

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tjaša MARINŠEK

**FRAKCIONACIJA MORSKIH MAKROAGREGATOV
MED MIKROBNO RAZGRADNJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tjaša MARINŠEK

**FRAKCIONACIJA MORSKIH MAKROAGREGATOV MED
MIKROBNO RAZGRADNJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**FRACTIONATION OF MARINE MACROAGGREGATES DURING
MICROBIAL DEGRADATION**

GRADUATION THESIS
University study

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Morski biološki postaji v Piranu in deloma na Institutu »Jožef Štefan« v Ljubljani, Odsek za znanosti o okolju.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Jadrana Faganelija, za somentorico dr. Ingrid Falnoga in za recenzenta prof. dr. Davida Stoparja.

Mentor: prof. dr. Jadran Faganeli

Somentorica: dr. Ingrid FALNOGA

Recenzent: prof. dr. David STOPAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Jadran FAGANELI

Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja v Piranu

Članica: dr. Ingrid FALNOGA

Ljubljana, Institut »Jožef Štefan«, Odsek za znanosti o okolju

Član: prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tjaša Marinšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 579.68 + 574.5: 543: 547.917 (043) = 163.6
KG	morska mikrobiologija/morski makroagregati/severni Jadran/mikrobna razgradnja/ogljikovi hidrati/ultrafiltracija/spektrofotometrične metode/kromatografija HP SEC
AV	MARINŠEK, Tjaša
SA	FAGANELI, Jadran (mentor)/FALNOGA, Ingrid (somentorica)/STOPAR, David (recenzent)
KZ	SI Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	FRAKCIONACIJA MORSKIH MAKROAGREGATOV MED MIKROBNO RAZGRADNJO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 69 str., 20 sl., 2 pril., 63 vir.
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Spremljali smo proces razgradnje morskih makroagregatov iz Tržaškega zaliva. Glavna komponenta morskih makroagregatov (in intersticijske vode) so ogljikovi hidrati, ki so hkrati glavni substrat za rast bakterij. Mehanizem postopne razgradnje makroagregatov z mikroorganizmi in hkrati spremembe sestave substrata so še vedno pomembne neznanke. Zato smo izvedli laboratorijski poskus z inkubacijo vzorcev v pogojih, ki so čimbolj podobne naravnim pogojem na mestu vzorčenja. V tedenskih razmikih smo odvzeli podvzorce intersticijske vode makroagregatov. Razgradnjo ogljikovih hidratov smo spremljali v različnih velikostnih frakcijah, ki smo jih izločili s pomočjo ultrafiltracije. V posamezni frakciji smo nato določili koncentracijo ogljikovih hidratov ter vsebnost organskega ogljika in celotnega dušika ter razmerje C/N. Sestavo posameznih frakcij vzorcev, vzorčenih pred zaključkom eksperimenta in po njem, smo proučevali s pomočjo infrardeče spektroskopije (FTIR). Za ločevanje posameznih molskih mas sladkorjev smo uporabili kromatografijo HP SEC. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da razgradnja poteka že med njihovim razvojem in sedimentacijo v vodnem stolpcu. Dobljeni rezultati kažejo hitro razgradnjo polisaharidne komponente v vseh frakcijah intersticijske vode makroagregatov, ki se razgrajuje hitreje od proteinske. Ugotovili smo, da je vsebnost ogljikovih hidratov največja v frakcijah z najvišjo molsko maso. To kaže, da so lahko glikoproteini in aminosladkorji, ki so težje razgradljivi, pomembne sestavine visokomolekularnih frakcij intersticijske vode makroagregatov. V nizkomolekularnih frakcijah pa naj bi bili večinoma prisotni poli- in oligosaharidi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.68 + 574.5: 543: 547.917 (043) = 163.6
 CX marine microbiology/marine macroaggregates/northern Adriatic Sea/microbial decomposition/carbohydrates/ultrafiltration/spectrophotometric methods/HP SEC chromatography
 AU MARINŠEK, Tjaša
 AA FAGANELI, Jadran (supervisor)/FALNOGA, Ingrid (co-advisor)/STOPAR, David (reviewer)
 PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2008
 TI FRACTIONATION OF MARINE MACROAGGREGATES DURING MICROBIAL DEGRADATION
 DT Graduation thesis (University study)
 NO XII, 69 p., 20 fig., 2 ann., 63 ref.
 LA SI
 AL sl/en
 AB We studied the degradation of marine macroaggregates from the Gulf of Trieste (northern Adriatic sea). The key organic component of marine macroaggregates (and interstitial water) are carbohydrates, which are the main nutrient for microbial growth. The linkage of structural components, mechanism of formation and microbial degradation of macroaggregates are still rather unknown. We performed a laboratory experiment incubating macroaggregate samples at *in situ* conditions. The samples were taken at various temporal intervals and ultrafiltered, and fractions analyzed for carbohydrate, organic C and total N contents. The composition of fractions sampled before and after experiment were determined by FTIR spectroscopy, while molecular weights of fractions were determined by HP SEC. The results show that the degradation proceeds during macroaggregate maturation and sedimentation in stratified water column. The fractionation of macroaggregate pore waters using ultrafiltration and characterization of fractions by carbohydrate, organic C and total N contents, and FTIR spectroscopy revealed the highest carbohydrate contents were associated to higher molecular weight fractions while the highest C/N ratio appeared in lower molecular weight fractions. These suggest that glycoproteins and aminopolisaccharides are important constituents of the high molecular fraction. On the other hand, poly- and oligosaccharides appear to be the principal constituents of lower molecular weight fractions.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija.....	III
Key words documentation.....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo slik.....	VII
Kazalo preglednic.....	IX
Kazalo prilog.....	X
Okrajšave in simboli.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE IN HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 MIKROORGANIZMI V MORJU	4
2.1.1 Mikroorganizmi v morju	4
2.1.2 Mikroorganizmi v severnem Jadranu	6
2.1.3 Primarna produkcija in nastanek organske snovi	7
2.1.3.1 Primarna produkcija	8
2.1.3.2 Nastanek raztopljenе organske snovi (DOM) in suspendirane organske snovi (POM).....	9
2.2 POJAV SLUZENJA V JADRANU	11
2.2.1 Vzroki za pojav sluzi in nastanek makroagregatov	12
2.2.2 Sestava in lastnosti morskih agregatov.....	14
2.2.2.1 Kemijska sestava morskih makroagregatov	15
2.2.2.2 Biološka sestava morskih makroagregatov	16
2.2.3 Mikroorganizmi in morski makroagregati	17
2.2.4 Razgradnja sluzastih makroagregatov	20
2.2.4.1 Razgradnja na splošno	20
2.2.4.2 Razgradnja glavnih komponent sluzastih makroagregatov	21
3 MATERIALI IN METODE	24
3.1 ORIS PODROČJA RAZISKAVE.....	24
3.2 VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCA.....	27

3.2.1	Vzorčenje.....	27
3.2.2	Priprava vzorcev in potek eksperimenta.....	27
3.2.2.1	Ultrafiltracija	30
3.3	ANALIZA VZORCEV	32
3.3.1	Določanje koncentracije ogljikovih hidratov v intersticijski vodi morskih makroagregatov	32
3.3.2	Elementna analiza	32
3.3.3	Strukturna analiza s spektroskopijo FTIR	33
3.3.4	Gelska kromatografija (HP SEC)	33
4	REZULTATI.....	37
4.1	OPIS NEOBDELANEGA VZORCA	37
4.2	EKSPERIMENTALNO DELO: POTEK RAZGRADNJE.....	37
4.2.1	Spremljanje spremembe koncentracije ogljikovih hidratov v intersticijski vodi morskih makroagregatov med razgradnjo.....	37
4.2.2	Spremljanje elementne sestave v intersticijski vodi morskih makroagregatov	41
4.2.2.1	Primerjava deleža organskega ogljika in koncentracije ogljikovih hidratov.....	45
4.2.3	Spektri FTIR izbranih podvzorcev intersticijske vode morskih makroagregatov	47
4.2.4	Kromatografija HP SEC intersticijske vode morskih makroagregatov	49
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	56
5.1	RAZPRAVA.....	56
5.1.1	Sestava vodotopnih makroagregatov.....	56
5.1.2	Razgradnja posameznih frakcij vodotopnih makroagregatov	58
5.2	SKLEPI.....	59
6	POVZETEK.....	60
7	VIRI	62
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema nastanka polisaharidnih delcev v morju (Heissenberger in sod., 1996).....	14
Slika 2: Fotografski posnetek sluzastih makroagregatov (svetlobni mikroskop - 200 x povečava; foto P. Mozetič).....	15
Slika 3: Geografska lega a) Jadranskega morja; b) Tržaškega zaliva (Vir: NASA).....	24
Slika 4: Lokacija vzorčenja v Tržaškem zalivu (vir: Morska biološka postaja Piran, 2008).....	27
Slika 5: Shema poteka eksperimenta	29
Slika 6: Shema ultrafiltracije	31
Slika 7: Koncentracija ogljikovih hidratov v koncentratih in permeatih po ultrafiltraciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) pri naravni razgradnji v odvisnosti od časa (UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO; UF1/F → frakcija pod 30000 MWCO; UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO; UF2/F → frakcija pod 10000 MWCO; UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO; UF3/F → frakcija pod 5000 MWCO) (n = 2).....	38
Slika 8: Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v posamezni frakciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v odvisnosti od časa pri naravni razgradnji morskih makroagregatov....	39
Slika 9: Delež (% od začetne vrednosti/koncentracije) ogljikovih hidratov po razgradnji v intersticijski vodi morskih makroagregatov (iz leta 2004) (n = 2)	40
Slika 10: Vsebnost organskega ogljika v posamezni frakciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v odvisnosti od časa (n = 2).....	41
Slika 11: Vsebnost celotnega dušika v posamezni frakciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v odvisnosti od časa (n = 2).....	42
Slika 12: Molsko razmerje C/N v posamezni frakciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v odvisnosti od časa (n = 2).....	44
Slika 13: Primerjava deleža organskega ogljika, deleža celotnega dušika in koncentracije ogljikovih hidratov v posameznih frakcijah intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v posameznem času (n = 2) (UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO; UF1/F → frakcija pod 30000 MWCO; UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO; UF2/F → frakcija pod 10000 MWCO; UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO; NR1 → naravna razgradnja po 1 tednu; NR4 → naravna razgradnja po 4 tednih).....	45
Slika 14: Spektri posameznih frakcij intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) pred inkubacijo (UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO; UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO; UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO)	47
Slika 15: Spektri posameznih frakcij intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) po naravni razgradnji (UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO; UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO; UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO)	48
Slika 16: Kromatografija intersticijske vode morskih makroagregatov – vzorec na začetku inkubacije (UF1/F – frakcija pod 30000 MWCO)	49

Slika 17: Kromatografija polisaharidnega standarda z $M_p = 708.000$ pri različnih pogojih.....	50
Slika 18: Kromatografija polisaharidnih standardov različnih velikosti: a) $M_p = 180$; b) $M_p = 667$; c) $M_p = 5900$; d) $M_p = 11100$ (0,5 mL raztopine standarda smo dodali 0,5 mL destilirane vode); e) $M_p = 21100$; f) $M_p = 47100$ in g) $M_p = 107000$ pri različnih pogojih.....	51
Slika 19: Kromatografija frakcij intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) pred in po naravni razgradnji (1 teden); a) neobdelan vzorec na začetku inkubacije (t_0); b) podvzorec odvzet po naravni razgradnji ($t_1 = 1$ teden); UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO, UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO, UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO.....	53
Slika 20: Kromatografija polisaharidnega standarda ($M_p = 107.000$) s katerim smo preverili delovanje membran pri ultrafiltraciji → UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO, UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO, UF2/F → frakcija pod 10000 MWCO	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava eksperimentalnih pogojev uporabljenih pri HP SEC kromatografiji v članku Minor in sod. (2002) in pogojev HP SEC kromatografije, ki smo jih uporabili pri našem eksperimentu	36
---	----

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije ogljikovih hidratov

Priloga B: Vsebnost organskega ogljika, celotnega dušika in molsko razmerje C/N v posameznih frakcijah ob različnih časih pri naravni razgradnji morskih makroagregatov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CFU	–	enota (mikrobna celica ali skupek celic), iz katere se razvije posamezna kolonija (ang. colony forming units)
COM	–	koloidna organska snov (ang. colloidal organic matter)
C _{org.}	–	organski ogljik
DOM	–	raztopljena organska snov (ang. dissolved organic matter)
DTT	–	ditiotreitol
EDS	–	energijsko disperzni spektrometer (ang. energy dispersive spectrometer)
FTIR	–	infrardeča spektroskopija (ang. Fourier–transform infrared spectroscopy)
HP SEC	–	velikostna izključitvena kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Size Exclusion Chromatography)
HPLC	–	visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. High Performance Liquid Chromatography)
M _r	–	molska masa
MS	–	masna spektroskopija
MWCO	–	izključitvena molekulska masa (ang. molecular weight cut off)
nM	–	navtična milja
NMR	–	nuklearna magnetna resonanca (ang. nuclear magnetic resonance)
N _{tot.}	–	celokupni dušik
POM	–	suspendirana organska snov (ang. particulate organic matter)
PSU	–	praktična enota slanosti (ang. practical salinity unit)
razm. CHO/acetat	–	razmerje med ogljikovimi hidrati in acetatom
razmerje C/N	–	razmerje med ogljikom in dušikom
razmerje C _{org.} /N	–	razmerje med organskim ogljikom in dušikom
razmerje N/P	–	razmerje med dušikom in fosforjem
SEC	–	velikostna izločitvena kromatografija (ang. Size-exclusion Chromatography)

UDOM	–	ultrafiltrirana raztopljena organska snov (ang. ultrafiltered dissolved organic matter)
UF1/F	–	permeat ultrafiltracije 1 (frakcija pod 10000 MWCO)
UF1/O	–	koncentrat ultrafiltracije 1 (frakcija nad 30000 MWCO)
UF2/F	–	permeat ultrafiltracije 2 (frakcija pod 10000 MWCO)
UF2/O	–	koncentrat ultrafiltracije 2 (frakcija med 10000 in 30000 MWCO)
UF3/F	–	permeat ultrafiltracije 3 (frakcija pod 5000 MWCO)
UF3/O	–	koncentrat ultrafiltracije 3 (frakcija med 5000 in 10000 MWCO)
λ	–	valovna dolžina

1 UVOD

O pojavu sluzenja v morju obstajajo poročila z različnih koncev sveta: iz Tirenskega morja, Egejskega morja, Severnega morja, z obalnih območij Tihega oceana, Nove Zelandije, Dalmacije, Grčije, Sicilije in Črnega morja. Severni del Jadranskega morja epizodno doživlja masovno kosmičenje organske snovi in nastanek agregatov velikih dimenzij.

Sluzasti makroagregati so predvsem produkt izločkov fitoplanktona (diatomej). Za nastanek sluzi so pomembni tudi posebni klimatski pogoji (visoka temperatura vode, odsotnost vetrov in stabilen vodni vzorec). Sluzenje morja se ponavadi prične pozno spomladi/zgodaj poleti (maj–junij) in običajno izgine ob pojavu slabega vremena jeseni (konec julija–september). Tvorbo sluzi povezujejo s spremembo ravnotežja razmerja dušik/fosfor (N/P), ki naraste in povzroči spremembe v fiziologiji fitoplanktona (povečano izločanje eksudata), do katerega ponavadi pride med daljšim obdobjem velikega rečnega dotoka v severni Jadran. Sluz lahko nastane tudi kot posledica interakcij med bakterijami in organsko snovjo. V zgoščenih in želatinastih sluzastih makroagregatih opazimo ujete različne delce: ostanke razbitih celic, fitoplanktonske celice, celice mikrozooplanktona, bakterije, detrit, fekalne peletke in mineralne delce. Agregati so lahko veliki od nekaj mm do nekaj km in se razprostirajo na območju, velikem do nekaj sto km², so belo-rumene do rjave barve z veliko mehurčki. Splošna sestava sluzastih makroagregatov vključuje štiri glavne razrede strukturnih komponent: ogljikove hidrate, estre in amidne funkcionalne skupine, alifatske ter organosilicijske spojine.

Nastanek makroagregatov zajema procese, ki pretvorijo raztopljeno organsko snov (DOM, dissolved organic matter), ki je večinoma produkt ekstracelularnih izločkov fitoplanktona, v koloidno organsko snov (COM, colloidal organic matter) in nato še v suspendirano organsko snov (POM, particulate organic matter). Kopičenje in stabilnost makrogelov sta verjetno povezana z interakcijami med organsko snovjo in mineralnimi delci. Proces nastanka makroagregatov je pomemben za razumevanje kroženja organske snovi v morju, ki je pomemben naravni rezervoar organskega ogljika na Zemlji. Povezani biološki in

fizikalni procesi s katerimi biološko aktivni elementi krožijo v oceanu predstavljajo enega izmed najbolj kompleksnih in urejenih sistemov na Zemlji.

Razgradnja makroagregatov je odvisna predvsem od aktivnosti mikroorganizmov, ki so v njih prisotni. Vrstna sestava mikroorganizmov je drugačna od tiste v okoliški vodi. Agregati dajejo zavetje velikemu številu bakterij, katerih aktivnost jih spreminja in razgrajuje. Koncentracija mikroorganizmov je manjša v okoliški vodi. Časovne spremembe kemične sestave makroagregata kažejo izrazito zmanjšanje vsebnosti polisaharidov (zaradi mikrobne in fotokemične razgradnje) vzporedno s povečanjem komponent organosilicijevih spojin in alifatskih struktur. Mikrobno razgradnjo makroagregatov (sedimenta – gošče in supernatanta) sta v svojih diplomskih delih obravnavali tudi Mohar (2006) in Kofol (2007) s podobnim pristopom kot je prikazan v tej diplomski nalogi.

Dosedanje raziskave kažejo, da sluz ni neposredno škodljiva za zdravje ljudi. Zaradi lepljivosti sluzastih makroagregatov se nanje »ujamejo« različni delci in organizmi iz morske vode. Prisotnost morskih makroagregatov ima velik vpliv na morski ekosistem, ribištvo, turizem in druge dejavnosti povezane z morjem.

Samega pojava »sluzenja morja« ne smemo enačiti s t.i. »cvetenjem morja«, kjer gre za prekomerno namnožitev fitoplanktonskih mikroorganizmov, ki je v severnem Jadranu del vsakoletne fitoplanktonske dinamike (Kovač, 2005).

1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE IN HIPOTEZE

Mehanizem postopne razgradnje makroagregatov z mikroorganizmi in hkrati spremembe sestave substrata so še vedno pomembne neznanke pri raziskovanju morskih makroagregatov. Zato je bil cilj diplomske naloge raziskati potek postopne razgradnje makroagregatov v času in spremljati spremembe v sestavi in strukturi substrata – makroagregatov. Cilj diplomskega dela je bil tudi spremljanje časovnega poteka razgradnje s pomočjo frakcionacije po molskih masah ter kemijske karakterizacije posameznih frakcij.

Tako smo spremljali razgradnjo snovi v intersticijski vodi makroagregatov v času eksperimenta.

Rezultati predhodnih študij kažejo, da so glavna komponenta morskih makroagregatov (in intersticijske vode) ogljikovi hidrati, ki so hkrati glavni substrat za rast bakterij. Zato smo se osredotočili na razgradnjo ogljikovih hidratov v intersticijski vodi makroagregatov v pogojih, ki so čimbolj podobni naravnim pogojem na mestu vzorčenja. Razgradnjo ogljikovih hidratov smo spremljali v različnih velikostnih frakcijah, ki smo jih izločili s pomočjo ultrafiltracije.

Delovne hipoteze:

- Sestava nastalih makroagregatov se razlikuje od sestave »starejših«, delno razgrajenih makroagregatov z večjo vsebnostjo lipidne frakcije, ki je mikrobno težje razgradljiva.
- Komaj nastali makroagregati se razgrajujejo hitreje zaradi večjega deleža lažje razgradljivih komponent (ogljikovi hidrati, proteini).
- Med trajanjem poskusa (razgradnje) se v makroagregatih poveča delež težje razgradljive frakcije z visoko molsko maso.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROORGANIZMI V MORJU

2.1.1 Mikroorganizmi v morju

V morju je prisotnih veliko mikroorganizmov kot so bakterije, virusi in praživali. Mnogi od teh mikroorganizmov bistveno vplivajo na sposobnost oceanov, da ohranjajo življenje na Zemlji. Na odprtem morju, daleč od vplivov obalnih človeških bivališč, je v morski vodi še vedno mnogo mikrobov. V obalnih vodah pa je prisotna še večja koncentracija mikroorganizmov (približno $10^6/\text{mL}$) (Hobbie in sod., 1977). Planktona je v morju več kot drugih organizmov. Zaradi lebdenja v vodnem stolpcu so planktonski organizmi razvili različne morfološke in fiziološke prilagoditve: telesno majhnost, izrastke, maščobne zaloge, zračne vezikle, aktivno gibanje, aktivni metabolizem. Planktonske organizme delimo na primarne (fitoplankton) in sekundarne producente v vodnih sistemih – tudi v morju. Z zbiranjem sončne energije in njeno pretvorbo v svoje tkivo fitoplankton tvori osnovo prehranske verige v morju. Od fitoplanktona so – posredno ali neposredno – odvisni vsi organizmi v oceanu. Navsezadnje se tudi ljudje prehranjujemo z oceanskimi bitji, kot so ribe. Tako smo tudi ljudje povezani s fitoplanktonom (Hoyle in Robinson, 2007).

