-85

Wada E.M., Hattori A. 1978. Nitrogen isotope effects in the assimilation of inorganic nitrogenous compounds by marine diatoms. *Geomicrobiology Journal*, 1: 85-101

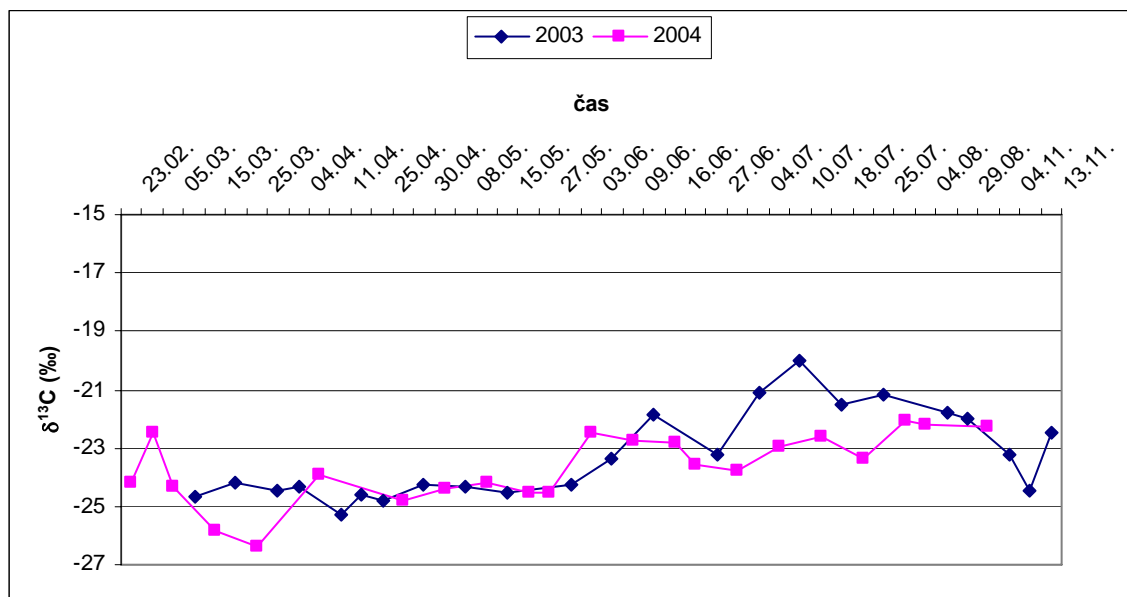
Welker C., Sdrigotti E., Covelli S., Faganeli J. 2002. Microphytobenthos in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic sea): relationship with labile sedimentary organic matter and nutrients. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55: 259-273

Wong W.W., Sackeltt W.M. 1978. Fractionation of stable carbon isotopes by marine phytoplankton. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 42: 1809-1815

PRILOGE

Priloga A

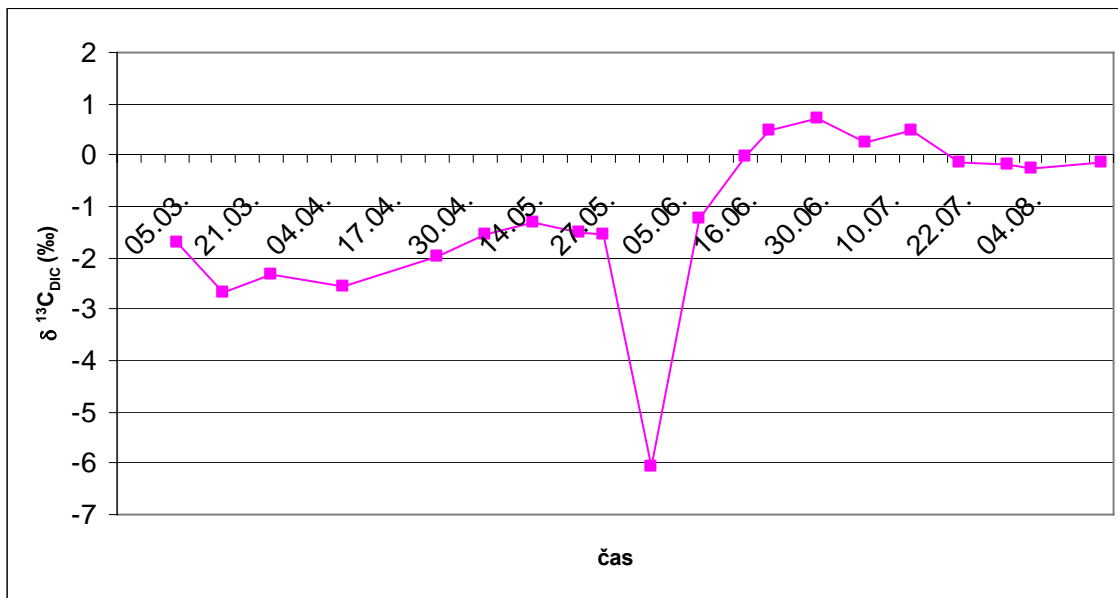
Graf časovne odvisnosti $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti POM