Najpogostejše skupine fitoplanktona so:

- diatomeje: obstaja preko 12000 različnih vrst, celična stena je iz silicija in pektina, običajno imajo zelo razgibano površino, lahko so prosto plavajoče ali pritrjene na površino, enocelične ali pa nanizane v verižice, spomladi predstavljajo glavne primarne producente in so prevladujoča skupina fitoplanktona v mrzlih oceanih.
- dinoflagelati: so manjši od diatomej, enocelični, lahko imajo celulozno celično steno, so prosto plavajoči, lahko izvajajo fotosintezo ali živijo kot paraziti oz. simbionti s koralami, pogosto jih najdemo predvsem v toplejših morjih.
- kokolitoforidi: enocelični, imajo oklep iz apnenca, lahko so v želatinastem ovoju, avtotrofi ali heterotrofi, večina ima bičke, so pomembni producenti v oligotrofnih morjih, običajno so prisotni v toplejših morjih.

- silikoflagelati: enocelični, imajo silikatni oklep, so avtotrofi ali heterotrofi, običajno jih najdemo v hladnejših morjih.
- cianobakterije: so enocelične, lahko so v obliki filamentov, nekatere imajo bičke, nekatere vrste fiksirajo dušik, so prevladujoča skupina poleti (Stopar in sod., 1999).

Mikroorganizmi v oceanu pomagajo tvoriti hranila, dostopna ostalim morskim bitjem. Služijo kot hrana drugim organizmom (ribe in morski sesalci) ter tako naredijo mnoge snovi dostopne za druge organizme v prehranski mreži.

Morski virusi so lahko oboje, škodljivi in koristni za »zdravje« oceanov. Nekateri virusi napadajo in ubijajo plankton, na nekaterih območjih pa lahko rušijo oceansko prehransko verigo. Hkrati pa je lahko mrtvi plankton vir ogljika, ki drugače ni tako preprosto na voljo ostalim organizmom v morju. Znanstveniki ocenjujejo, da je do 25 % vsega prosto dosegljivega biotskega ogljika v oceanih na voljo zaradi delovanja virusov.

Bakterije najdemo v vseh delih vodnega stolpca, na površini sedimenta in v sedimentu samem. Nekatere so aerobne (za rast potrebujejo kisik), druge pa anaerobne. Večina bakterij je prosto živečih, nekatere pa živijo kot simbionti znotraj drugih organizmov.

Cianobakterije so igrale pomembno vlogo v zgodovini Zemlje in pri procesih v oceanu, tudi pri razvoju stromatolitov. Živeč v kolonijah, so cianobakterije proizvajale kisik med procesom fotosinteze. Tako je nastajal kisik v atmosferi, ki ga danes za svoj obstoj potrebujejo mnoga živa bitja.

Nekateri mikroorganizmi lahko negativno vplivajo na morske in kopenske živali, tudi na človeka. To je bolj izrazito v obalnih predelih, kjer je vpliv človeka bolj viden (npr. izpusti kanalizacije) (Hoyle in Robinson, 2007) .

Velikost mikrobne populacije je odvisna od založenosti s hranili. V priobalnih morjih se gostota bakterij giblje med 10^4 in 10^6 na mL. Mikrobna aktivnost se zelo poveča, če se lahko bakterije pritrdijo na trdno površino, predvsem kadar je v raztopini malo hranil (Stopar in sod., 1999).

2.1.2 Mikroorganizmi v severnem Jadranu

Trofični gradient, padajoč od severozahoda proti jugovzhodu je tipičen za severni del Jadranskega morja, kjer s hranili bogate vode prihajajo predvsem iz reke Pad. Kompleksne značilnosti in posebna hidrodinamika kotline severnega Jadrana vodijo do velike variabilnosti trofičnih pogojev v prostoru in času (Pugnetti in sod., 2005).

Za nekaj diatomejskih vrst iz fitoplanktonske skupine (npr. *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros spp.*, *Cylindrotheca closterium*), ki jih navadno srečamo na severnem Jadranu, je znano, da proizvaja velike količine ekstracelularnih polisaharidov (Pugnetti in sod., 2005).

Spremembe v strukturi skupnosti heterotrofnih bakterij kažejo sezonsko zaporednost glavnih bakterijskih skupin. V hladnejšem delu leta prevladujejo po Gramu negativne nefermentirajoče bakterije. Poleti je povečano število bakterij iz družine *Vibrionaceae* in pigmentiranih bakterij. Najvišje koncentracije heterotrofnih bakterij, ki jih lahko gojimo (CFU – colony forming units), so opazili v zgornjih plasteh, s težnjo padanja števila bakterij od površine proti dnu in od priobalnih vod proti odprtemu morju. Po Gramu negativno obarvane bakterije ves čas predstavljajo od 52 do 100 % vseh bakterij. Po Gramu pozitivno obarvana frakcija morskih bakterij je pogosto spregledana zaradi nizke koncentracije v vodnih vzorcih, najvišji procent so opazili januarja (Zaccone in sod., 2002).

Vibriji predstavljajo samo 0,1–10 % celotnega števila CFU. Razporeditev sledi ciklu letnih časov, z višjo gostoto (številom) v toplejših mesecih in nižjo gostoto (številom) v mrzlih mesecih (Zaccone in sod., 2002).

Poleti obilica substrata (fitoplanktona) povzroči povečanje koncentracije mikroflore specializirane za razgradnjo celičnih sestavin (proteinov, lipidov in fosfatov). Prav tako je v poletnih mesecih procent bakterij s fosfatazno aktivnostjo približno dvakrat večji kot spomladi. To pomeni, da imajo v severnem Jadranskem morju poseben pomen: bakterijska

skupnost lahko hitro reciklira organofosfatne spojine v okolju z omejenim fosforjem (Zacccone in sod., 2002).

Vsa biomasa planktona kaže močan gradient zmanjševanja od reke Pad proti vzhodu, prav tako od severnega Jadrana proti jugu, medtem ko je za raznolikost planktona viden obraten gradient (Fonda-Umani, 1996).

Mikrofitoplankton je večinoma sestavljen iz diatomej, katerih sestava se časovno in prostorsko zelo spreminja glede na rečne dotoke. V celotnem vodnem stolpcu kažejo dva viška (zimsko-spomladanskega in jesenskega), ki sta najbolj vidna v obalnih vodah. Nanoplankton je številčno dominanten po vsem Jadranskem morju. Kokolitoforidi so povezani z dotoki jonskih voda in so bolj številčni v južnem delu Jadrana. Dinoflagelati so značilni za poletni čas, vendar njihovo število nikoli ne doseže visokih vrednosti. V sestavi mikrozooplanktona v severnem Jadranu prevladujejo migetalkarji iz družine *Tintinnidae* (Umani in sod., 2005).

2.1.3 Primarna produkcija in nastanek organske snovi

Največji izvor organske snovi v morju predstavlja fotosinteza fitoplanktonskih mikroorganizmov. Kljub temu pa so pomembni tudi vnos organske snovi s kopnega z dotoki rek in iz atmosfere, izločki organizmov ter resuspenzija organske snovi iz morskega sedimenta (Kovač, 2005).

Fitoplanktonska primarna produkcija in bakterijska produkcija ogljika sta tesno povezani. Heterotrofna bakterijska produkcija ogljika je odvisna od oskrbe z hitro razgradljivo organsko snovjo (Cole in sod., 1982). Organsko snov, proizvedeno s fotosintezo, porabijo heterotrofne bakterije (Biddanda in sod., 2001). V severnem Jadranu tok organske snovi od fitoplanktona do bakterij zadovolji bakterijsko potrebo po ogljiku večji del pomladi in poletja, predvsem v višjih plasteh. Poleti je razvidno, da bakterijska potreba po ogljiku včasih preseže količino ogljika, ki ga proizvede fitoplankton (Pugnetti in sod., 2005).

2.1.3.1 Primarna produkcija

V priobalnih morjih je fitoplankton glavni »akter« primarne produkcije v vodnem stolpcu. V zgornjih delih vodnega stolpca je količina hranil ponavadi premajhna za občutno rast fitoplanktona, v spodnjih plasteh pa je hranil dovolj, vendar je tu mejni dejavnik svetloba. Če imamo velik vnos hranil v okolje (morje), lahko prihaja do občasnega cvetenja morja.

Dejavniki, ki vplivajo na primarno produkcijo v vodnih sistemih:

- Sončna svetloba – z globino intenziteta svetlobe in s tem raven primarne produkcije pada. S povišano intenziteto svetlobe se povečuje hitrost fotosinteze dokler ne doseže maksimalne hitrosti. Različne fitoplanktonske skupine absorbirajo svetlobo pri različnih valovnih dolžinah elektromagnetnega spektra. Z globino narašča delež fitoplanktona, ki absorbira v modrem delu elektromagnetnega spektra, kar predstavlja energijsko prednost pri zmanjšani intenziteti svetlobe.
- Dostopnost hranil – v večini primerov z globino dostopnost hranil narašča. V morskem sistemu je za rast fitoplanktona običajno limiten dušik. Kljub relativni homogenosti vodnega sistema je razporeditev hranil neenakomerna, kar je posledica hidrografskih značilnosti vodnega telesa ali pa biotskih faktorjev.
- Temperatura – vpliva na rast primarnih producentov in hitrost fotosinteze. Zanimivo je, da se cvetenje morja v zmernem podnebju pojavi takrat, ko je morje relativno hladno (npr. spomladi).
- Svetovna razporeditev fitoplanktona – fitoplankton je po oceanih razporejen precej neenakomerno, kar kaže, da so poleg zgoraj naštetih, ki vplivajo na razporejenost fitoplanktona, pomembni še drugi faktorji. Pomembni so tudi morski tokovi. Kjer globokomorska voda privre na površino (upwelling), je primarna produkcija običajno povečana. Hladna s hranili bogata voda, ki pride na površje, vzdržuje zelo produktivno združbo fitoplanktona in ostalih višjih organizmov. V tropskih vodah je zaradi stalne termokline mešanje vodnih mas slabo, zato je koncentracija hranil nizka in prav tako je nizka primarna produkcija (Stopar in sod., 1999).

Primarna produkcija v »morskem snegu« je povezana s primarno produkcijo v okoliški vodi, kar kaže na to, da fitoplankton vezan na morski sneg, verjetno v veliki meri nastane

ob naključnem trčenju fitoplanktona s sluzastimi agregati. Celotna primarna produkcija v morskem snegu je desetkrat višja kot v okoliški vodi (Kaltenböck in Herndl, 1992).

2.1.3.2 Nastanek raztopljenе organske snovi (DOM) in suspendirane organske snovi (POM)

Organsko snov v morju delimo na raztopljeno (DOM, dissolved organic matter), koloidno (COM, colloidal organic matter) in suspendirano organsko snov (POM, particulate organic matter). Suspendirana snov ostane pri filtriranju skozi filter z velikostjo por 0,45 μm na filtru in jo dogovorno opredelimo z velikostnim razredom 0,45–200 μm . DOM, določena z velikostnim razredom $<0,4 \mu\text{m}$, pa gre skozi steklen filter. Koloidi so natančneje definirani z velikostnim razredom med 1 μm in 1 nm. Obe frakciji (DOM in POM) vključujeta tudi del koloidne frakcije.

Raztopljena organska snov (DOM) v morski vodi je eden od treh pomembnih rezervoarjev organske snovi na planetu, drugi dve sta organska snov v zemlji in žive rastline. DOM v morju vsebuje približno toliko ogljika kot ga je v atmosferi v ogljikovem dioksidu (Tanoue in sod., 1995).

DOM izločajo primarni producenti in potrošniki. Sprošča se med prehranjevanjem iz poškodovanih celic, nastaja pri hidrolizi, ki poteka zaradi mikrobne razgradnje, proste encimske aktivnosti ter aktivnosti avtolitičnih encimov planktona. Sproščena DOM primarnih producentov je tudi rezultat izločanja odpadnih metabolitov, spojin, ki inhibirajo plenilce in tekmece ter je posledica izgub skozi membrano v vodnem mediju (Kovač, 2005). Organska snov, ki je s primarno produkcijo enkrat vkomponirana v morje, je nato prenesena v višje ali nižje trofične ravni preko morske prehranske mreže (Tanoue in sod., 1995).

Eden možnih mehanizmov nastanka DOM je, da se organska snov, ki se sprošča iz morskih organizmov v rezervoar DOM, brez težav remineralizira in majhna frakcija razgrajenih oligomernih produktov se pretvori v huminske snovi z reakcijo kondenzacije ali strukturne preureditve. DOM lahko nastane tudi tako, da biopolimeri odporni proti

razgradnji z encimi, selektivno preživijo in se kopičijo v vodnem stolpcu (Tanoue in sod., 1995).

Glavni biološko aktivni elementi (ogljik, dušik in fosfor) v DOM so sestavni del biopolimerov, ki jih najdemo v morskih organizmih. Manj kot 25 % morske DOM je bilo kemijsko določenih, kar kaže na to, da se sestava in struktura DOM spreminja oz. je težko določljiva (Ogawa in sod., 2001). Raztopljena organska snov (DOM) je velika reaktivna komponenta globalnega kroženja ogljika in največji rezervoar reducirane ogljika v oceanih. Prav tako je DOM pomembna kot vir hrane za morske organizme, kot faktor kroženja hranil in kovin v sledovih ter hidrofobnih organskih polutantov (Minor in sod., 2002).

DOM je prisotna v nizkih koncentracijah (približno 1 mg/L) v morski vodi, medtem ko je koncentracija soli precej višja (približno 35 mg/L) (Minor in sod., 2002). Za DOM so na splošno ugotovili visoko razmerje ogljik/dušik (C/N) na površini oceana (9-18), medtem ko ima »idealna« DOM za bakterijsko rast nekoliko nižje razmerje C/N (Redfield) (Skoog in sod., 1999).

Dodatna zanimivost pri karakterizaciji DOM je, da se različni velikostni razredi DOM v kroženju v vodnem stolpcu pojavljajo v različnih časovnih obdobjih. Raziskave kažejo, da so večji velikostni razredi organske snovi manj izpostavljeni razgradnji *in situ* kot manjši velikostni razredi organske snovi (Minor in sod., 2002). Molekularne spremembe prav tako zmanjšujejo biotsko dostopnost DOM. Fizikalno-kemijske reakcije so glavni mehanizem za tvorbo strukturno nedefinirane in težko dostopne DOM. Nekatere raziskave kažejo, da mikroorganizmi prav tako proizvajajo DOM, ki je odporna proti razgradnji. Morske bakterije hitro prevzamejo nestabilno DOM in producirajo DOM, ki je relativno odporna proti razgradnji. Encimska aktivnost igra pomembno vlogo pri tvorbi težko dostopne DOM v majhnih količinah (Ogawa in sod., 2001).

Suspendirana organska snov (POM) v oceanu je sestavljena iz neživih in živih komponent (približno razmerje detrit : planktonska biomasa je 10 : 1). Detrit je definiran tudi kot neživa POM. Predstavlja širok spekter velikosti delcev z različno biokemijsko

sestavo. Lahko vključuje delce po vrsti od najmanjših eksopolimerov (enakovrednih koloidom) do največjih organskih agregatov in morskega snega. Detrit je amorfne oblike. Izvira iz vodnih, kopnih, sedimentnih okolij ali pa iz pasu bibavice. Lahko je zelo labilen ali pa težko dostopen, bogat s proteini in ogljikovimi hidrati in raznolik v sestavi glede na izvor delcev, velikost in starost (Verity in sod., 2000).

V suspendirani snovi je poleg organske še anorganska snov, ki jo sestavljajo avtohtoni minerali (pretežno biogenega izvora) in alohtoni mineralni delci (detritični minerali) kopenskega izvora. Organsko suspendirano snov sestavljajo živi in odmrli fitoplankton, zooplankton, bakterije, produkti izločanja in razgradnje ter makroskopski agregati (Kovač, 2005).

POM se prenaša in razgrajuje znotraj celotnega vodnega stolpca med sedimentacijo, preden doseže površino sedimenta. Za morski sneg in makroagregate je znano, da sta pomembni mesti kopičenja in razgradnje organske snovi znotraj vodnega stolpca, kar prispeva k neenakomerni razporeditvi POM v morski vodi. (Faganeli in sod., 1995). Makroagregati vplivajo tudi na kemizem in biološke značilnosti samega vodnega stolpca (npr. manjša koncentracija suspendiranih delcev, značilnosti prehranjevalnih verig).

DOM ima dolg zadrževalni čas v oceanu in je večinoma bolj odporen proti razgradnji kot POM. Polimeri DOM se lahko spontano kopičijo v gele in makroagregate ter so vidni kot makrogeli. Kopičenje morskih koloidov se zdi ključno za razumevanje kroženja organske snovi v morju (Kovač in sod., 2002).

2.2 POJAV SLUZENJA V JADRANU

Pojav »sluzenja morja« je za severni Jadran znan že 279 let, saj prvi zapisi o tem pojavu segajo v leto 1729 (Fonda-Umani in sod., 1989) – pred razvojem kmetijstva, industrije in turizma. O pojavu sluzenja so poročali z različnih koncev sveta, in sicer so ga opazili v Tirenskem morju, v severnem Egejskem morju, v Severnem morju, v obalnih področjih Tihega oceana in na Novi Zelandiji (Danovaro in sod., 2005). Prav tako so sluzaste

makroagregate opazili v obalnih območjih Dalmacije, Grčije, ob Siciliji in v Črnem morju, toda v tako veliki razsežnosti je pojav značilen samo za območje severnega Jadrana. Sluzenje morja je na tem področju v zadnjih 20 letih pogost pojav. Zadnji pojavi sluzenja v večjem obsegu v slovenskem morju so bili v letih 2000, 2002 in 2004 (Kovač, 2005).

Med najbolj uveljavljenimi hipotezami o vzrokih za tvorbo sluzi so:

- spremenjen vnos hranil in neravnovesje razmerja N/P, ki se poviša (Granelli in sod., 1999; Degobbi in sod., 2005)
- presežek nepopašene primarne produkcije (Degobbi in sod., 1999),
- večja stopnja virusnih infekcij in posledično sproščanje DOM (Degobbi in sod., 1999; Simon in sod., 2002),
- akumulacija DOM in mikrobna zanka (Aluwihare in Repeta, 1999; Herndl in Weinbauer, 2003)
- okoljske razmere (geografski, meteorološki in hidrološki dejavniki) (Degobbi in sod., 1999)
- sladkovodni in drugi vnosi (Danovaro in sod., 2005).

Avtorji »mikrobne hipoteze« (Danovaro in sod., 2005) domnevajo, da je tvorba sluzi v Jadranskem morju, prav tako rezultat interakcij na mikronivoju med bakterijami in organsko snovjo. Hipoteza se osredotoča na nepovezanost med hitro mikrobno razgradnjo POM (posledica velike sprostitve polisaharidov in peptidov) in omejeno porabo substrata, ki ga sprostijo bakterije. Prvi korak v hipotezi je mikrobna razgradnja POM s pomočjo encimov. Drugi korak v »mikrobni hipotezi« pa je kopičenje raztopljenih organskih snovi. Ključni korak za tvorbo sluzi je očitno kopičenje DOM v večje kosme. Ta proces se pospeši, ko postane koncentracija DOM visoka, kopičenje in rast pa sta olajšana v stabilnem vodnem stolpcu (Danovaro in sod., 2005).

2.2.1 Vzroki za pojav sluzi in nastanek makroagregatov

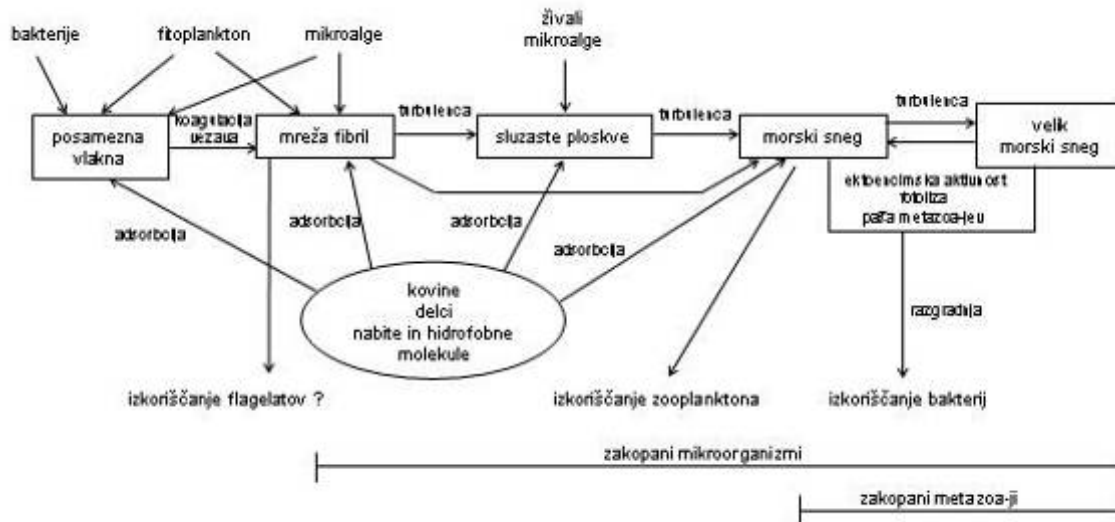
Sluz se ponavadi pojavi pozno pomladi in poleti (konec maja–junij). Konec pojava pa ponavadi sovпада z slabšimi vremenskimi razmerami (nevihte, porušenje piknokline) ob

koncu poletja oz. jeseni. Za pojav sluzenja so pomembne ugodne klimatske in hidrografske razmere, kot so visoka temperatura vode, odsotnost vetrov, mirno morje in stabilen vodni stolpec. Večino sluzi lahko najdemo na površini, ob piknoklini in pri dnu (Penna in sod., 2003). Pomanjkanje fosforja in sprememba v ravnotežju ter visoko razmerje N/P v Jadranskem morju so predpogoji za sprožitev kopičenja sluzi (Urbani in sod., 2005). To neravnovesje povzroči spremembe v sestavi in rastni hitrosti alg, posebno diatomej, in vpliva na metabolizem alg kar povzroči produkcijo sluzi.

Makroagregate sluzi lahko definiramo kot makrogele, ki jih producira fitoplankton. Njihova tvorba vključuje procese pretvorbe makromolekularne raztopljene organske snovi (DOM) v koloidno organsko snov (COM) in postopno v suspendirano organsko snov (POM). Raztopljena organska snov se koncentrira na faznih mejah (sediment – voda, zrak – gladina morja in piknoklina), tj. območjih z višjo vsebnostjo mineralnih delcev (sedimenta, atmosferski prah), kar verjetno vodi do intenzivnih agregacijskih procesov ter nadaljnjega kopičenja COM in makroagregatov sluzi v teh plasteh. Fotopolimerizacija vodi k visokomolekularni organski snovi, ki se prav tako zdi pomembna za proces pretvorbe v COM. Makromolekule predstavljajo substrat, ki je težko dostopen za bakterije, vsaj za določen čas, in tako se lahko koncentrira. Raziskave kažejo, da so ob procesu agregacije pomembni mineralni delci (kalcit, kremen in minerali glin) in/ali ioni kot sta Ca^{2+} in Fe^{3+} , ki delujejo kot učinkoviti povezovalci med morskimi hidrogeli ter verjetno stabilizirajo strukturo makrogela makroagregata in tako preprečujejo njegovo biološko razgradnjo (Kovač in sod., 2004).

Struktura makroagregatov v severnem Jadranu je podobna strukturi morskega UDOM (ultrafiltrirana raztopljena organska snov) in UDOM v izločkih fitoplanktona, kar nakazuje, da so agregati večinoma produkt fitoplanktonskih ekstracelularnih izločkov ter kasnejšega koncentriranja in kopičenja visokomolekularne raztopljene ter koloidne organske snovi in delcev. Tako nastajajo makrogeli oz. suspendirana snov (Kovač in sod., 2005).

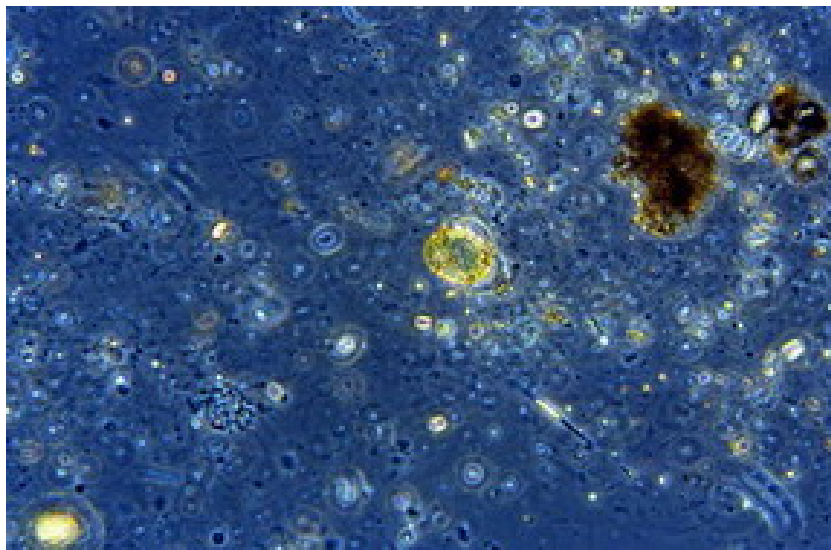
Lepljiva sluzasta snov učinkovito »lovi« delce iz pelaškega okolja, kar vodi do zbistritve okoliške vode. Podaljšan rezidentni čas agregatov v vodnem stolpcu zato izzove nepretrgano bogatenje mikrobne biomase (Kaltenböck in Herndl, 1992).



Slika 1: Shema nastanka polisaharidnih delcev v morju (Heissenberger in sod., 1996)

2.2.2 Sestava in lastnosti morskih agregatov

Makroagregati so lahko različnih barv, oblik in razvojnih faz (bolj zreli oz. starejši ali mlajši). Vodoravna in navpična razporeditev v vodnem stolpcu je heterogena in odvisna od okoljskih pogojev, hidrografskih značilnosti ter kemičnih in bioloških značilnosti makroagregatov. Običajno se makroagregati kopičijo v sloju temperaturnega in slanostnega oz. gostotnega preskoka. V času pojava sluzenja so v severnem Jadranu opazili sluzaste skupke ali makroagregate različnih barv od mlečno belih, rožnatih do rumenih in rjavih. Makroagregati so bili prisotni v različnih oblikah (drobni sluzasti kosmiči, majhni in veliki kosmi, nitke, zavese, spleti, oblaki, sluzaste površinske odeje, želatinozne plasti) in velikostih (od nekaj milimetrov do nekaj kilometrov) (Kovač in sod., 2002; Kovač in sod., 2004; Kovač, 2005).



Slika 2: Fotografski posnetek sluzastih makroagregatov (svetlobni mikroskop – 200 x povečava; foto P. Mozetič)

2.2.2.1 Kemijska sestava morskih makroagregatov

Kemijsko zgradbo makroagregatov severnega Jadrana so preučevali z uporabo različnih spektroskopskih tehnik (^1H NMR, ^{13}C NMR, FTIR). Te študije so razkrile zelo kompleksno strukturo makroagregatov, v glavnem sestavljeno iz organske komponente, ogljikovih hidratov, alifatskih verig, organosilicijevih spojin in anorganske frakcije sestavljene iz kalcita, kremenca in gline. Proteini in druge organske komponente so prisotni v manjšem deležu (Kovač in sod., 2004).

Anorgansko frakcijo makroagregatov sestavljajo predvsem naslednji minerali: kalcit, illit, kremen in nizek Mg-kalcit. EDS-analiza izbranih vzorcev makroagregatov vzorčenih julija 1997 kaže vsebnost glavnih ionov morske vode ter elementov glin, kalcita in silikatov: Na, Cl, C, Al, Si, Mg, Ca, Fe in S (Kovač in sod., 2002).

Podrobnejše kemijske analize kažejo, da so sestavljeni pretežno iz polisaharidov, ki so v vodi slabo topni in odporni na kislinsko hidrolizo. Vodotopni ogljikovi hidrati predstavljajo 12 do 34 % celotne snovi (Kovač, 2005). Analiza nevtralnih monosaharidov

kaže prevladujočo vsebnost glukoze (60 %), deleži ostalih monosaharidov pa si sledijo v naslednjem padajočem vrstnem redu: manoza, fruktoza, galaktoza, arabinoza, riboza, ksiloza in fukoza. Ta sestava kaže, da so monosaharidi večinoma kombinirani v strukturnih/strukturah heteropolisaharidih fitoplanktonske celične stene (Faganeli in sod., 1995). Nekateri avtorji menijo, da je ta monosaharidna sestava značilna tudi za mukus fitoplanktona.

Kemične analize sluzi so pokazale, da je razmerje C/N v sluzi med 9,5 in 18,6 ter nakazuje, da so polisaharidi glavna organska komponenta sluzi (Kovač in sod., 2008). Visoka vrednost razmerja C/N je predvsem posledica večjega deleža ogljikovih hidratov ter nizke vsebnosti proteinov (0,56–2,5 %). Višje razmerje C/N odraža tudi večjo vsebnost detritne snovi oz. visoko razvojno stopnjo makroagregatov (starejši makroagregati). Sestava agregatov se spreminja skozi razgradnjo (za opis glej tudi stran 20) (Kovač, 2005).

V vodi netopna frakcija makroagregatov je večinoma sestavljena iz alifatskih komponent in mineralnih delcev z nizko vsebnostjo ogljikovih hidratov. (Kovač in sod., 2004). Pomembne pa so še težkorazgradljive organosilicijeve spojine iz frustul diatomej (Kovač in sod., 2005). Vodotopna frakcija je v zgodnjih fazah razvoja makroagregata sestavljena predvsem iz ogljikovih hidratov z manjšim deležem alifatske komponente (Kovač in sod., 2002).

2.2.2.2 Biološka sestava morskih makroagregatov

Sestava »morskega snega«, ki ga tudi prištevamo k agregatom, je v veliki meri podobna sestavi sluzastih makroagregatov, vendar njegova prisotnost ni neposredno povezana z oblikovanjem sluzastih makroagregatov, saj jih v osnovi sestavljajo polisaharidne fibrile, bakterije, fitoplankton, mineralni delci in biogeni detrit (Kovač, 2005). Pojem »morski sneg« je skupna oznaka za suspendirane, amorfne heterogene kosmiče s premerom vsaj 0,5 mm (Alldredge in Silver, 1988). Agregati morskega snega dajejo zavetje mnogim bakterijam, katerih aktivnost se spreminja in razgrajuje morski sneg/agregate. Organizmi kot so mikroalge, bakterije, flagelati in migetalkarji (ciliati) naseljujejo »morski sneg« v

koncentracijah, ki so višje od tistih v okoliški vodi. Podobno kot makroagregati so pomembni za regulacijo vertikalne razporeditve in transport suspendirane snovi v vodnem stolpcu. Njihova prisotnost pa ne vodi vedno v pojav sluzenja morja (Kovač, 2005).

Glavne značilnosti morskih makroagregatov so:

- bakterije so dominantne glede na število;
- diatomeje so dominantni evkarionti;
- polisaharidne fibrile so glavna komponenta matriksa sluzi;
- fibrile očitno izvirajo večinoma iz alg, vendar znaten del matriksa izvira tudi iz bakterij;
- prisotni so različni tipi mineralov;
- ni povezave med trofičnim stanjem vode in splošnim videzom ultrastrukture makroagregatov (Heissenberger in sod., 1996).

Večino mase agregatov severnega Jadrana predstavlja amorfna sluzasta snov. V sluzi najdemo veliko število diatomej (*Cylindrotheca closterium*, *Cyclotella* sp., *Pseudonitzschia pseudodelicatissima*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros* sp., *Cerataulina pelagica*, *Thalassiosira* sp., *Leptocylindrus danicus*, *Rhizosolenia alata*), bakterij, organskih ostankov (npr. usedlina alg, fragmenti bakterijskih celičnih sten in delci zooplanktona) in anorganskih ostankov (npr. fragmenti diatomejskih frustul ali delci glin). Biološka sestava sluzastih makroagregatov severnega Jadrana je lahko različna glede zastopanosti vrst in stopnje razgrajenosti prisotnih celic. Razlikuje se glede na »starost« makroagregatov in znotraj različnih delov matriksa makroagregatov. V svežih vzorcih žive celice prevladujejo nad delno razgrajenimi in njihovimi anorganskimi ostanki (frustulami). Ti prevladujejo v vzorcih starejših bolj zrelih makroagregatov (Kovač in sod., 2005).

2.2.3 Mikroorganizmi in morski makroagregati

V makroagregatih je prisotnih precej več bakterij (še posebej v bolj zrelih) kot v okoliški morski vodi. V morski vodi je običajno gostota bakterij 10^5 – 10^6 /mL. V makroagregatih pa

lahko doseže celo 10^8 – 10^9 /mL (Šolić in Krstulović, 2000). Eksperimenti *in vitro* so pokazali, da je bila hitrost rasti bakterij v začetni fazi kolonizacije visoka, počasna pa v kasnejših fazah razvoja bakterijske združbe na agregatih (Grossart in Simon, 1998).

Visoka metabolna aktivnost in respiracija mikroorganizmov povezanih z agregati lahko vodi do anoksičnih mikrocon v sluzastih makroagregatih. Zato so lahko znotraj večjih agregatov prisotne anoksične mikrocone, kjer potekajo anaerobne procesi v sicer oksičnem vodnem stolpcu (Grossart in Simon, 1998).

Dinamika populacije mikrobov je kompleksna in odvisna od različnih dejavnikov: stopnje vezave, cepitve, rasti in smrti v mikrobni populaciji, ki je odvisna od gibljivosti organizmov, dinamike tekočine v okolju agregata ter kompleksnosti intra- in interspecifičnih interakcij med organizmi (paša, kompeticija ter intra- in interspecifična komunikacija, npr. quorum sensing). Bakterijska biomasa je hrana za bakteriovore. Podobno lahko iz delcev agregatov sproščena DOM postane pomemben substrat za prostoživeče bakterije (Kiørboe in sod., 2003).

Avtotrofno biomaso, prisotno v sluzastih agregatih, sestavlja večja frakcija cianobakterij, kar kaže na njihovo pomembnost pri celotni primarni produkciji med daljšimi pojavi sluzenja. Med pojavom sluzenja v severnem Jadranu lahko cianobakterije na površini vodnega stolpca predstavljajo večji delež hrane pri hranjenju bakteriovorov kot heterotrofne bakterije (Fuks in sod., 2005).

Fitoplanktonske celice so znane po tem, da sproščajo polisaharide v zunanji medij; ta eksudat je največji med stacionarno fazo rasti in se povečuje pri pomanjkanju hranil. Med naravnim cvetenjem fitoplanktona lahko ekstracelularni produkti alg stimulirajo bakterijsko rast in aktivnost, kar vodi h kompletni mineralizaciji snovi alg (Guerrini in sod., 1998). Lahko pride do kompeticije med heterotrofnimi bakterijami in fitoplanktonom za hranila. Rast cianobakterij je večja pri nižji vsebnosti hranil, ko lahko bolje izkoristijo dostopna hranila kot večji avtotrofi (Fuks in sod., 2005).

Pojavi sluzi lahko precej spremenijo razmerja med cianobakterijami in heterotrofnimi bakterijami. Okoliške vode med pojavi sluzi postanejo precej oligotrofne, verjetno zaradi cikla organske produkcije in remineralizacije, kar se dogaja predvsem znotraj agregatov. Te razmere so ugodnejše za rast cianobakterij kot za heterotrofne bakterije in večje avtotrofe, zato te postanejo glavni vir hrane za nanoflagelate (Fuks in sod., 2005).

Odnosi med posameznimi organizmi v sluzastih agregatih so zapleteni. Najpogostejše povezave mikrob – mikrob so bakterija – bakterija in bakterija – alga, z algami je ponavadi povezana diatomeja. Medtem ko so bakterije ponavadi prisotne kot posamezne celice v mešanih skupnostih, so opazili tudi ločene kolonije. Prisotne so tudi povezave virus – virus in virus – bakterija.

Heterotrofne bakterije lahko povečajo agregacijo delcev in stabilizirajo obstoječe agregate s produkcijo eksopolimerov. Glede na njihovo obnašanje so opisali 3 funkcionalne tipe bakterij:

- bakterije, ki so specializirane za kolonizacijo delcev (»particle specialist«);
- prostoživeče bakterije in
- bakterije, ki lahko rastejo v suspenziji, kot tudi na delcih (»generalists«).

Prevlada enega funkcionalnega tipa bakterij lahko kaže na specifične interakcije med skupnostmi bakterij in alg med cvetenjem fitoplanktona.

Heterotrofne bakterije so pomembne za kopičenje fitoplanktonskih celic, posebej morskih diatomej. Bakterije, ki kolonizirajo morske diatomeje, proizvajajo velike količine eksopolimernih snovi, ki povečajo lepljivost in kopičenje fitoplanktonskih celic. Bakterije pogosto tvorijo kolonije zakopane v organskem matriksu. Te mikrokolonije povezujejo posamezne celice alg med seboj in na ta način tvorijo agregate (Grossart in sod., 2006).

2.2.4 Razgradnja sluzastih makroagregatov

2.2.4.1 Razgradnja na splošno

Bakterije so glavni razkrojevalci primarno sintetizirane organske snovi v vodnem sistemu. Dekompozicija organske snovi je istočasno proces izpiranja, razgradnje in porabe. Takoj po odmrtnosti sledi faza izpiranja, ko se v vodo sprostijo topne snovi, ki jih porabijo mikroorganizmi (mineralizacija). Ta faza je ponavadi kratka, druga, v kateri predvsem zaradi delovanja mikroorganizmov poteka razgradnja, pa je ponavadi daljša. Ker so nekatere snovi težje razgradljive (npr. lignini, agar) se sestava suspendirane snovi spremeni. V končni fazi se razgradijo težko razgradljive organske snovi. V vseh fazah razgradnje paša mikroorganizmov pospeši razgradnjo organske snovi hkrati z njeno porabo (Stopar in sod., 1999).

Biopolimeri makroagregatov so izpostavljeni mikrobnim in različnim kemičnim pretvorbam: razgradnja – rekondenzacija, kondenzacija – polimerizacija z drugimi nizkomolekularnimi komponentami in fotokemična pretvorba (Kovač in sod., 2004).

Nedavne študije so pokazale, da tonjenje agregatov močno olajša difuzijo kisika v agregate. Rezultat je do devetkrat višja koncentracija kisika znotraj agregata v primerjavi z agregati, ki so zasidrani na trdni površini (Ploug in sod., 1999). Tok mimo tonečih agregatov je torej pomemben za njihovo kemično mikrookolje in za rastne pogoje mikrobne skupnosti. Agregati severnega Jadrana pa se ponavadi kopičijo v sloju piknokline (ter v drugih območjih faznih mej), lahko pa so tudi (poleti) bolj ali manj omejeni na vodne mase v severnem delu Jadranskega morja, ko kroženje morskega toka v nasprotni smeri urinega kazalca loči te vodne mase od ostalega Jadrana (Kaltenböck in Herndl, 1992).

Če je čas kroženja ogljika enak v vseh agregatih, ne glede na velikost, je stopnja remineralizacije ogljika v agregatih odvisna od zadrževalnega časa agregatov v vodnem stolpcu, ki je prav tako odvisen od kopičenja, čiščenja in procesov razgradnje (Ploug in sod., 1999).

2.2.4.2 Razgradnja glavnih komponent sluzastih makroagregatov

Časovne spremembe sestave makroagregata kažejo izrazito zmanjšanje vsebnosti polisaharidov zaradi mikrobne in fotokemične razgradnje, ki cepi glikozidne vezi. V sestavi makroagregatov se med staranjem (in razgradnjo) kaže relativno povečanje odstotka organosilicijevih komponent in alifatskih komponent vezanih na ogljikove hidrate preko estrskih in amidnih skupin. Med razgradnjo se povečuje tudi razmerje med alifatskimi strukturami in ogljikovimi hidrati, kar kaže na ohranjanje lipidne/alifatske komponente (Kovač in sod., 2002; Kovač in sod., 2006).