Priloga A: Marca 2003 so bile vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ okoli $-24,4\text{‰}$, v sredini aprila so nato padle na $-25,3\text{‰}$ in se nato do junija nekoliko zvišale na povprečno $\delta^{13}\text{C}$ vrednost $-24,5\text{‰}$. Junija so se vrednosti začele ponovno zviševati z manjšim viškom v sredini meseca ($\delta^{13}\text{C} = -21,9\text{‰}$). Julija so bile vrednosti najvišje, z izrazitim viškom sredi meseca ($-20,0\text{‰}$). Dalje so se vrednosti zniževale in so novembra dosegle tipične pomladanske vrednosti. Začetna vrednost $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ je bila koncem februarja visoka, nato se je v marcu znižala do $-26,4\text{‰}$. Aprila je narasla in do junija so bile vrednosti približno $-24,4\text{‰}$. V juniju, juliju in avgustu so bile vrednosti višje z dvema viškoma v začetku junija ($-22,5\text{‰}$) in ob koncu julija ($-22,1\text{‰}$). Sicer so bile poletne (junij, julij, avgust) vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$ s povprečno vrednostjo $-22,9\text{‰}$ nižje od povprečne vrednosti istega obdobja prejšnjega leta ($-21,8\text{‰}$).

Priloga B

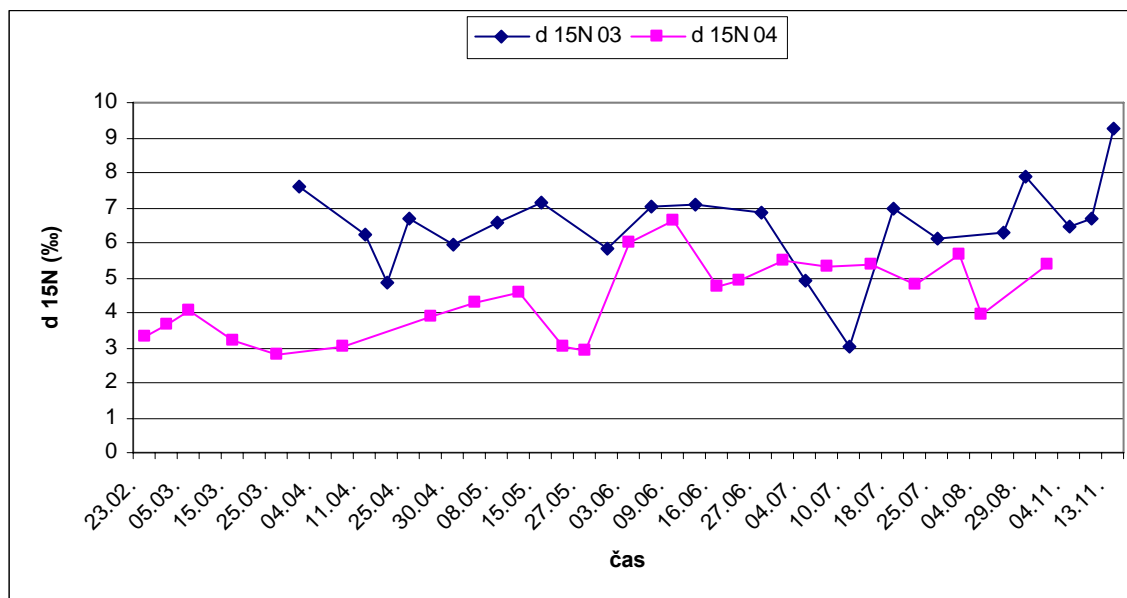
Graf časovne odvisnosti $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti DIC v letu 2004.