Ogljikovi hidrati predstavljajo najpomembnejšo komponento sluzastih makroagregatov. V morskem sedimentu in na površini morja izvirajo iz kopenskih in morskih materialov. Sestava polisaharidov morskega planktona je zelo variabilna v času in prostoru. Sestava nevtralnih monosaharidov v morski vodi je precej nespremenljiva, prevladujeta glukoza in fruktoza. Fruktoza lahko delno izvira iz glukoze. V morju lahko ogljikove hidrate razdelimo na podlagi filtracije na: 1) suspendirane ($> 0,2 \mu\text{m}$), npr. komponente v živem fito- in zooplanktonu in bakterijah, prav tako kot tudi v mrtvih in razpadajočih organizmih ali planktonskih ostankih; in 2) raztopljene ($< 0,2 \mu\text{m}$), npr. proste sladkorje ali monomere in sestavljene sladkorje v obliki nizko do visokomolekularnih polimerov. Visoka stopnja variabilnosti je očitno odvisna od naravne variabilnosti planktonske populacije, kar ni popolnoma nepričakovan rezultat (Cowie in Hedges, 1984).

Analize ogljikovih hidratov v vzorcih sluzi so pokazale visoke koncentracije celotnih raztopljenih ogljikovih hidratov in polisaharidov v intersticijski vodi sluzi in okoliški vodi (Penna in sod., 2003). Za oblikovanje sluzastih makroagregatov so predvsem pomembne višje koncentracije raztopljenih polisaharidov, ki lahko agregirajo in tvorijo zamreženo strukturo makrogelov. Med upadom samega pojava sluzenja zasledimo zmanjšanje koncentracij raztopljenih polisaharidov. V času sluzenja morja ostaja koncentracija monosaharidov približno na isti ravni kot v opazovani morski vodi brez sluzi.

Predhodni podatki kemijske strukture makroagregatov razodevajo, da so sestavljeni iz heteropolisaharidov (od katerih je 1/3 vodotopnih) in dolgih polimetilenskih verig vezanih

na monosaharidne enote preko karboksilne skupine tvorijo zamreženo strukturo. Sestavljeni so iz nevtrálnih monosaharidov: glukoza, manoza, fruktoza, galaktoza, arabinoza, riboza, ksiloza in fukoza (razvrščene so po padajočih koncentracijah). Primarni vir ogljikovih hidratov makroagregatov v severnem Jadranu naj bi bili fitoplanktonski izločki in strukturni polisaharidi, za katere menijo, da so v sestavi podobni sluzi fitoplanktona.

Razmerje CHO/acetat v makromolekularnih izločkih mikroalg se med razgradnjo znižuje podobno kot v polisaharidnih strukturah v morski UDOM. To kaže, da se komponente ogljikovih hidratov, ki niso vezane na alifatske strukture razgrajujejo hitreje kot tiste, ki so vezane na alifatske strukture preko estrskih in amidnih vezi. To kaže na približno trikratno zmanjšanje vsebnosti glukoze skozi čas, ki je verjetno kot posledica hidrolize rezervnih glukozov in drugih polisaharidov, ki niso vezani na alifatske strukture. Razgradnja se nadaljuje z mikrobnimi in fotokemičnimi procesi. Heteropolisaharidi, ki so vezani na alifatske strukture so zato bolj odporni proti razgradnji in obe strukturni komponenti se razgrajujeta sočasno. Ta opažanja kažejo, da so ti, kljub vezavi polisaharidov na alifatske strukture, do neke mere nestabilni. Obstajajo tudi drugi polisaharidi v makroagregatih, verjetno rezervni glukani, ki se razgrajujejo hitreje (Kovač in sod., 2002).

Dušikove spojine – proteinske snovi v sluzastih makroagregatih pripadajo mikroalgam in v manjši meri drugim mikrobnim (bakterijskih) virom (Kovač in sod., 2004). Sestava aminokislin v makroagregatih je podobna tisti v POM, ki izvira iz planktona v Tržaškem zalivu, kar kaže, da so aminokisliline večinoma vezane v proteinih celic (Faganeli in sod., 1995). Raziskave kažejo, da se del labilnega oziroma lažje razgradljivega organskega dušika skozi razgradnjo makroagregatov ohranja. Proteinski material se lahko ohranja preko »enkapsulacije« v makromolekularnem matriksu ali/in zaradi sorpcije na mineralno komponento. Lahko pa v prvi fazi poteče razgradnja proteinske snovi in produkcija bioorganskih ostankov, ki nato reagirajo z drugimi akumuliranimi organskimi komponentami do težje razgradljive snovi. To vodi tudi do bolj kompleksne in zamrežene strukture makroagregatov.

Alifatska komponenta (lipidi) – lipidni material makroagregatov večinoma izvira iz lipidov alg, medtem ko je bakterijski izvor manj pomemben. Spektroskopske analize kažejo na manjšo razvejanost alkilnih verig, ki so značilne za lipide mikroalg. Za lipide bakterij so značilne bolj razvejane alkilne verige (Kovač in sod., 2002).

Lipidi lahko prav tako sodelujejo pri kondenzaciji pretvorbenih produktov proteinov in polisaharidov v zamreženo strukturo makroagregatov. Pri razgradnji makroagregatov prevladuje predvsem razgradnja ogljikovih hidratov kar vodi do relativnega povečanja in ohranitve alifatske (lipidne) komponente (Kovač in sod., 2004). Stabilnost alifatskih struktur je verjetno povezana s stabilnostjo planktonskih celičnih sten in izločkov alg.

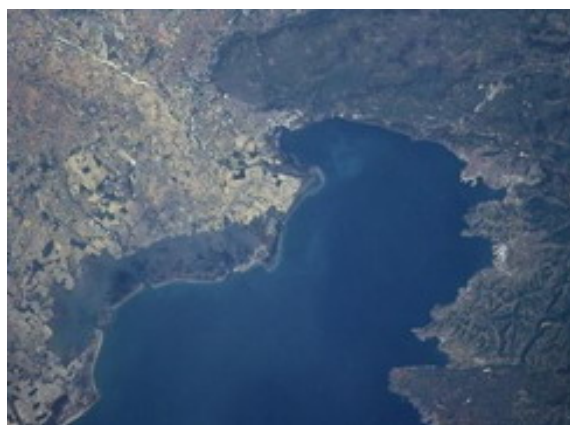
3 MATERIALI IN METODE

3.1 ORIS PODROČJA RAZISKAVE

Jadransko morje leži v smeri jugovzhod–severozahod in sega na jugu do 40° , na severu pa do $45^{\circ} 45'$ severne geografske širine. Dolgo je 783,3 km, široko pa v povprečju 157,4 km. Severni del morja je zelo plitev, med južno obalo Istre in Riminijem redko preseže globino 50 m. Slanost Jadranskega morja z 38,3 PSU presega povprečje Sredozemskega morja; v severnem delu (Beneški zaliv) je zaradi pritoka reke Pad nekoliko nižja kot v osrednjem in južnem delu (http://sl.wikipedia.org/wiki/Jadransko_morje).



a)



b)

Slika 3: Geografska lega a) Jadranskega morja; b) Tržaškega zaliva (Vir: NASA)

Tržaški zaliv (slika 3b), skrajni severni del Jadrana, je plitvo robno morje, ki je s treh strani omejeno s kopnim. Vključuje Tržaški, Miljski, Koprski in Piranski zaliv. Obsega približno 570 km^2 . Obalna črta Tržaškega zaliva je dolga približno 130 km. Le malokje je Tržaški zaliv globlji od 25 m, povprečna globina je 16 m, najgloblja točka pred rtom Madona pri Piranu pa doseže 37,5 m (Orožen Adamič, 2002).

Značilnosti vodnih mas Tržaškega zaliva so v veliki meri odvisne od pritokov večjih in manjših rek. Največji sladkovodni vnosi so v severozahodnem delu zaliva. Vnosi na

slovenski strani v jugovzhodnem delu so mnogo manjši. Slovenski pritoki v Tržaški zaliv so naslednji: v Koprski zaliv pritekata Rižana in Baševica, v Piranski zaliv pa Drnica in Dragonja, vse skupaj pa letno v povprečju ne presežejo pretoka $10 \text{ m}^3/\text{s}$, vendar pa je zaradi njihove hudourniške narave pretok močno pogojen s padavinami – ob nevihtah se lahko pretok poveča za več kot 10-krat. Soča je največja in najpomembnejša reka, ki se izliva v Tržaški zaliv. Njen povprečni pretok je $200 \text{ m}^3/\text{s}$ in je tudi glavni vir dušika (N), fosforja (P) in silicija (Si) v Tržaškem zalivu.

Sezonske variacije rečnih dotokov in pojav vetra (burja in jugo) vplivajo na cirkulacijski režim celotnega severnega Jadrana in s tem Tržaškega zaliva. Morski tok v Tržaškem zalivu je usmerjen v obratni smeri teka urinih kazalcev. Njegova povprečna hitrost je $0,8$ vozla. Bibavica v Tržaškem zalivu je sicer med največjimi v Jadranskem morju, kljub temu pa razlika med plimo in oseko ponavadi ni večja od 60 cm , v izjemnih razmerah (nizek zračni tlak ob plimi ter daljše obdobje juga) pa je lahko tudi večja. Močni JZ vetrovi in visok zračni tlak v srednjem Jadranu lahko dvignejo gladino morja v zalivu do 1 m .

Slanost v zalivu je tipično morska in znaša od 33 do $38,5 \text{ PSU}$ v površinski plasti in od 36 do $38,5 \text{ PSU}$ pri dnu. Sezonsko nihanje površinske slanosti se odraža v nižjih vrednostih pozno spomladi s povečanim rečnim dotokom zaradi taljenja snega v Alpah, ko je redkejša plast porazdeljena po celotnem rezervoarju. Pozimi ima hladna vodna masa visoko gostoto ($\rho_T = 30$). Slojevitost na račun slanosti in temperature oziroma gostote – nastanek termokline in piknokline – je pogosto vzrok za nastanek hipoksije (včasih tudi anoksije) pri dnu. Močni vetrovi lahko v nekaj dneh premešajo celotni vodni stolpec ter tako za nekaj dni do nekaj tednov povečajo izmenjavo vodne mase in hranil. Tržaški zaliv je podvržen izdatnemu temperaturnemu nihanju. Ker se poleti močno segreje (do $26 \text{ }^\circ\text{C}$ in več), pozimi pa precej ohladi (do $9 \text{ }^\circ\text{C}$), je v tem pogledu ekstremni del Jadrana.

Povečan sezonski dotok sladke vode z rekami pomeni tudi povečan dotok hranilnih snovi, še posebej nitrata in silikata. Odvisen pa je od sezonske spremenljivosti sladkovodnih pritokov in obilnejših padavin, zato se lahko koncentracije hranil v vodi lahko močno spreminjajo. Koncentracija hranilnih snovi je spomladi in jeseni najvišja v površinski plasti, poleti pa v plasti pri dnu – pod termoklino. Večja količina razpoložljivih hranilnih

snovi pomeni povečanje biomase in primarne produkcije ter v nekaterih primerih posledični nastanek makroagregatov.

Vsi prej omenjeni dejavniki skupaj prispevajo tudi k sami raznolikosti procesov pri nastajanju makroagregatov ter s tem neposredno vplivajo na razlike v sestavi posameznih makroagregatov in na kompleksnost njihove strukture. Velika spremenljivost pa se kaže tudi v taksonomski strukturi fitoplanktonske združbe. Prisotna sta značilna fitoplanktonska viška fitoplanktonske biomase v spomladanskih (maj, junij) in jesenskih (november) mesecih.

3.2 VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCA

3.2.1 Vzorčenje

Vzorce smo odvzeli dne 1. 7. 2004 pri oceanografski boji (slika 3) Morske biološke postaje, ki je locirana s koordinatami $45^{\circ} 32' 55,68''$ N, $13^{\circ} 33' 1,89''$ E, tj. približno 1,23 nM (2,28 km) od Piranskega rta v smeri proti Gradežu. Vzorec je bil odvzet na globini 11–12 m s črpalko s polietilensko posodo. Temperatura morja je bila 24°C . Vzorec je bil kompakten, sluzast oz. želatinast.



Slika 4: Lokacija vzorčenja v Tržaškem zalivu (vir: Morska biološka postaja Piran, 2008)

3.2.2 Priprava vzorcev in potek eksperimenta

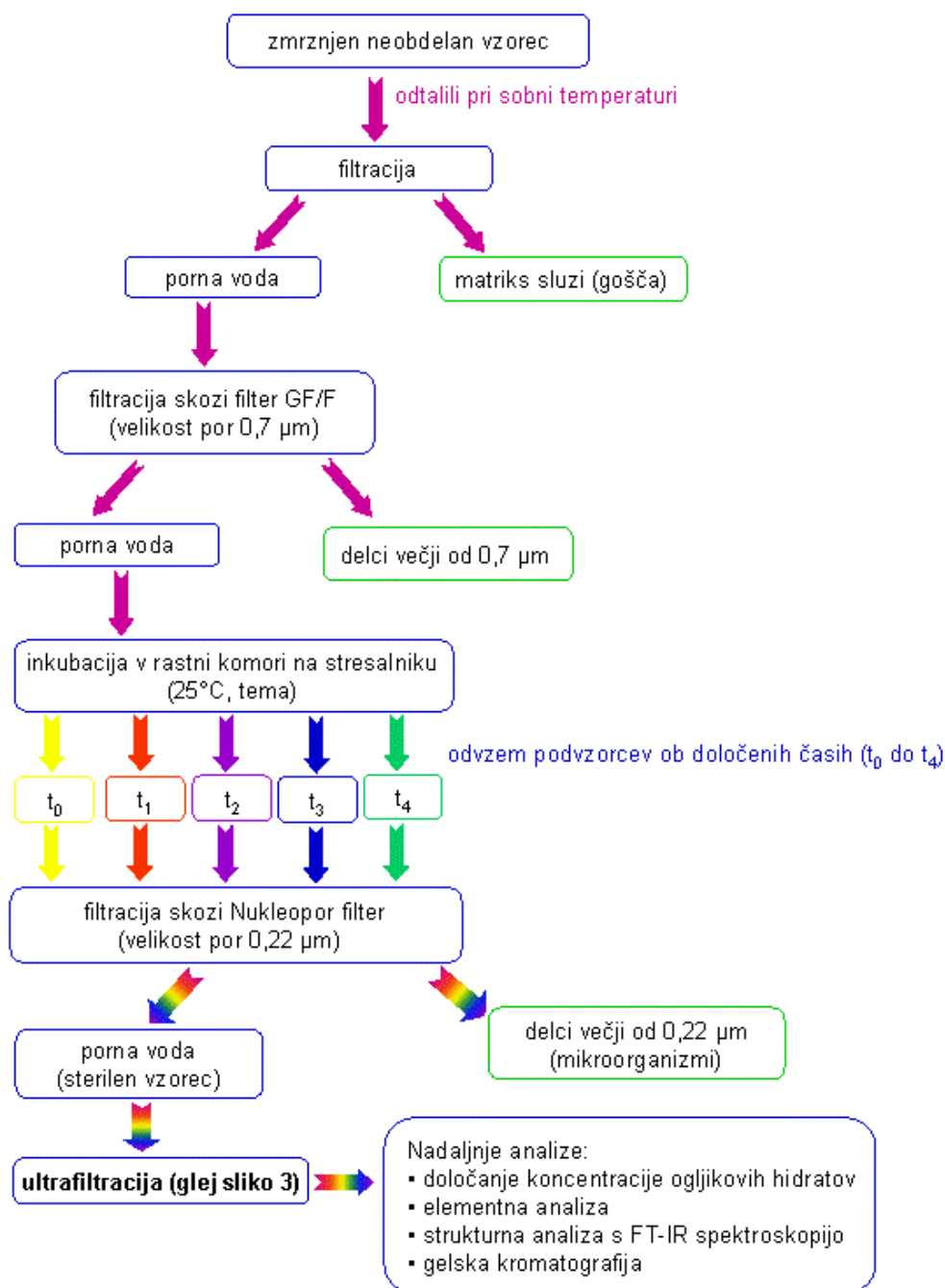
Do začetka eksperimentalnega dela je bil vzorec shranjen v vrečkah v zamrzovalniku pri -36°C . Vzorec smo nato odtalili pri sobni temperaturi. Prostornina odtaljenega vzorca, sestavljenega iz intersticijske vode in matriksa sluzi oz. gošče, je bila približno 2500 mL. Vzorec je bil videti sluzast, želatinast, rumenkaste barve. S pomočjo cedila in planktonske mrežice smo matriks sluzi oz. goščo ločili od intersticijske vode. Matriks sluzi je bil kompakten želatinast oz. sluzast, rumenorjavo-zelene barve. Intersticijska voda je bila

prozorna rahlo rumenkasto obarvana, v njej pa je bilo opaziti majhne kosme bele barve. Matriks služi s cedila in planktonske mrežice smo shranili v posodice, jim določili maso in volumen ter jih shranili v zamrzovalniku pri $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$. Volumen intersticijske vode po filtraciji skozi cedilo in planktonsko mrežico je bil približno 2200 mL.

Nadalje smo s pomočjo vakuumske črpalke intersticijsko vodo prefiltrirali skozi stekleni mikrofibrilni filter GF/F (Whatman) s premerom por $0,7\text{ }\mu\text{m}$, s pomočjo vakuumske črpalke, da smo odstranili delce, večje od $0,7\text{ }\mu\text{m}$. Filtre smo dali v posodice in jih shranili v zamrzovalniku pri $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$. Filtrat filtra GF/F, ki je še vedno vseboval mikroorganizme, potrebne za spremljanje naravne mikrobne razgradnje organske snovi v intersticijski vodi smo nato za 4 tedne dali v inkubacijo v rastni komori v temi na stresalniku pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzeli smo podvzorce v času:

- t_0 – ob začetku inkubacije,
- t_1 – po enem tednu inkubacije,
- t_2 – po dveh tednih inkubacije,
- t_3 – po treh tednih inkubacije,
- t_4 – konec inkubacije po štirih tednih.

Posamezen odvzeti podvzorec smo nato filtrirali skozi filter Nucleopor z velikostjo por $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Tako naj bi odstranili vse mikroorganizme iz vzorca in dobili »sterilen« vzorec intersticijske vode morskih makroagregatov. Sledila je ultrafiltracija z Vivascience VivaFlow 200 (Sartorius) in membransko črpalko MasterFlex L/S (Cole-Palmer Instrument Co.). Shematski prikaz priprave vzorca in poteka eksperimenta podajata sliki 5 in 6.



Slika 5: Shema poteka eksperimenta

3.2.2.1 Ultrafiltracija

Intersticijsko vodo smo ultrafiltrirali skozi naslednje membrane v vrstnem redu: 30000 MWCO, 10000 MWCO, 5000 MWCO (Molecular Weight Cut Off). Po vsaki izvedeni ultrafiltraciji smo membrano sprali s 25 mL destilirane vode. Prvo ultrafiltracijo z membrano z velikostjo por 30000 MWCO smo označili z UF1 (ultrafiltracija 1), drugo ultrafiltracijo z membrano z velikostjo por 10000 MWCO smo označili z UF2 (ultrafiltracija 2), tretjo ultrafiltracijo skozi membrano z velikostjo por 5000 MWCO pa smo označili z UF3 (ultrafiltracija 3). Po posamezni ultrafiltraciji smo dobili dve frakciji: permeat (označili smo ga s črko F) in koncentrat (označili smo ga s črko O).

Permeat predstavljajo frakcije:

- UF1/F → pod 30000 MWCO,
- UF2/F → pod 10000 MWCO in
- UF3/F → pod 5000 MWCO.