Priloga B: Vrednost $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ je bila v začetku marca $-1,7\text{‰}$ in je ob koncu meseca padla na $-2,7\text{‰}$. Nato se je do junija enakomerno povečevala. V začetku junija je sledil oster padec na minimum $-6,1\text{‰}$, ki časovno sovпада z visoko vrednostjo $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$. Ob koncu junija je bila vrednost že na višku $0,7\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ vrednosti se septembra spreminjajo okoli 0‰ .

Priloga C

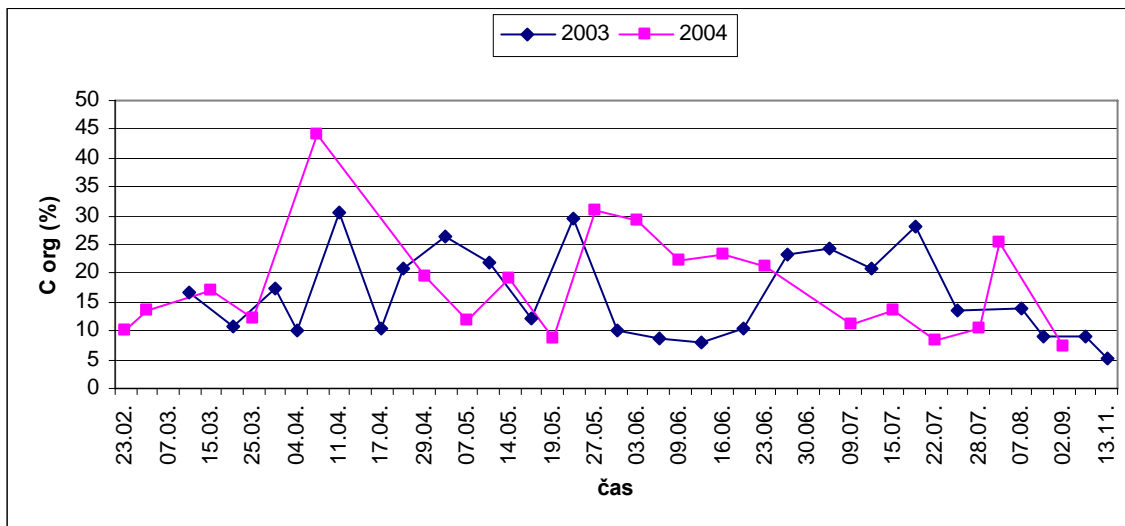
Graf časovne odvisnosti $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti POM.



Priloga C: Ob koncu marca smo ugotovili visoko vrednost $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ 7,6‰, ki je nato aprila padla na 4,9‰ in se ob koncu meseca dvignila na 6,7‰. V začetku maja je bila vrednost 5,9‰ in se do sredine meseca dvignila na 7,2‰ in ob koncu meseca ponovno padla na 5,8‰. Junija so bile vrednosti najvišje (okrog 7‰), julija pa je sledil izrazit minimum (3‰), ki je sovpadal z maksimumom $\delta^{13}\text{C}_{\text{POM}}$. Vrednost so že v drugi polovici meseca ponovno narasle na 7‰. Sledita dva viška, konec avgusta so bile vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ okrog 7,9‰, novembra pa 9,2‰. Manjša viška vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ sta bila prisotna v začetku marca (4,0‰) in v sredini maja (4,6‰), ob koncu maja pa smo zaznali padec vrednosti na 2,9‰. Junija je sledil velik porast vrednosti z maksimumom 6,7‰. V drugi polovici junija do konca julija je sledila ustalitev vrednosti na okoli 5,1‰. V začetku avgusta je bila vrednost 3,9‰ in se je ob koncu meseca zvišala na 5,4‰. Vrednosti $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ so bile v celotnem obdobju merjenja nižje (povprečna $\delta^{15}\text{N}_{\text{POM}}$ je 4,4‰) kot leta 2003 (s povprečno vrednostjo $\delta^{15}\text{N}$ 6,5‰), z izjemo izjemnega znižanja $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti julija 2003.

Priloga D

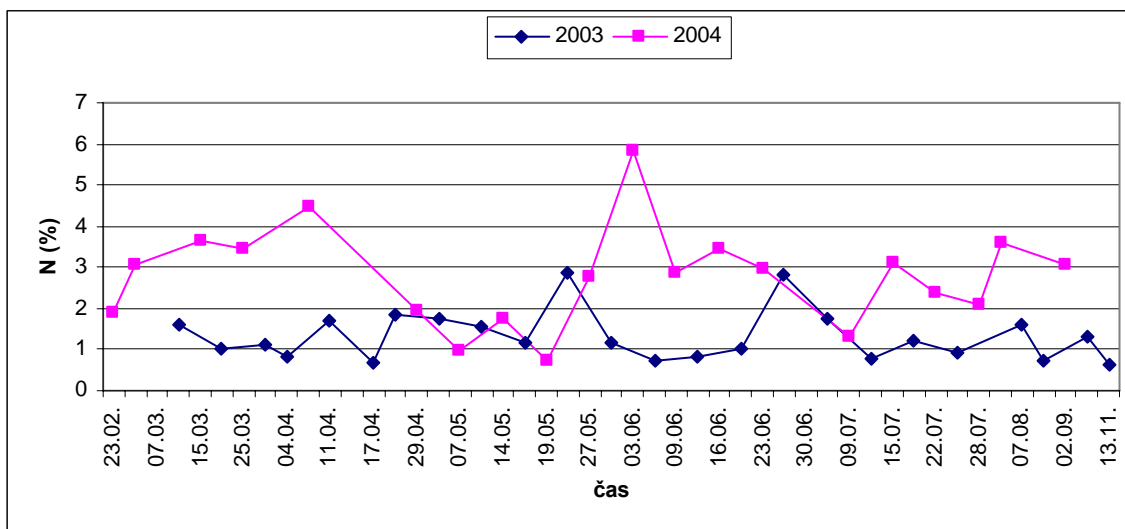
Graf časovne odvisnosti C_{org} (%) vrednosti POM.



Priloga D: V utežnih deležih organskega ogljika je razlika aprila, ko so vrednosti 2003 C_{org} ($19,7 \pm 9,2\%$) nižje od tistih v 2004 ($31,8 \pm 17,5\%$), in junija, ko so vrednosti 2003 C_{org} ($12,6 \pm 7,2\%$) prav tako nižje od tistih v 2004 ($24,0 \pm 3,5\%$). So pa nasprotno julija 2003 višje ($21,7 \pm 6,2\%$) od 2004 ($10,9 \pm 2,1\%$).

Priloga E

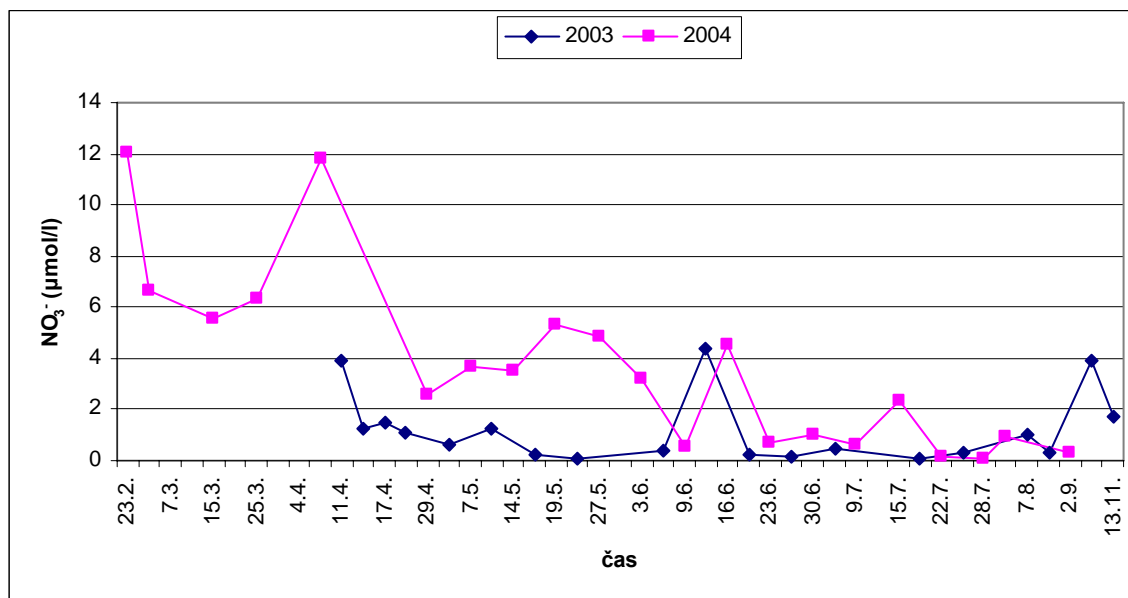
Graf časovne odvisnosti N (%) vrednosti POM.