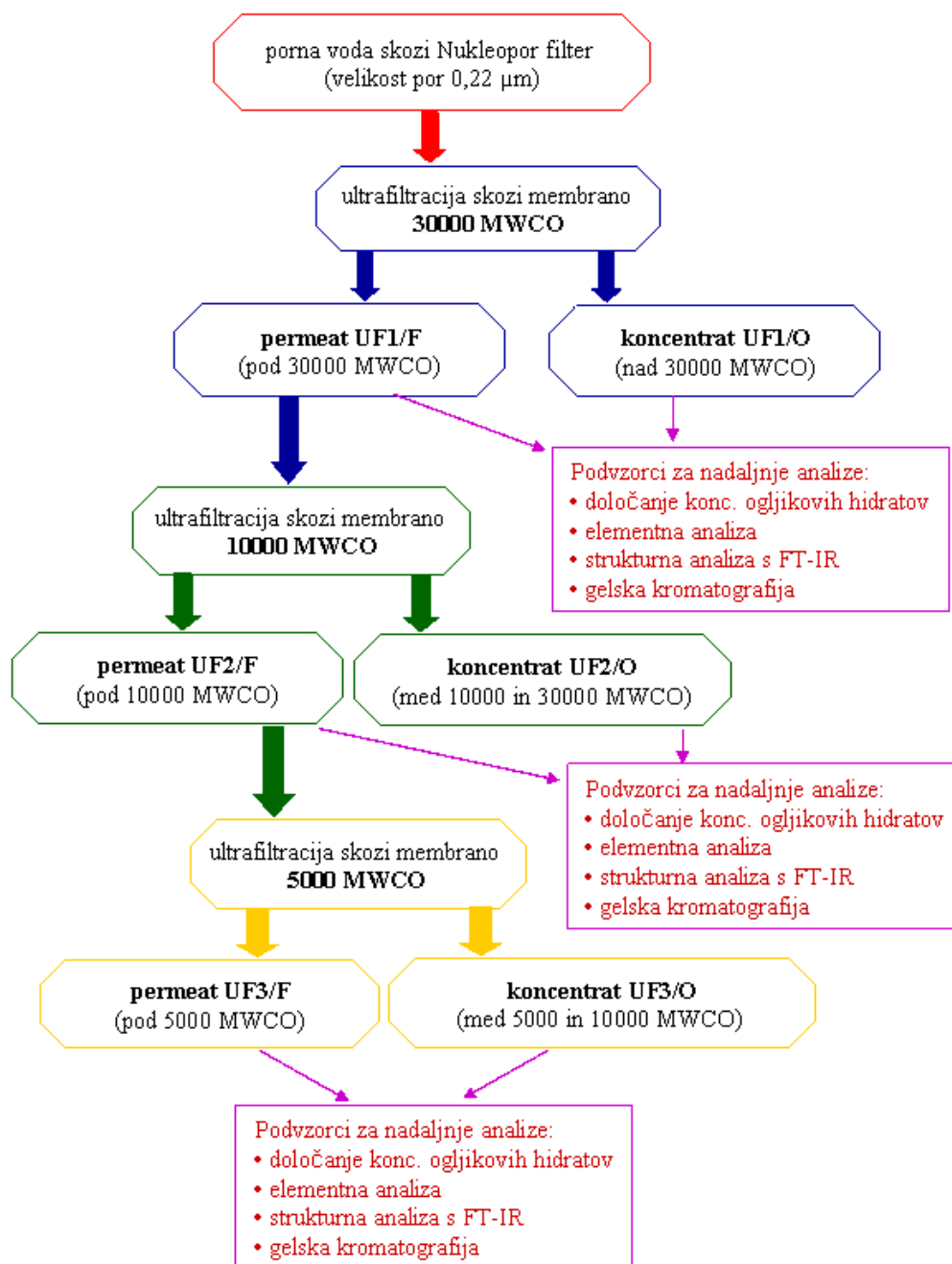
Koncentrat pa predstavljajo frakcije:

- UF1/O → nad 30000 MWCO,
- UF2/O → med 10000 in 30000 MWCO ter
- UF3/O → med 5000 in 10000 MWCO.

Iz vseh navedenih frakcij smo vzeli podvzorce z določenimi volumni, ki so služili kot vzorci za nadaljnje analize:

- določanje koncentracije ogljikovih hidratov v intersticijski vodi morskih makroagregatov,
- elementna analiza;
- strukturna analiza s spektroskopijo FTIR in
- določanje velikosti ogljikovih hidratov z gelsko kromatografijo.

Pred nadaljnjimi zgoraj naštetimi analizami smo odvzete podvzorce posameznih frakcij hranili v ustrezne posodice in jih hranili v zamrzovalniku pri -36°C . Podvzorce namenjene za elementno analizo in strukturno analizo s spektroskopijo FTIR smo pred nadaljnjo uporabo posušili v liofilizatorju (24 h).



Slika 6: Shema ultrafiltracije

3.3 ANALIZA VZORCEV

3.3.1 Določanje koncentracije ogljikovih hidratov v intersticijski vodi morskih makroagregatov

Za določanje koncentracije ogljikovih hidratov smo uporabili nekoliko modificirano spektrofotometrično metodo za določanje celotnih ogljikovih hidratov po Duboisu in sod. (1956). Merili smo količino ogljikovih hidratov v vseh podvzorcih vzetih v času inkubacije vzorca v rastni komori po njihovi ločitvi s pomočjo ultrafiltracije na frakcije naštete zgoraj.

Vzeli smo 1 ml posamezne frakcije vsakega podvzorca, mu dodali 1 ml 5 % fenola in 5 ml 95–97 % H_2SO_4 . Po 20 min se je razvilo rumeno-oranžno obarvanje, ker pride med ogljikovimi hidrati in H_2SO_4 do dehidracije, kjer iz pentoz nastane furfural, iz heksoz pa hidroksifurfural. Pri reakciji s fenolom nato tvorijo nastali furfurali (aldehidi) značilno rumeno-oranžno obarvanje. Raztopino smo nato dobro premešali in izmerili absorbanco v kivetih 1 cm pri valovni dolžini $\lambda = 490 \text{ nm}$. Za slepo probo smo uporabili 1 ml destilirane vode, ki smo ji dodali reagente: 1 ml fenola in 5 ml 95–97 % H_2SO_4 . Za izdelavo umeritvene krivulje (priloga A1) smo kot standard uporabili različne koncentracije β -D-glukoze (proizvajalec "Sigma", ZDA).

3.3.2 Elementna analiza

Pri elementni analizi vzorcev smo določali vsebnost organskega ogljika in celotnega dušika. Uporabili smo srebrne kapsule dimenzij 4 x 6 mm. Vanje smo natehtali okoli 3 mg posameznega liofiliziranega vzorca. Vzorce smo nato, še pred analizo, nakisali s HCl. Tako smo odstranili karbonatni ogljik v obliki CO_2 . Ko po dodatku kisline nismo več zaznali mehurčkov, je bilo jasno, da je bil ves karbonatni ogljik odstranjen. Vsebnost organskega ogljika in celotnega dušika v vzorcih smo nato določili z elementnim CHN-analizatorjem (Carlo Erba Instruments, EA 1108) pri temperaturi 1020 °C, umerjeni s sulfanilamidom (s teoretičnimi vrednostmi C – 41,82 %, H – 4,6 %, N – 16,27 %, O – 18,58 %, S – 18,62 %).

3.3.3 Strukturna analiza s spektroskopijo FTIR

Infrardeča spektroskopija FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) se uporablja za določanje kemične sestave in strukture določene snovi. Temelji na fotonih infrardeče svetlobe z valovnimi dolžinami med 2,5 in 50 μm , ki imajo dovolj energije za vzbujanje nihanj atomov v molekulah. Število možnih nihanj z velikostjo molekul hitro narašča. Pri nihanju prihaja do spremembe kota med vezmi v molekuli oz. do spremembe dolžine vezi med posameznimi atomi v molekuli. Jakost absorpcije infrardeče svetlobe je sorazmerna spremembi dipolnega momenta skupine (oz. molekule), ki to svetlobo absorbira. Pri analizi FTIR dobimo absorpcijske trakove posameznih tipov vezi oz. funkcionalnih skupin (tipov vezi), ki so prisotne pri analiziranem vzorcu in se pojavljajo v čisto določenih območjih spektra. V določenih območjih IR-spektra se pojavlja zelo veliko število absorpcijskih trakov (posledica različnih funkcionalnih skupin), zaradi česar je njihova določitev včasih nekoliko težavna. Zato za natančnejše določanje strukture snovi uporabljamo spektroskopijo FTIR v kombinaciji z analiznimi metodami: drugimi spektroskopskimi metodami (NMR, UV-VIS, MS), plinsko in tekočinsko kromatografijo, rentgensko difrakcijo, mikroskopskimi tehnikami ipd. (Kovač in sod., 2002).

Infrardeče spektre FTIR liofiliziranih podvorcev zgoraj naštetih frakcij smo posneli s spektrometrom Perkin-Elmer Spectrum One z uporabo KBr. Uporabili smo zmes 30 mg KBr in 1,5 mg posameznega liofiliziranega podvzorca. Spektre FTIR smo snemali v območju 4000–450 cm^{-1} .

3.3.4 Gelska kromatografija (HP SEC)

Za ločevanje posameznih molskih mas sladkorjev smo uporabili kromatografijo HP SEC (velikostna izključitvena kromatografija visoke ločljivosti; ang. high performance – size-exclusion chromatography). Tehnika HPLC nam omogoča ločevanje substanc na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave in velikosti molekul na nosilcih in v kolonah, ki zdržijo visoke delovne tlake. Ker je izločitveni volumen (void volumen, V_0) – to je prazen prostor med delci nosilca – zelo majhen, se tako prepreči velika razredčitev vzorca, ki ga

ločujemo. Volumen nanesenega vzorca je ponavadi le 0,01–0,1 mL. Prednost HPLC pred klasično kolonsko kromatografijo je v hitrih ločitvah, veliki ponovljivosti in veliki občutljivosti detekcije. Pomembno je, da mobilno fazo predhodno odzračimo (ultrazvočna kopel), ker prisotnost zračnih mehurčkov poslabša ločljivost in onemogoči detekcijo eluiranih snovi. Mobilno fazo skozi kolono pri tej kromatografiji poganja črpalka, ki ustvarja delovni tlak med 250 in 400 bar. Vzorec vbrizgamo na kolono z injekcijsko iglo preko injektorja z zanko definirane velikosti. UV-absorpcijo v eluiranih frakcijah detektiramo z UV-detektorjem (Slapar, 2001).

Velikostna izključitvena kromatografija visoke ločljivosti (SEC; Size-exclusion Chromatography) v kombinaciji z visokotlačno kromatografijo omogoča podrobne meritve porazdelitve molskih mas, kar vodi k lažji primerjavi teh porazdelitev med vzorci, in jo lahko izvajamo z manjšimi volumni vzorcev. SEC ima nekaj značilnih pomanjkljivosti. Interakcije med materiali kolone in molekulami analita lahko vplivajo na določitev porazdelitve molekulskih mas znotraj vzorca. Ionska moč in pH pufru lahko znatno vplivata na porazdelitev molekulske mase s pospeševanjem agregacije/deagregacije in zavijanjem/odvijanjem makromolekul ter spremembe pri interakcijah z materialom v koloni. SEC je bil večinoma bolj priljubljen za karakterizacijo koloidne in raztopljene organske snovi v sladkovodnih sistemih, kljub temu pa so ga uporabili v nekaterih morskih vzorcih (Minor in sod., 2002).

Za HP SEC smo uporabili dve koloni: (1) TSKgel G3000SW (TosoHaas), napolnjeno z rigidnim sferičnim silikatnim gelom, ki je s kemijskimi vezmi povezan s hidrofilnimi sestavinami in dekstrane (sladkorje) ločuje v območju M_r od 2000 do 70000; (2) Superdex 75 10/300 GL (Pharmacia), napolnjeno z dekstranom in 12-odstotno zamreženo agarozo, ki dekstrane (sladkorje) ločuje v območju M_r od 500 do 30000. Namestili smo zanko z volumnom 100 μ L. Pred kolono TSKgel G3000W smo namestili še predkolono TSKgel SW Guardcolumn (TosoHaas), pred kolono Superdex 75 10/300 GL (Pharmacia) pa predfilter s premerom por 0,22 μ m. Za pripravo pufru smo uporabili substance ultračiste kakovosti. Pripravljen pufer 30 mM Tris (z dodatkom 1 mM DTT), umerjen na pH 8, smo filtrirali skozi filter Millipore s premerom por 0,45 μ m in odzračevali 20 min z vodno črpalko ter 5 min v ultrazvočni kopeli. Kolono smo pred nanosom standardov oz. vzorcev

spirali s prej omenjenim pufrom, ki je predstavljal mobilno fazo. Črpalka za pufer (mobilno fazo) je bila Merck Hitachi, LaChrom L-7100. Pretok skozi kolono je bil vseskozi naravnani na 0,75 ali 1,0 ml/min. Za standardizacijo kolone smo uporabili Polysaccharide Calibration Kit SAC-10 (Polymer Laboratories) s pululanskimi standardi z velikostmi molekulskih mas, $M_p = 708000, 375000, 200000, 107000, 47100, 21100, 11100, 5900, 667$ in 180 Da. Standarde smo pripravili tako, da smo natehtali 0,75 mg posameznega standarda in dodali 0,5 mL destilirane vode (mili Q). Počakali smo, da je standard nabrekli ter ga nato rahlo premešali in tako razpršili polimere pululanskega standarda. Raztapljanje posameznega standarda traja več ur, zato smo pustili raztopino stati 12–24 ur (čez noč) na sobni temperaturi brez mešanja, da smo preprečili lomljenje verig polimerov. V ta namen smo zatehtali 0,01 g standarda in mu dodali 20 mL destilirane vode. Raztapljanje je potekalo po zgoraj opisanem postopku.

Po nanosu standarda oz. vzorca na kolono Superdex 75 10/300 GL smo s pomočjo UV-spektroskopije merili absorpcijo posameznih frakcij (glej poglavje 3.2.2). Za merjenje UV absorpcije vzorca smo uporabili UV-absorpcijski detektor Merck Hitachi, LaChrom L-7400. UV-spektroskopija je metoda s katero merimo absorpcijo posameznih molekul v področju UV-spektra (190–335 nm). Zvezo med absorpcijo in uporabljeno valovno dolžino imenujemo absorpcijski spekter. Odvisen je predvsem od kemijske strukture molekul in od okolja, v katerem se molekule nahajajo. Naše meritve smo izvajali pri valovni dolžini 205 nm in 250 nm. Pogoje kromatografije HP SEC (valovna dolžina, pH, dodatek soli...) smo izbrali glede na članek Minor in sod. (2002) in prilagodili glede na svoje izkušnje in odzivnost svojih vzorcev (Preglednica 1).

Preglednica 1: Primerjava eksperimentalnih pogojev uporabljenih pri kromatografiji HP SEC v članku Minor in sod. (2002) in pogojev kromatografije HP SEC, ki smo jih uporabili pri našem eksperimentu

	članek Minor in sod. (2002)	naš eksperiment
vzorci	koncentrirana morska UDOM	ultrafiltrirana intersticijska voda makroagregatov
uporabljena kolona	TosoHaas TSKgel G3000SWx1	TosoHaas TSKgel G3000SW Sephadex 75 10/300 GL
mobilna faza	fosfatni pufer: 0,1M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1M (NH ₄) ₂ HPO ₄ ; pH 7	30 mM Tris pufer (z dodatkom 1 mM DTT) pH 8
standardi	Polysaccharide Standard Kit SAC-10 (Polymer Laboratories)	Polysaccharide Calibration Kit SAC-10 (Polymer Laboratories)
pretok	1,0 mL/min	prva kolona 1,0 mL/min druga kolona 0,75 mL/min
val. dolžina (λ)	205 nm	205 nm, 250 nm
volumen nanesenega vzorca	~ 40 μL	50 μL, 100 μL

4 REZULTATI

4.1 OPIS NEOBDELANEGA VZORCA

Vzorec, odvzet dne 1. 7. 2004 pri oceanografski boji Morske biološke postaje Piran, je bil kremasto rumenkaste barve, zelo kompakten in sluzast.

Pregled vzorcev pod svetlobnim mikroskopom pokaže, da so makroagregati sestavljeni iz osnovnega matriksa sluzi, prisotni pa so tudi različni organski in anorganski delci (npr: fitoplankton, mikrozooplankton, bakterije, mineralni delci, fekalni peletki in ličinke zooplanktona). V sluzastem omrežju pa je mogoče opaziti tudi različne skeletne delce, ostanke različnih živalskih in rastlinskih celic, hitinske oklepe rakcev, prazne frustule diatomej, detritni material odmrlih celic in delce makrofitskih alg.

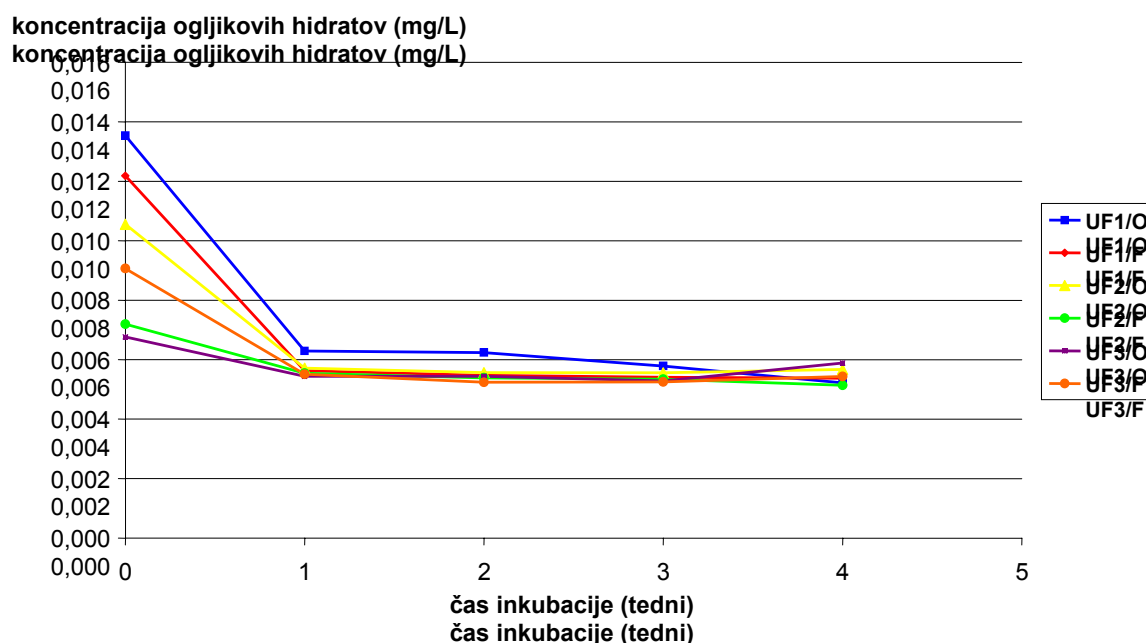
Odtaljeni izhodni neobdelan vzorec smo razdelili na dve frakciji, in sicer matriks sluzi, ki je bil rumenorjave barve, in intersticijsko vodo. Intersticijsko vodo smo po filtraciji (glej poglavje 3.2.2) nadalje uporabili v eksperimentu.

4.2 EKSPERIMENTALNO DELO: POTEK RAZGRADNJE

4.2.1 Spremljanje spremembe koncentracije ogljikovih hidratov v intersticijski vodi morskih makroagregatov med razgradnjo

Ker so ogljikovi hidrati ena izmed glavnih komponent morskih agregatov in hkrati tudi glavni substrat za bakterije, nas je zanimala njihova naravna razgradnja (štiritedenska inkubacija pri 25 °C) v intersticijski vodi morskih makroagregatov (iz leta 2004) (glej poglavje 3.2.2). Mikrobni potek razgradnje makroagregatov je bil že prikazan v diplomski nalogi Mohar (2006) (mikroskopski pregled, cepitev na plošče). Naravni razgradnji smo izpostavili intersticijsko vodo morskih makroagregatov z naravno prisotnimi mikroorganizmi, ki so kot substrat za rast med drugim uporabili raztopljene ogljikove hidrate. Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov skozi čas smo spremljali s

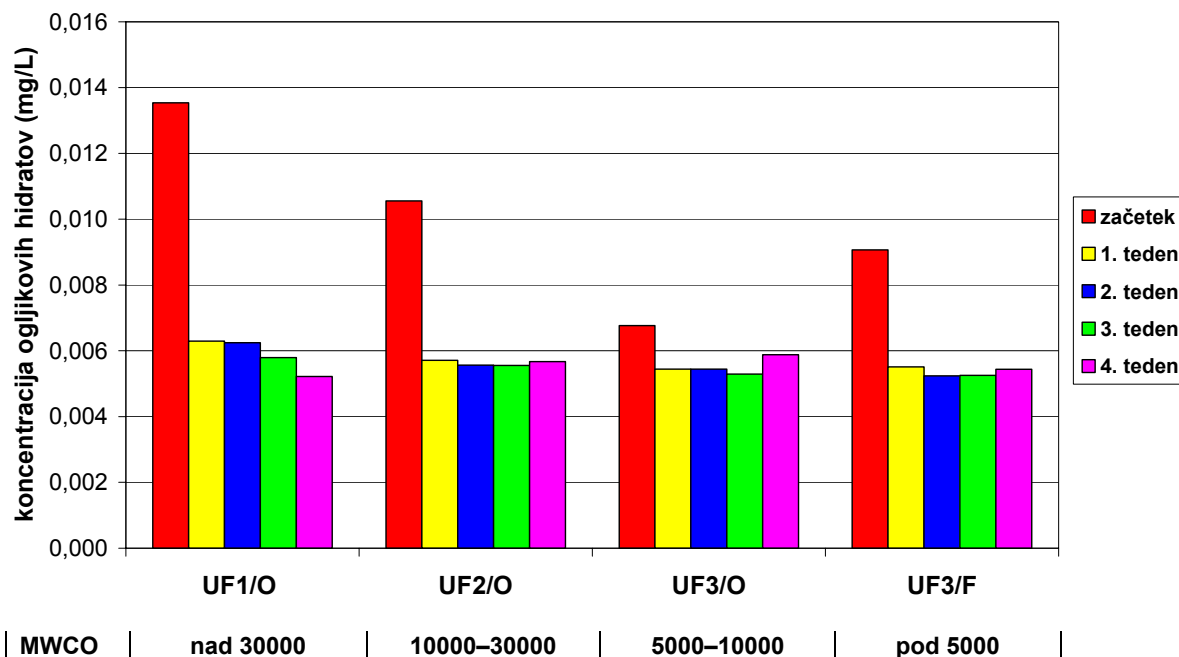
pomočjo tedensko odvzetega podvzorca, ki smo ga nato s pomočjo ultrafiltracije ločili na več frakcij (glej poglavje 3.2.2.1), da bi dobili vpogled v razgradnjo ogljikovih hidratov v različnih velikostnih razredih, kar kaže slika 7. Koncentracije ogljikovih hidratov smo določali z uporabo spektrofometrične metode (Dubois in sod., 1956) in umeritvene krivulje. Analize so bile izvedene v dveh paralelkah. V rezultatih so predstavljene srednje vrednosti vseh meritev. Napaka analitske metode analitske metode s čistimi sladkorji, splošno uporabljane za analizo morskih vzorcev, je $\pm 2\%$ (Dubois in sod., 1956).