Priloga E: N vrednosti so v 2003 nižje marca, aprila ($1,3 \pm 0,5\%$) in junija ($1,4 \pm 1,0\%$) od istega obdobja v 2004 ($3,3 \pm 0,9\%$, $3,8 \pm 1,4\%$).

Priloga F

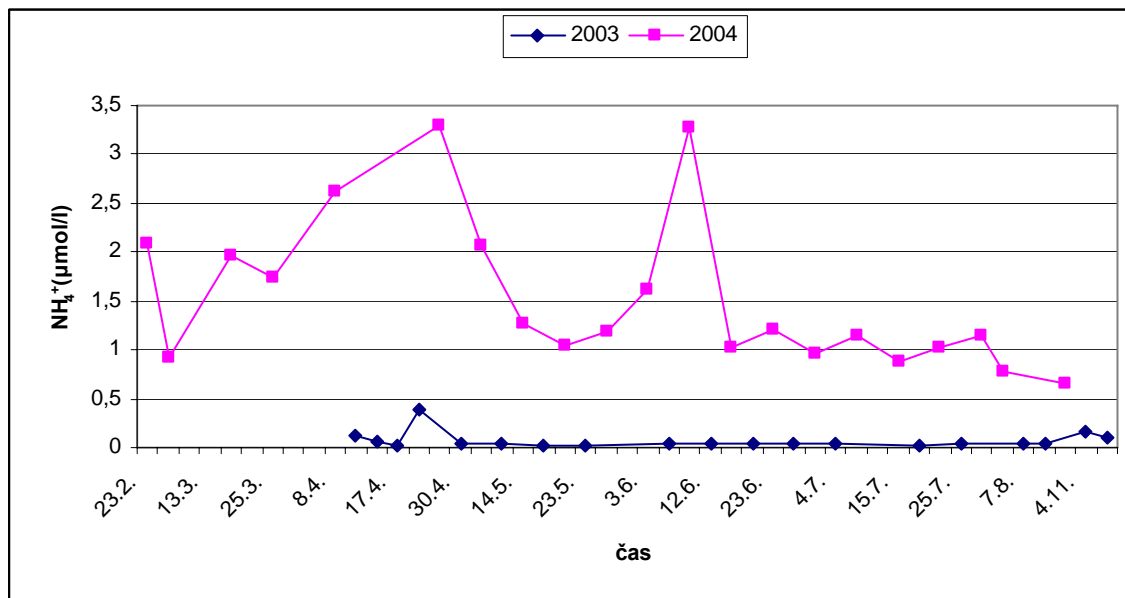
Graf časovne odvisnosti NO_3^- vrednosti ($\mu\text{mol/l}$).



Priloga F: Začetna koncentracija v aprilu 2003 je bila $3,9 \mu\text{mol/l}$ in je nato padla na enakomerno nizke vrednosti (od $0,1$ do $1,5 \mu\text{mol/l}$) razen pri izrazitem višku v sredini junija ($4,4 \mu\text{mol/l}$) in novembra ($3,9 \mu\text{mol/l}$). V letu 2004 so bile koncentracije nitrata do junija izrazito višje kot prejšnje leto. Marca je bila povprečna koncentracija $6,2 \mu\text{mol/l}$, aprila pa maksimalna $11,8 \mu\text{mol/l}$. Tudi maja so bile koncentracije višje s povprečjem $4,3 \mu\text{mol/l}$. V začetku junija je koncentracija padla ($0,56 \mu\text{mol/l}$), nakar je sledil podoben višek kot v letu 2003. Koncentracije so bile nato do septembra nizke.