Slika 7: Koncentracija ogljikovih hidratov v koncentratih in permeatih po ultrafiltraciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) pri naravni razgradnji v odvisnosti od časa (UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO; UF1/F → frakcija pod 30000 MWCO; UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO; UF2/F → frakcija pod 10000 MWCO; UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO; UF3/F → frakcija pod 5000 MWCO) (n = 2)

Slika 7 kaže časovni padec koncentracij ogljikovih hidratov v vseh frakcijah dobljenih po ultrafiltraciji. V neobdelanem vzorcu je bila koncentracija ogljikovih hidratov najvišja v frakciji z največjo molekulsko maso (nad 30000 MWCO) – tj. v koncentratu UF1/O. Nekoliko nižja je bila koncentracija ogljikovih hidratov v permeatu UF1/F (molska masa molekul pod 30000 MWCO), še nižja v koncentratu UF2/O (molska masa molekul med 10000 in 30000 MWCO), nato sledi, ne po pričakovanjih, permeat UF3/F z molsko maso

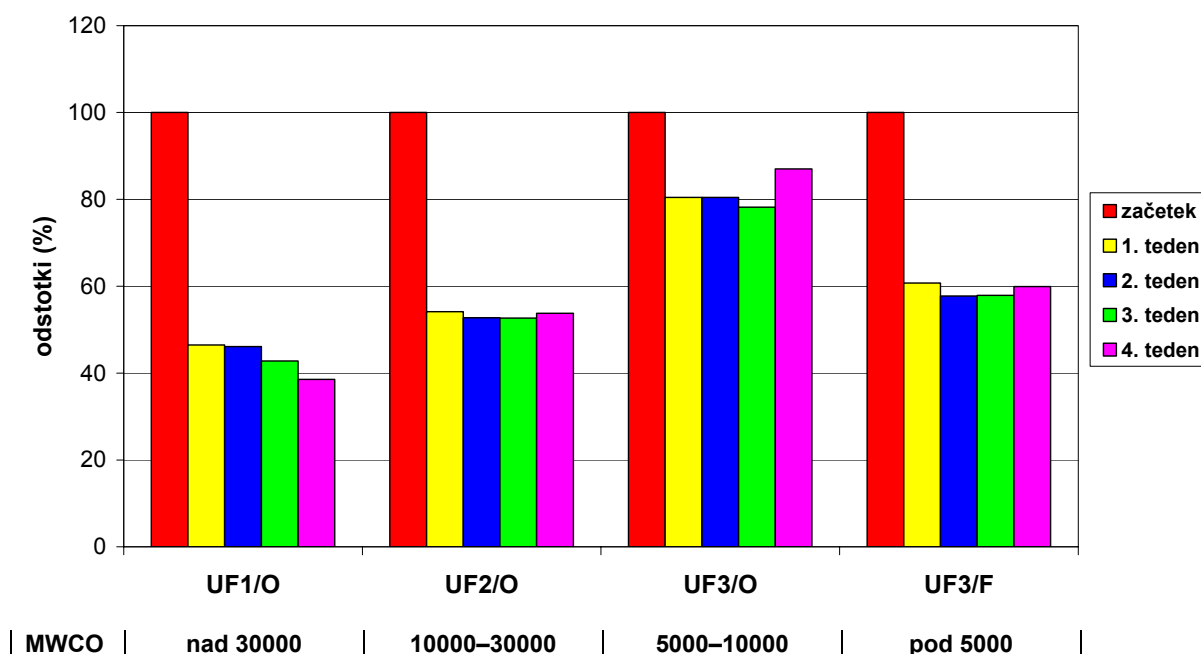
molekul pod 5000 MWCO. Najnižji koncentraciji ogljikovih hidratov pa sta v permeatu UF2/F (molska masa molekul pod 10000 MWCO) in koncentratu UF3/O, kjer je molska masa molekul med 5000 in 10000 MWCO.



Slika 8: Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v posamezni frakciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v odvisnosti od časa pri naravni razgradnji morskih makroagregatov (n = 2)

Pri vseh frakcijah, tj. koncentratih in permeatih po ultrafiltraciji, opazimo padec koncentracij ogljikovih hidratov v času trajanja eksperimenta (slika 8). Najvišje koncentracije ogljikovih hidratov so prisotne v vseh frakcijah v izhodnem neobdelanem vzorcu. Najvišja je koncentracija v frakciji nad 30000 MWCO (koncentrat UF1/O), nekoliko nižji koncentraciji ogljikovih hidratov sta prisotni v frakcijah med 10000 in 30000 MWCO (koncentrat UF2/O) in pod 5000 MWCO (permeat UF3/F). Medtem pa je koncentracija ogljikovih hidratov najnižja v frakciji z molsko maso molekul med 5000 in 10000 MWCO (koncentrat UF3/O). Najbolj izrazit je padec koncentracije ogljikovih hidratov po prvem tednu inkubacije. Največji padec je viden v koncentratu UF1/O. Po enem tednu v tej frakciji pade koncentracija sladkorjev za polovico. V naslednjih tednih pa v tej frakciji ni opaziti nikakršne spremembe. Znatno padec koncentracije ogljikovih

hidratov po 1 tednu inkubacije je opazen tudi v koncentratu UF2/O in v permeatih UF1/F in UF3/F. Koncentracija ogljikovih hidratov se v naslednjih tednih ne spreminja in je na meji detekcije.

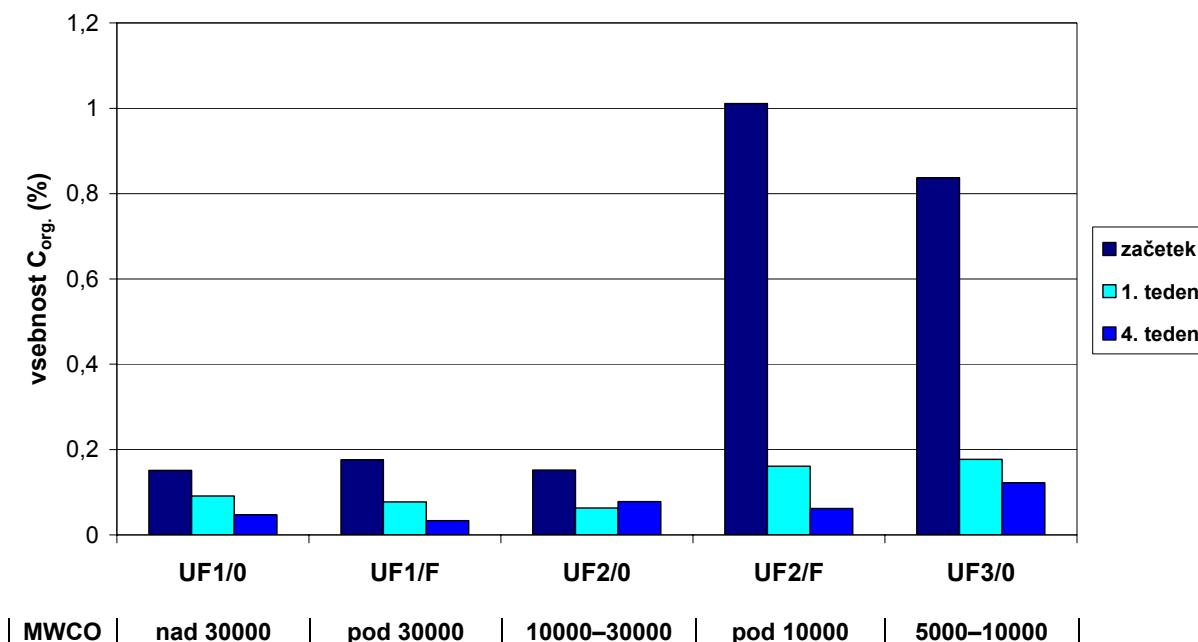


Slika 9: Delež (% od začetne vrednosti/koncentracije) ogljikovih hidratov po razgradnji v intersticijski vodi morskih makroagregatov (iz leta 2004) (n = 2)

Slika 9 prikazuje odstotkovno znižanje vsebnosti ogljikovih hidratov v posamezni frakciji v času inkubacije intersticijske vode morskih makroagregatov. Največji padec vsebnosti smo opazili v prvem tednu inkubacije. V frakciji z najvišjo molsko maso (UF1/O) smo določili razgradnjo 55 % začetne mase ogljikovih hidratov. Vsebnost ogljikovih hidratov v frakciji UF2/O se je po enem tednu zmanjšala za približno polovico, medtem ko je bilo znižanje ogljikovih hidratov v frakciji UF3/O le 20 %. V frakciji z najnižjo molsko maso ogljikovih hidratov (UF3/F) se je zmanjšala vsebnost ogljikovih hidratov za 40 % glede na začetno vsebnost v izhodnem neobdelanem vzorcu. V naslednjih tednih potem ni bilo več opaziti večjih sprememb. Zanimivo je, da smo v UF3/O ob koncu eksperimenta (4. teden) določili višjo koncentracijo ogljikovih hidratov (porast koncentracije) kot po 1–3 tednih naravne razgradnje.

4.2.2 Spremljanje elementne sestave v intersticijski vodi morskih makroagregatov

Z elementno analizo posameznih frakcij smo hoteli ugotoviti kakšna je vsebnost organskega ogljika in celotnega dušika v posamezni frakciji podvorcev odvzetih ob različnih časih inkubacije (glej poglavje 3.2.2). Določili smo tudi molsko razmerje C/N. Vse analize so bile izvedene v dveh ponovitvah, predstavljeni rezultati pa so srednje vrednosti teh meritev. Napaka meritve znaša $\pm 3 \%$ od rezultata, izraženega v odstotkih. Rezultati so prikazani v prilogi A2.

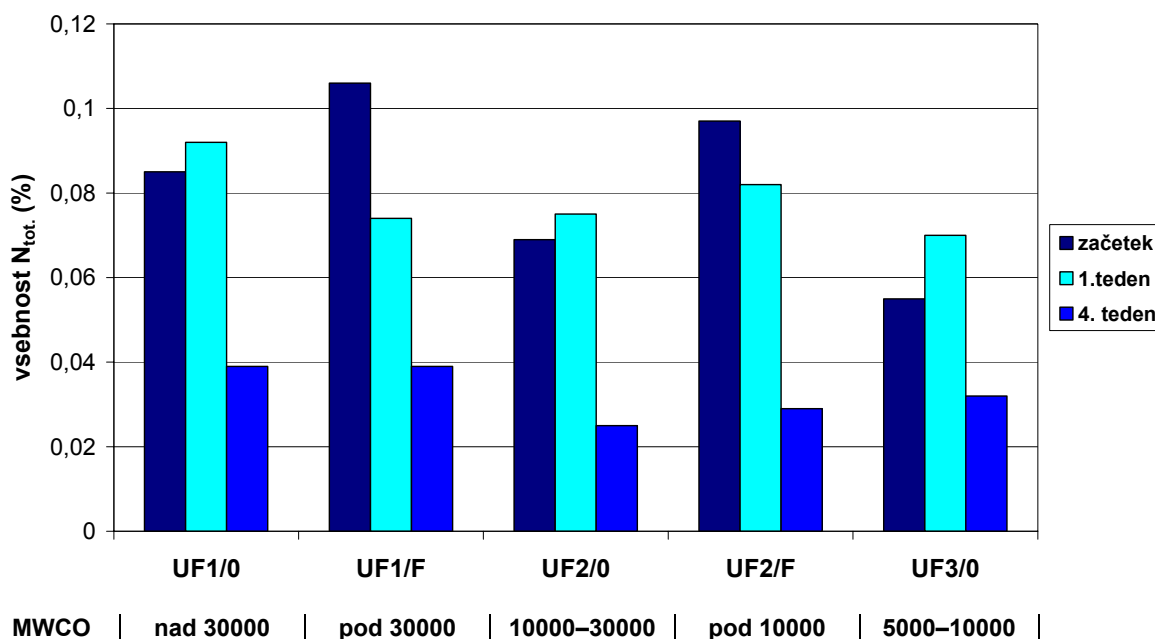


Slika 10: Vsebnost organskega ogljika v posamezni frakciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v odvisnosti od časa ($n = 2$)

Iz slike 10 je razvidno, da je bilo v izhodnem neobdelanem vzorcu posamezne velikostne frakcije (pred inkubacijo) prisotnega največ organskega ogljika ($C_{org.}$). Nato se je njegova vsebnost zmanjševala skozi potek eksperimenta (razgradnja). Pri tem smo določili najvišje vsebnosti $C_{org.}$ v dveh neobdelanih (pred inkubacijo) frakcijah z najmanjšo molsko maso, permeatu UF2/F (molska masa pod 10000 MWCO) in koncentratu UF3/O (molska masa med 5000 in 10000 MWCO). V permeatu UF2/F je bila najvišja vsebnost $C_{org.}$ (1,01 %) izmed vseh frakcij izhodnega neobdelanega vzorca. Nekoliko nižja je bila vsebnost $C_{org.}$ v

koncentratu UF3/O (0,84 %). V ostalih treh frakcijah izhodnega neobdelanega vzorca (UF1/O, UF2/O in UF1/F) je bila vrednost $C_{org.}$ precej nižja in se je gibala v območju med 0,15 % in 0,18 % (priloga A2).

Po enem tednu je vsebnost $C_{org.}$ v vseh frakcijah padla, in sicer pod 0,2 % (UF2/F in UF3/O) oziroma pod 0,1 % (UF1/O, UF/F in UF2/O). Največji padec smo opazili v permeatu UF2/F in koncentratu UF3/O, kjer je bila vsebnost $C_{org.}$ v izhodnem neobdelanem vzorcu največja. V teh dveh frakcijah se je vsebnost $C_{org.}$ zmanjšala za 84 % v permeatu UF2/F oziroma za 79 % v koncentratu UF3/O. V ostalih treh frakcijah (koncentratih UF1/O in UF2/O ter v permeatu UF1/F) pa je bilo znižanje vsebnosti $C_{org.}$ manj opazno. V splošnem se je vsebnost $C_{org.}$ zmanjševala do konca eksperimenta. Po 4 tednih razgradnje intersticijske vode morskih makroagregatov je vsebnost $C_{org.}$ v vseh frakcijah, razen v koncentratu UF3/O (tu je bila vsebnost $C_{org.}$ 0,12 %), padla pod 0,1 % $C_{org.}$.



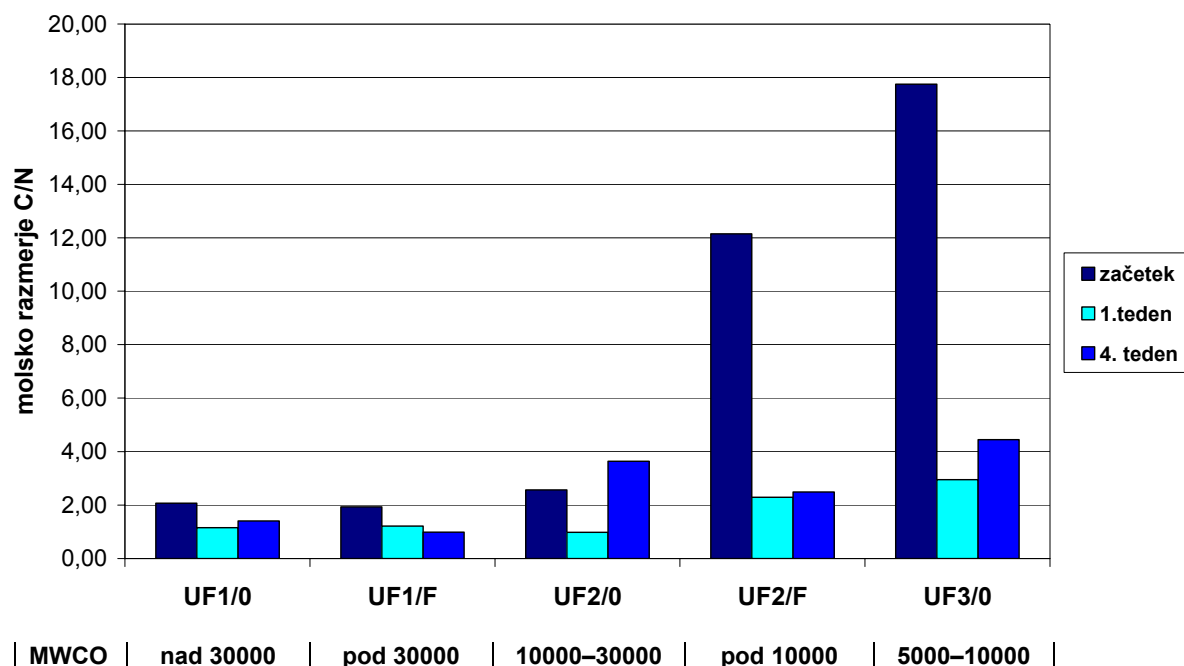
Slika 11: Vsebnost celotnega dušika v posamezni frakciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v odvisnosti od časa ($n = 2$)

Vsebnosti celotnega dušika ($N_{tot.}$) v posameznih frakcijah podvzorcev, odvzetih ob različnih časih ne kažejo enotnega trenda (slika 11). Pred inkubacijo je bila vsebnost $N_{tot.}$ v

koncentratih UF1/O, UF2/O in UF3/O nižja kot pa po enem tednu inkubacije v permeatih UF1/F in UF2/F pa je bila na začetku eksperimenta višja kot pa po enem tednu inkubacije. Med koncentratih je bil najvišja vsebnost $N_{tot.}$ v koncentratu UF1/O (0,08 %), nekoliko nižja je bila vrednost $N_{tot.}$ v koncentratu UF2/O (0,07 %). Najnižja je bila vsebnost $N_{tot.}$ v koncentratu UF3/O (0,06 %). To je bila tudi najnižja vrednost $N_{tot.}$ (%). V permeatih UF1/F in UF2/F je bila vsebnost $N_{tot.}$ približno 0,1 %.

Po enem tednu inkubacije je vsebnost $N_{tot.}$ najbolj padla v permeatu UF1/F (za 36 %), medtem ko je bil v drugem permeatu (UF2/F) ta padec manjši (za 20 %). Opazili smo porast vsebnosti $N_{tot.}$ v vseh koncentratih (UF1/O, UF2/O in UF3/O). Največ v frakciji z najmanjšo molsko maso (med 5000 in 10000 MWCO), kjer se je vsebnost $N_{tot.}$ zvišala za 14 %. V koncentratu UF2/O se je $N_{tot.}$ povišal za 13 %, v koncentratu UF1/O pa za 11 %.