Priloga G

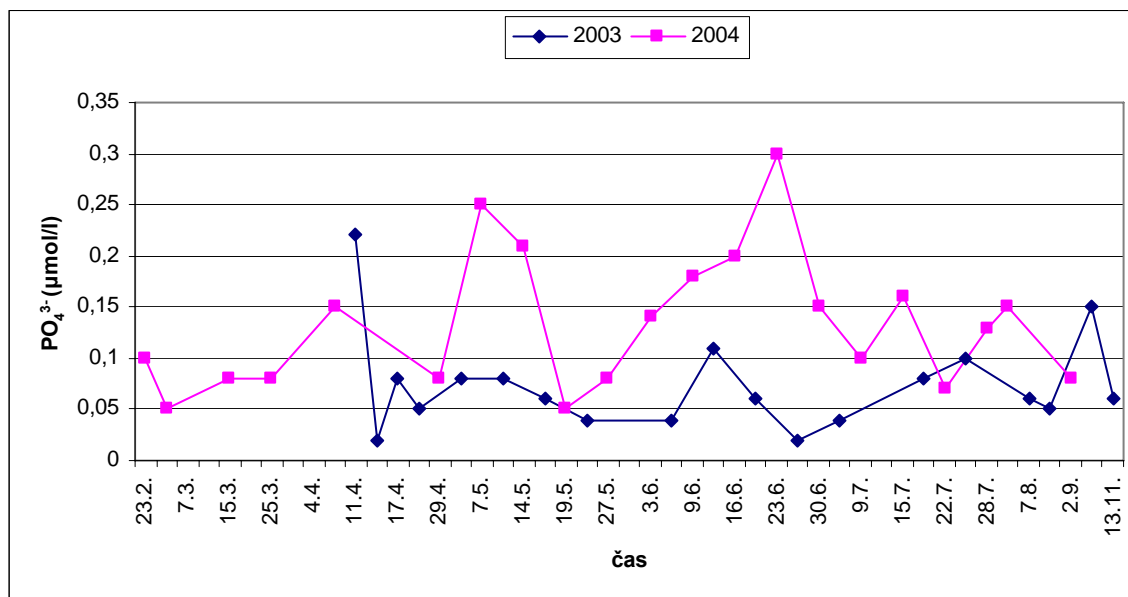
Graf časovne odvisnosti NH_4^+ vrednosti ($\mu\text{mol/l}$).



Priloga G: V letu 2003 so bile koncentracije od aprila do novembra nizke, saj so nihale med 0,02 in 0,11 $\mu\text{mol/l}$, z izjemo viška ob koncu aprila (0,38 $\mu\text{mol/l}$). V letu 2004 je bila slika popolnoma drugačna. Izrazita sta bila viška aprila (3,3 $\mu\text{mol/l}$) in junija (3,27 $\mu\text{mol/l}$). Sicer so bile koncentracije visoke že marca (1,85 $\mu\text{mol/l}$), po junijskem višku pa je bila povprečna koncentracija amonija do septembra 1,02 $\mu\text{mol/l}$.

Priloga H

Graf časovne odvisnosti PO_4^{3-} vrednosti ($\mu\text{mol/l}$).



Priloga H: Začetna koncentracija v aprilu 2003 je bila $0,22 \mu\text{mol/l}$, nato je padla na $0,02 \mu\text{mol/l}$ in je bila v maju povprečno $0,05 \mu\text{mol/l}$. V juniju je nastopil višek ($0,11 \mu\text{mol/l}$). Po padcu na $0,02 \mu\text{mol/l}$ julija je nato enakomerno naraščala do novega viška ob koncu meseca ($0,1 \mu\text{mol/l}$). Koncentracija PO_4^{3-} so nato do novembra padale. V letu 2004 so bile koncentracije vseskozi višje kot prejšnje leto (z izjemo začetne koncentracije v letu 2003). Visoke koncentracije fosfata so bile prisotne v maju (višek $0,25 \mu\text{mol/l}$) in juniju (višek $0,3 \mu\text{mol/l}$). Tudi aprila, julija in avgusta so dosegale koncentracije vrednost $0,15 \mu\text{mol/l}$.