Po četrtem tednu inkubacije pa je vsebnost $N_{tot.}$ v vseh frakcijah padla pod 0,4 %. Najvišja je bil na koncu inkubacije vsebnost $N_{tot.}$ v koncentratu UF1/O in permeatu UF1/F (v obeh 0,04 %). V ostalih pa je bila nižja. Največje znižanje $N_{tot.}$ v času med 1. in 4. tednom inkubacije smo določili v koncentratu UF2/O in permeatu UF2/F, kjer se je vsebnost $N_{tot.}$ zmanjšala za 63 %. Nekoliko manj še je zmanjšala vsebnost $N_{tot.}$ v koncentratih UF3/O (za 57 %) in UF1/O (za 56 %). Najmanj pa se je zmanjšala vsebnost $N_{tot.}$ v permeatu UF1/F, in sicer za 43 %.



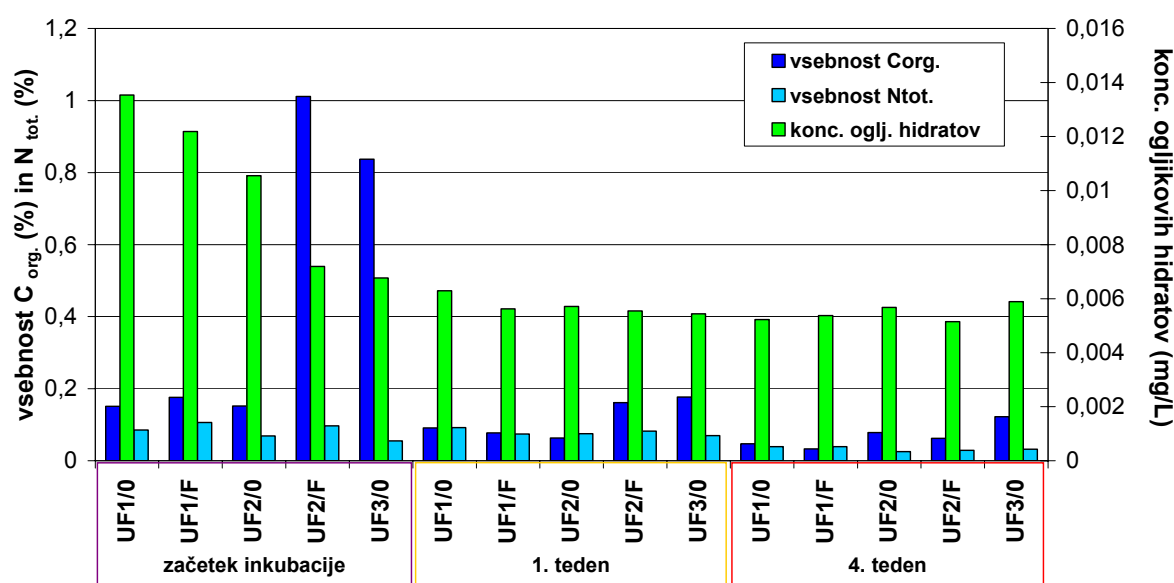
Slika 12: Molsko razmerje C/N v posamezni frakciji intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v odvisnosti od časa (n = 2)

Določali smo tudi razmerje C/N, ki nakazuje izvor in pretvorbe snovi. Iz preglednice 1 in slike 12 lahko razberemo, da je razmerje C/N v velikostnih frakcijah izhodnega neobdelanega vzorca zelo različno. V frakcijah večjih molskih mas (koncentrat UF1/O, permeat UF1/F in koncentrat UF2/O) je bilo v izhodnem neobdelanem vzorcu razmerje C/N nizko. Pri koncentratu UF1/O je bilo razmerje C/N 2,1, pri permeatu UF1/F 1,9 in pri koncentratu UF2/O 2,6. V permeatu UF2/F (12,2) in koncentratu UF3/O (17,7) izhodnega neobdelanega vzorca je bilo razmerje C/N višje.

Po prvem tednu inkubacije se je razmerje C/N znižalo. Največje znižanje smo določili v koncentratu UF3/O (padec za 84 %). Podobno smo opazili v permeatu UF2/F (znižanje za 81 %). Po prvem tednu inkubacije se je v koncentratu UF1/O, permeatu UF1/F in koncentratu UF2/O razmerje C/N znižalo za 43 % (UF1/O), 37 % (UF1/F) oz. 62 % (UF2/O).

Najvišji porast razmerja C/N v primerjavi z velikostnimi frakcijami po enem tednu inkubacije se je zgodil v koncentratu UF2/O (160 % porast) na koncu inkubacije (po 4 tednih). Nekoliko manj je naraslo razmerje C/N tudi v koncentratu UF3/O (za 55 %), medtem ko v ostalih frakcijah ni bilo sprememb.

4.2.2.1 Primerjava deleža organskega ogljika in koncentracije ogljikovih hidratov



Slika 13: Primerjava deleža organskega ogljika, deleža celotnega dušika in koncentracije ogljikovih hidratov v posameznih frakcijah intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) v posameznem času ($n = 2$) (UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO; UF1/F → frakcija pod 30000 MWCO; UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO; UF2/F → frakcija pod 10000 MWCO; UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO; NR1 → naravna razgradnja po 1 tednu; NR4 → naravna razgradnja po 4 tednih)

S primerjavo vrednosti koncentracije ogljikovih hidratov v posameznih frakcijah podvzorcev in organskega ogljika ter celotnega dušika smo želeli preveriti ali se rezultati ujemajo. V primerjavi koncentracij ogljikovih hidratov in vsebnosti organskega ogljika ($C_{org.}$) v posamezni frakciji v izhodnem neobdelanem vzorcu lahko vidimo, da so koncentracije ogljikovih hidratov visoke v frakcijah z molskimi masami, kjer je vsebnost

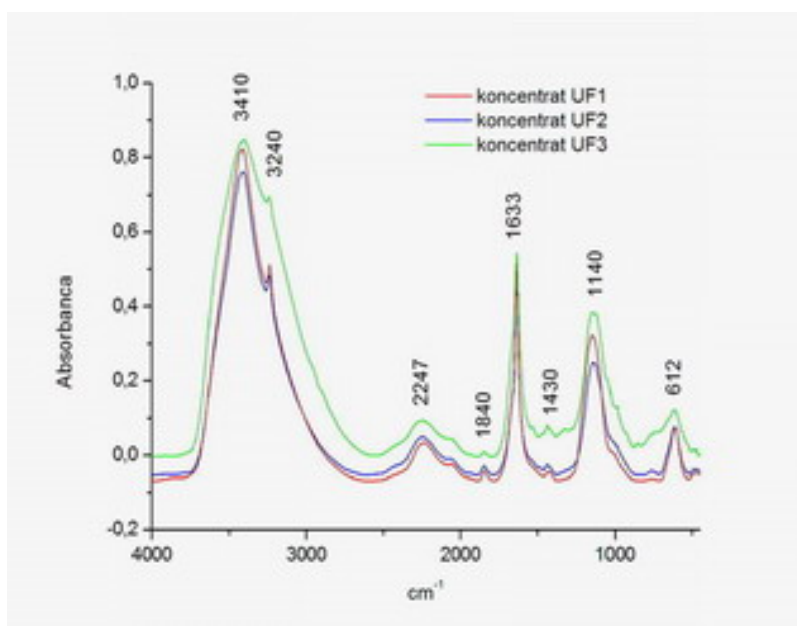
$C_{org.}$ nizka (koncentrat UF1/O in UF2/O, permeat UF1/F). V frakcijah z molskimi masami izhodnega neobdelanega vzorca z visoko koncentracijo ogljikovih hidratov je vsebnost $C_{org.}$ približno enaka (približno 0,15 %), medtem ko se koncentracije ogljikovih hidratov v posamezni frakciji dokaj razlikujejo med seboj. Koncentracija ogljikovih hidratov pada glede na molsko maso v posamezni frakciji: najvišja v koncentratu UF1/O (nad 30000 MWCO), nekoliko nižja je v permeatu UF1/F (pod 30000 MWCO), najnižja pa v koncentratu UF2/O (med 10000 in 30000 MWCO). Obratno so koncentracije ogljikovih hidratov najnižje (približno 0,007 mg/L) v frakcijah, kjer je prisotna visoka vsebnost $C_{org.}$ (nekje med 0,8 % in 1 %) – frakciji permeata UF2/F in koncentrata UF3/O. Delež celotnega dušika ($N_{tot.}$) se med frakcijami ne razlikuje veliko.

Po enem tednu inkubacije koncentracija ogljikovih hidratov v vseh frakcijah pade in se giblje okoli 0,006 mg/L. Največji padec je v koncentratih UF1/O in UF2/O ter v permeatu UF1/F, medtem ko v permeatu UF2/F in koncentratu UF3/O ni viden izrazit padec koncentracije ogljikovih hidratov. Pri deležu $C_{org.}$ pa se trend iz izhodnega neobdelanega vzorca tam, kjer je vsebnost $C_{org.}$ nižja v frakcijah z večjimi molskimi masami (UF1/O, UF1/F in UF2/O). Po enem tednu inkubacije je vsebnost $C_{org.}$ večja v permeatu UF2/F in koncentratu UF3/O (okoli 0,17 %). Delež $N_{tot.}$ v frakcijah se v enem tednu ne spremeni dosti in ostane približno takšen kot na začetku eksperimenta.

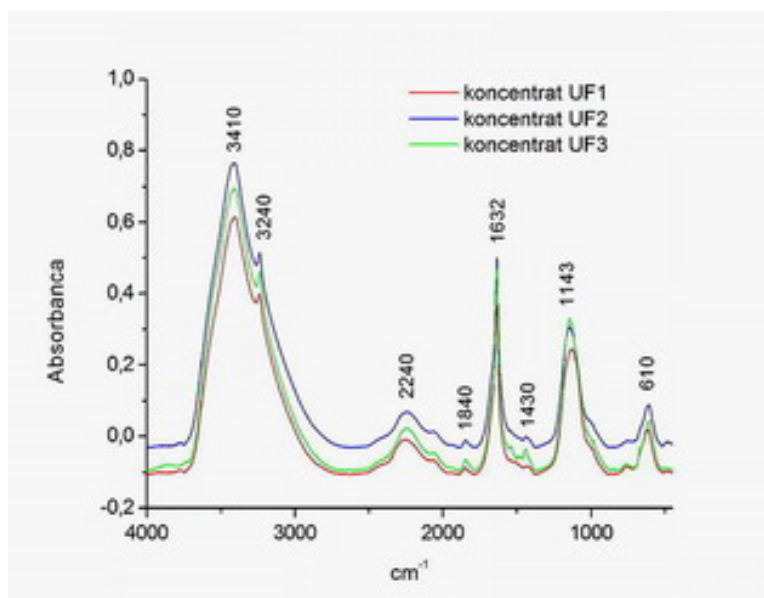
Po koncu četrtega tedna (konec inkubacije) so koncentracije ogljikovih hidratov v vseh frakcijah podobne tistim v frakcijah podvzorca odvzetega po enem tednu inkubacije. Tudi vsebnost $C_{org.}$ je po 4 tednih inkubacije približno enaka v vseh frakcijah. Največja sprememba je vidna v permeatu UF2/F in koncentratu UF3/O, kjer je opazen padec deleža $C_{org.}$. Na koncu eksperimenta pa je opaziti padec deleža $N_{tot.}$ v vseh frakcijah.

4.2.3 Spektri FTIR izbranih podvzorcev intersticijske vode morskih makroagregatov

Sestavo izbranih vzorcev, tj. koncentratov UF1/O (nad 30000 MWCO), UF2/O (10000–30000 MWCO) in UF3/O (5000–10000 MWCO) (glej podpoglavje 3.2.2.1) vzorčenih pred eksperimentom in po njegovem zaključku, tj. po štirih tednih izpostavljenosti vzorca naravni razgradnji, smo proučevali tudi s pomočjo spektroskopije FTIR.



Slika 14: Spektri posameznih frakcij intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) pred inkubacijo (UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO; UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO; UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO)

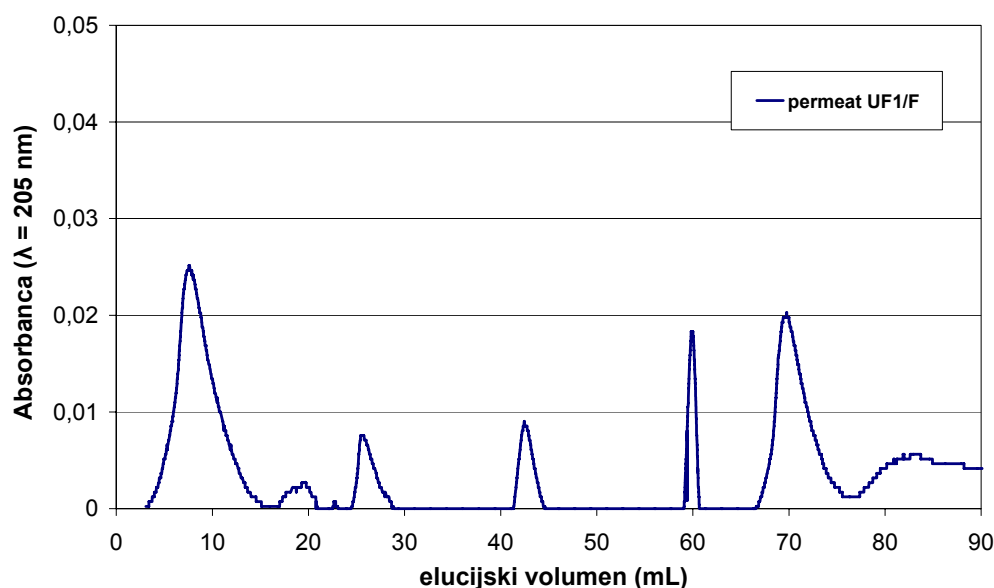


Slika 15: Spektri posameznih frakcij intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) po naravni razgradnji (UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO; UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO; UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO)

Spektre posameznih frakcij vzorca pred eksperimentom prikazuje slika 14, po naravni razgradnji pa slika 15. Spektri vseh izbranih koncentratov (pred eksperimentom) kažejo veliko podobnost. Glavni absorpcijski vrhovi organske komponente so vidni pri 3410, 1633 in 1140 cm^{-1} in pripadajo OH, NH in različnim skupinam C-O tj. proteinom (amid I) ter ogljikovim hidratom vodotopne frakcije. V območju 3400, 3240 in 1630 cm^{-1} pa se pojavljajo tudi absorpcijski trakovi vode. Manjši absorpcijski vrh pri $\sim 1430 \text{ cm}^{-1}$ pripada verjetno prečnemu nihanju CH_2 medtem ko po relativni velikosti podoben signal pri $\sim 1840 \text{ cm}^{-1}$ ostaja v tem primeru nedoločljiv. Prav tako je težko določljiv absorpcijski vrh pri $\sim 2240 \text{ cm}^{-1}$, ki se nahaja v območju značilnih trakov skupine $\text{C}\equiv\text{N}$ (nitrili). Signali okoli 612 cm^{-1} pa so verjetno posledica vibracij mineralov in soli. Značilna absorpcijska vrhova atmosferskega ogljikovega dioksida se nahajata pri 2350 in 667 cm^{-1} , zato k trakovoma v tem območju verjetno prispevajo še signali CO_2 .

4.2.4 Kromatografija HP SEC intersticijske vode morskih makroagregatov

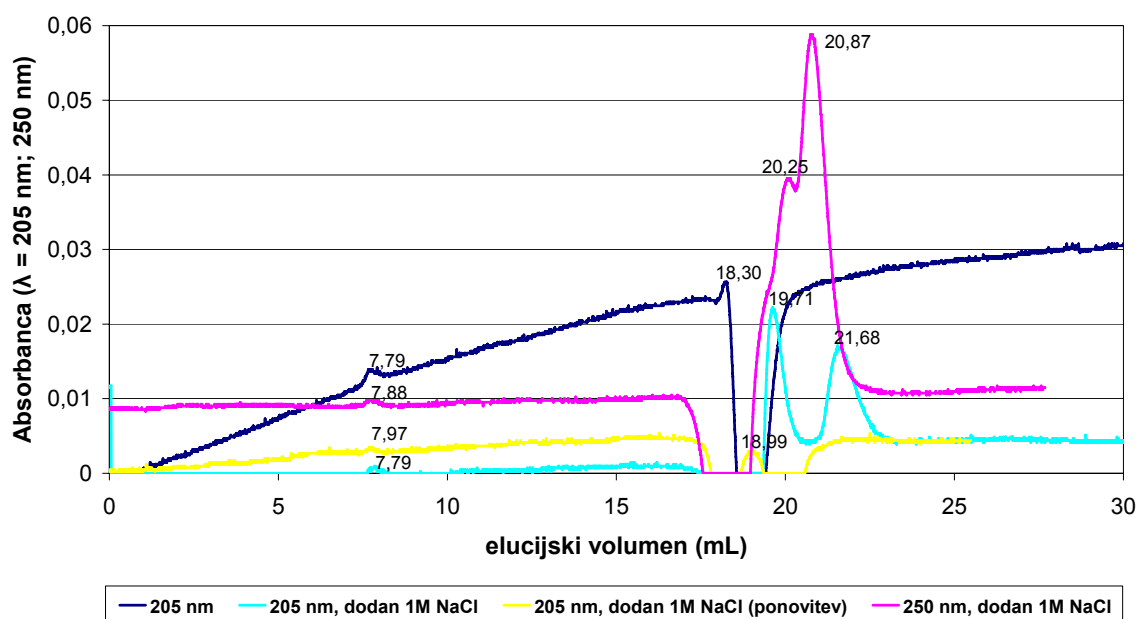
Z gelsko kromatografijo smo nameravali ločiti ogljikove hidrate znotraj posamezne velikostne frakcije (glej poglavje 3.2.2.1) glede na molekulsko maso. Kot izhodišče za izvedbo kromatografske tehnike smo uporabili delo iz članka Minorja in sod. (2002) (Preglednica 1).



Slika 16: Kromatografija intersticijske vode morskih makroagregatov – vzorec na začetku inkubacije (UF1/F – frakcija pod 30000 MWCO)

Podatki o kromatografiji (glej tudi poglavje 3.3.4): kolona TosoHaas TSKgel G3000SW, pretok 1,0 ml/min, volumen zanke 100 μ L.

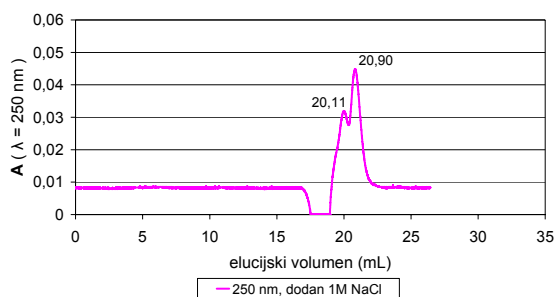
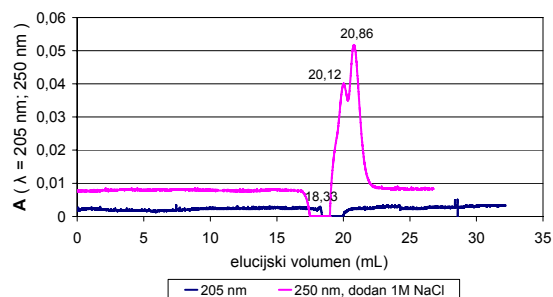
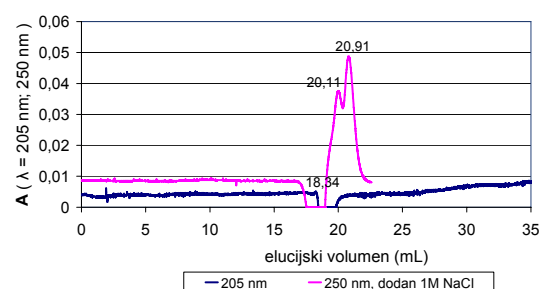
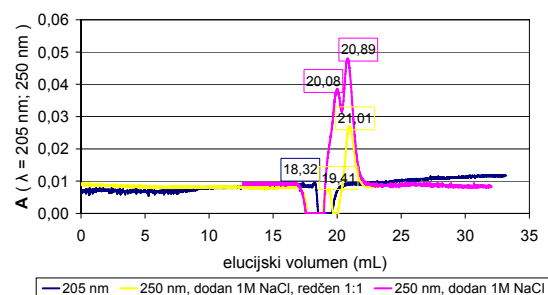
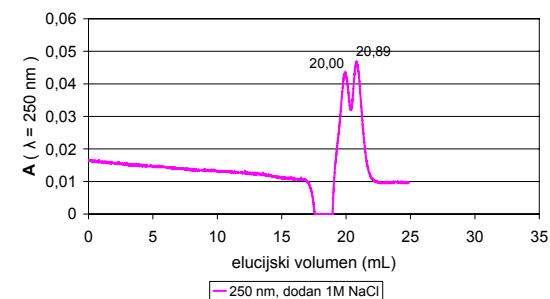
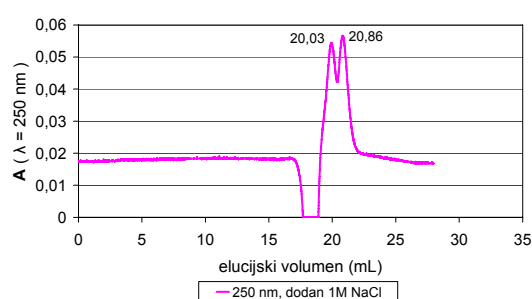
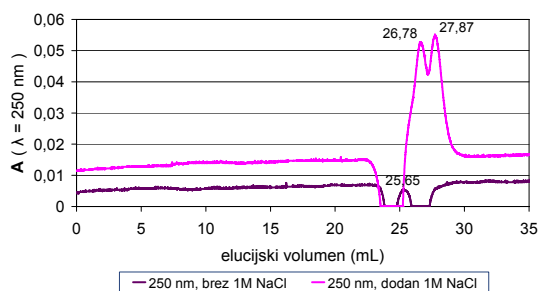
Slika 16 prikazuje neobdelan vzorec pred začetkom inkubacije, kjer smo uporabili prvo kolono TSKgel G3000SW (TosoHaas), ki je lepo ločevala naš vzorec. Vendar je prišlo do interakcij med kolono in vzorcem, kolona je selektivno vezala neznano komponento iz vzorca in se je zato zamašila. Zato smo bili primorani uporabiti drugo kolono, Sephadex 75 10/300 GL (Pharmacia), ki pa ni najbolj primerna za ločevanje te vrste ogljikovih hidratov. Pri naših vzorcih tako (druga) kolona kot tudi sama metoda nista bili popolnoma ustrezni za dobro ločevanje. Zato so dobljeni podatki in njihova interpretacija zgolj orientacijski.



Slika 17: Kromatografija polisaharidnega standarda z $M_p = 708.000$ pri različnih pogojih

Podatki o kromatografiji (glej tudi poglavje 3.3.4): kolona Superdex 75 10/300 GL, pretok 0,75 ml/min, volumen zanke 100 μ L, dodanega 0,25 mL 1M NaCl v 1 mL raztopine standarda.

Na sliki 17 vidimo kromatogram polisaharidnega (pululan) standarda $M_p = 708000$ pri različnih parametrih. Iz nje lahko razberemo, da je ob dodatku 1M NaCl, odziv boljši in intenziteta signala se poveča. Tudi valovna dolžina je vplivala na odziv: pri 205 nm ni odziva, medtem ko je pri 250 nm pa odziv višji oz. ustrezno zaznaven. Najmočnejši signal pa dobimo pri dodatku 200 μ l 1M NaCl k 0,5 mL vzorca in pri valovni dolžini 250 nm. Polisaharidni standard $M_p = 708000$ bi se moral eluirati iz kolone takoj oziroma v izločitvenem volumnu, ker kolona ločuje bolj nizkomolekularne sladkorje (dekstrane) v območju med 500 in 30000. Dejansko pa je bil tu zaznan le majhen vrh, ker se je večina visokomolekularnega standarda eluirala v nižjem območju, kjer so se na popolnoma istem mestu eluirali tudi vsi ostali polisaharidni standardi (slika 18), razen tistega z najvišjo molsko maso (slika 18g), ki se je eluiral s pretežno petmililitrskim zamikom glede na vse ostale vzorce. Vendar ta za primerjavo z našimi vzorci ni bil relevanten.

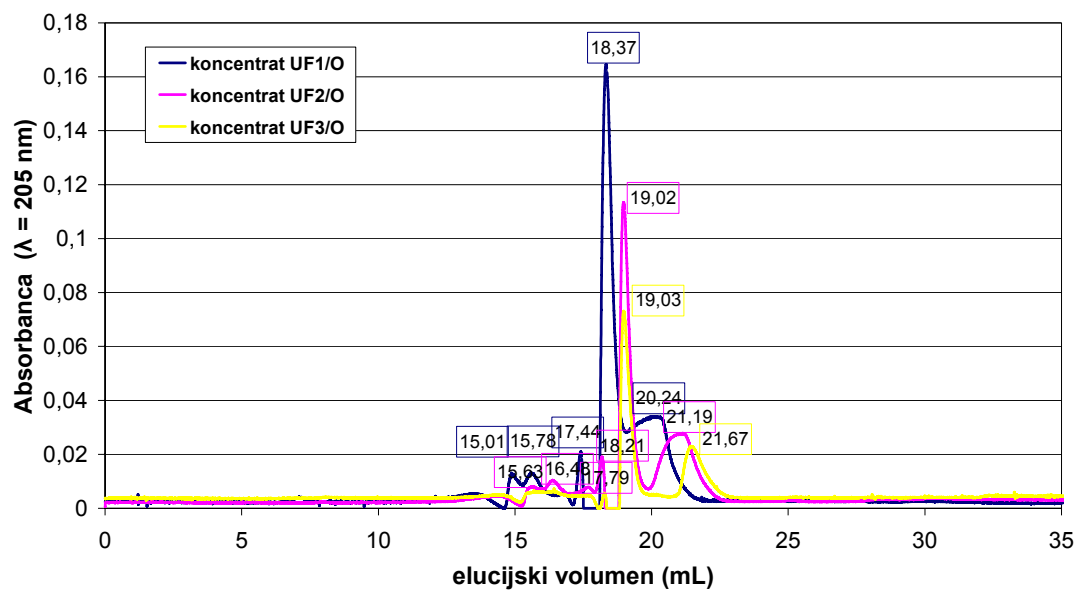
a) $M_p = 180$ b) $M_p = 667$ c) $M_p = 5900$ d) $M_p = 11100$ e) $M_p = 21100$ f) $M_p = 47100$ g) $M_p = 107000$

Slika 18: Kromatografija polisaharidnih standardov različnih velikosti: a) $M_p = 180$; b) $M_p = 667$; c) $M_p = 5900$; d) $M_p = 11100$ (0,5 mL raztopine standarda smo dodali 0,5 mL destilirane vode); e) $M_p = 21100$; f) $M_p = 47100$ in g) $M_p = 107000$ pri različnih pogojih.

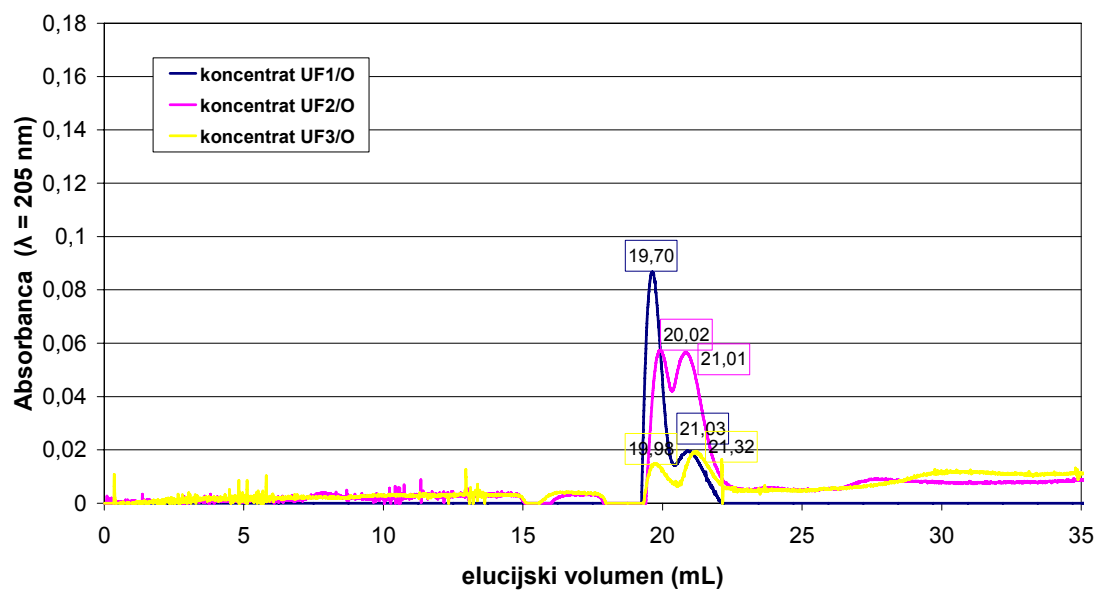
Podatki o kromatografiji na **sliki 18** (glej tudi poglavje 3.3.4): kolona Superdex 75 10/300 GL, pretok 0,75 ml/min, volumen zanke 100 μ L, dodanega 0,2 μ L 1M NaCl v 0,5 mL raztopine posameznega standarda.

Tudi pri vseh ostalih polulanskih polisaharidnih standardih smo ugotovili, da je odziv najboljši pri 250 nm, pri 205 nm pa ga skoraj ni. Na vseh kromatogramih s slike 18 lahko razberemo, da se je odziv na koloni izboljšal pri dodatku 0,2 mL 1M NaCl k 0,5 mL vzorca in valovni dolžini 250 nm. Pri vseh standardih dobimo po dodatku 1M NaCl dva vrhova (slika 17 in 18). Običajno se pri standardih pojavi samo en vrh. Po vsej verjetnosti je prišlo do interakcij med kolono in standardom, kar je povzročilo zastajanje standardov in tudi vzorcev (slika 19) .

Izbrana kolona Sephadex 75 10/300L standardov ne ločuje. Z njeno uporabo ne moremo ločevati ogljikovih hidratov znotraj posamezne velikostne frakcije naših vzorcev in prav tako ne moremo določiti elucijskega volumna (ali retencijskega časa) posameznega polisaharidnega standarda. Na uporabljeni koloni je šest od sedmih standardov eluiranih pri enakem volumnu oz. po enakem času. Sklepamo, da prihaja do specifičnih interakcij polulanskih standardov s kolono. Samo pri najvišjem polisaharidnem standardu dobimo majhen vrh na območju void volumna, kjer bi se ta dejansko moral izločiti, preostanek pa se je izločil celo kasneje.



a)



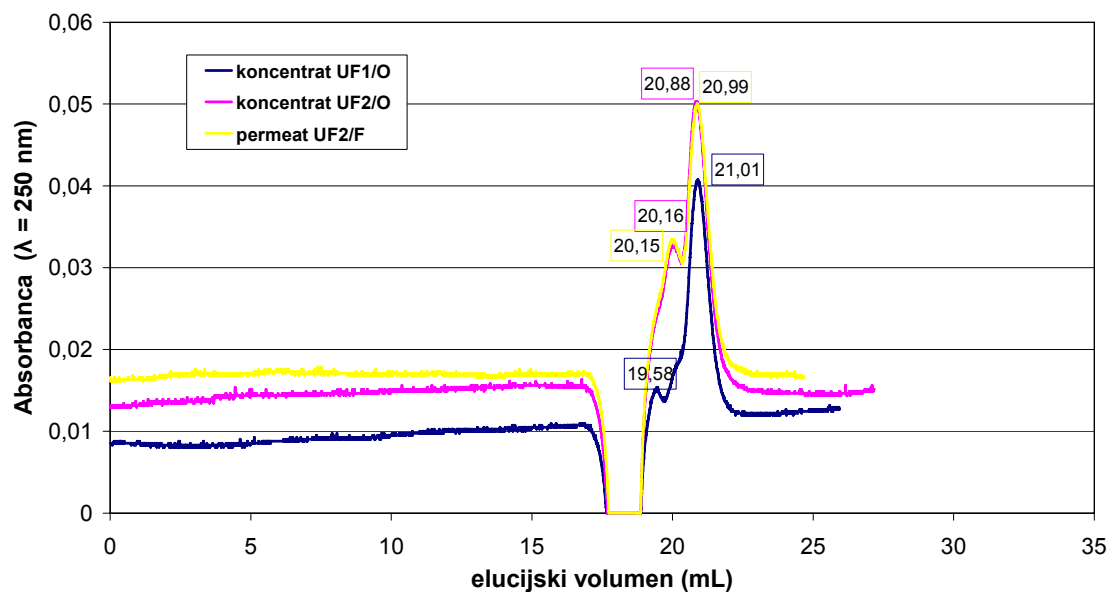
b)

Slika 19: Kromatografija frakcij intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) pred naravno razgradnjo in po njej (1 teden); a) neobdelan vzorec na začetku inkubacije (t_0); b) podvzorec odvzet po naravni razgradnji ($t_1 = 1$ teden); UF1/O $\rightarrow$ frakcija nad 30000 MWCO, UF2/O $\rightarrow$ frakcija med 10000 in 30000 MWCO, UF3/O $\rightarrow$ frakcija med 5000 in 10000 MWCO

Podatki o kromatografiji na **sliki 19** (glej tudi poglavje 3.3.4): kolona Superdex 75 10/300 GL, pretok 0,75 ml/min, volumen zanke 100 μ L.

Slika 19 prikazuje kromatograme izhodnega (neobdelanega) vzorca v različnih velikostnih frakcijah (slika 19a) in kromatograme različnih velikostnih frakcij po enem tednu inkubacije (slika 19b). Glavnina vzorca se v vseh primerih eluira približno na istem mestu kot polisaharidni standardi. Glede na to, da za ločevanje ogljikovih hidratov po velikostnih frakcijah ta kolona ni primerna lahko rečemo le, da so v vseh frakcijah prisotni različni ogljikovi hidrati oz. v različnih razmerjih in da se trend kromatogramov ponavlja pri vseh velikostnih frakcijah v izhodnem (neobdelanem) vzorcu in deloma tudi v velikostnih frakcijah vzorca po enem tednu inkubacije. Iz slike 19a lahko razberemo, da manjša ko je velikost molekul v frakciji, manjša je količina ogljikovih hidratov v vzorcu. Tako je največ ogljikovih hidratov prisotnih v koncentratu UF1/O (velikost molekul nad 30000 MWCO), nekoliko manj jih je v koncentratu UF2/O (velikost molekul med 10000 in 30000 MWCO), najmanj pa v koncentratu UF3/O (velikost molekul med 5000 in 10000 MWCO).

Iz primerjave kromatogramov (slika 19) lahko razberemo, da se je količina ogljikovih hidratov zmanjšala v enem tednu. Po inkubaciji (1 teden) začetni vrhovi skoraj izginejo, ostali pa se znižajo. Prav tako pada količina ogljikovih hidratov po velikostnih frakcijah kot v izhodnem vzorcu. Na koncu kromatograma je viden »rep«, ker razgrajeni ostanki iz kolone izhajajo počasneje zaradi morebitnih interakcij z njo. Znižanje valov se ujema s padanjem količine ogljikovih hidratov v istih vzorcih (slika 7).



Slika 20: Kromatografija polisaharidnega standarda ($M_p = 107.000$) s katerim smo preverili delovanje membran pri ultrafiltraciji → UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO, UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO, UF2/F → frakcija pod 10000 MWCO

Podatki o kromatografiji (glej tudi poglavje 2.3.4): kolona Superdex 75 10/300 GL, pretok 0,75 ml/min, volumen zanke 100 μ L, dodanega 200 μ L 1M NaCl v 0,5 mL raztopine standarda.

S kolono smo hoteli preveriti tudi delovanje ultrafiltracijskih membran (slika 20). V frakciji koncentrata UF1 (nad 30000 MWCO) bi se moral izločiti celoten polisaharidni standard $M_p = 107000$, v frakcijah koncentrata UF2 in permeata UF2 pa polisaharidnega standarda ne bi smelo biti. Dejansko pa smo polisaharidni standard identificirali v kromatogramih v vseh treh velikostnih frakcijah.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Sestava vodotopnih makroagregatov

Izhajajoč iz naših analiz FTIR so ključne sestavine intersticijske vode morskih makroagregatov ogljikovi hidrati in proteini. Tudi prejšnje analize FTIR in ^1H NMR potrjujejo, da so glavne sestavine intersticijske vode makroagregatov ogljikovi hidrati in v manjši meri lipidi in proteini. Signali značilni za alifatsko komponento v našem primeru niso dobro vidni. Absorpcijski vrhovi metilnih in metilenskih skupin se nahajajo v območju od 2800 do 3000 cm^{-1} in jih lahko v našem primeru prekriva trak v območju 2800–3600 cm^{-1} (vibracije skupin N-H in O-H). V vseh spektrih FTIR izbranih vzorcev pa je prisoten manjši trak, ki ga lahko pripišemo prečnemu nihanju CH_2 . V spektrih smo opazili tudi absorpcijski vrh ($\sim 2240 \text{ cm}^{-1}$), ki je značilen za signale nitrilov (skupina $\text{C}\equiv\text{N}$). V predhodnih raziskavah sluzastih makroagregatov so že dobili rezultate, ki so nakazovali prisotnost skupin $\text{C}\equiv\text{N}$, vendar še vedno ni poznan njihov izvor.

Že opravljena frakcionacija intersticijske vode makroagregatov s HP SEC je pokazala, poleg visoke molske mase 10^{10} , pretežno prisotnost molskih mas 287 in 2733, ki označujeta monosaharide in oligosaharide, ki so verjetno produkti razgradnje (Kovač in sod., 2008). Dosedanje analize vodotopnih oligosaharidov v makroagregatih iz severnega Jadrana so pokazale prisotnost maltotrioze, maltotetraoze, maltopentaoze, maltoheksaoze in maltoheptaoze. Vse naj bi bile produkti razgradnje (Penna in sod., 2003; Cappiello in sod., 2007).

Frakcionacija intersticijske vode makroagregatov z ultrafiltracijo v štiri frakcije ter njihova karakterizacija z analizo organskega ogljika (C_{org}), dušika in ogljikovih hidratov je pokazala, da je vsebnost ogljikovih hidratov največja v koncentratu UF1/O (nad 30000 MWCO) in v koncentratu UF2/O (med 10000 in 30000 MWCO), najvišje razmerje $\text{C}_{\text{org}}/\text{N}$ pa v koncentratu UF3/O (med 5000 in 10000 MWCO). Opisano kaže na možnost, da so

glikoproteini in aminopolisaharidi pomembne sestavine visokomolekularnih frakcij intersticijske vode makroagregatov, medtem ko naj bi bile nizkomolekularne frakcije sestavljene bolj iz polisaharidov in oligosaharidov. Prisotnost organskih dušikovih komponent potrjujejo tudi nižje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ naših frakcij (Faganeli in sod., 2008) in močnejša absorpcija pri $\lambda = 205 \text{ nm}$, ki je sicer bolj tipična za ogljikove hidrate, kot pa pri 250 nm , ki je bolj tipična za proteine in ne za polisaharide (Binkley E. R. in Binkley R. W., 1999). Analize HP SEC UDOM so tudi nakazale možno prisotnost velikih deležev aminosladkorjev v visokomolekularnih frakcijah (Minor in sod., 2002), kar se ujema s ^{15}N NMR (McCarthy in sod., 1997) in študijami MS (Boon in sod., 1998; van Heemst in sod., 1993) UDOM. Z uporabo HP SEC nismo uspeli preveriti (določiti) porazdelitve molskih mas makromolekul v posameznih frakcijah vodotopnih makroagregatov zaradi težav s kolono. Težave s kromatografijo HP SEC so, kljub dobremu ločevanju kolone TSKgel G3000SW (Tosohaas), najverjetneje nastale predvsem zaradi interakcij določene komponente iz vzorca s kolono. Čeprav je bilo ločevanje dobro, se nam je po nekajkratnih nanosih vzorcev kolona zamašila in je ni bilo mogoče več obnoviti. Tudi pri nadomestni koloni (Sephadex 75 10/330 GL, Pharmacia) je verjetno prišlo do specifičnih interakcij vzorca s kolono, ker so pri vsakem nanosu vzorca spojine prihajale iz kolone s ponovljivim zamikom. Za ločevanje naših vzorcev oziroma te vrste sladkorjev bi bilo bolje uporabiti specifično kolono za ločevanje polisaharidov, npr. Tosohaas TSK-GEL PW_{XL} (Tosohaas), ki ima široko območje ločevanja po molskih masah (območje ločevanja dekstranov: 50000 do 2500000). Te vrste kolon so polnjene s kroglicami metakrilata ter so hidrofilne in rigidne. Kationski vzorci (kot so bili naši) se lahko adsorbirajo na kolono z elektrostatskimi interakcijami. Zato je treba pri močnih kationskih vzorcih uporabiti visoko koncentracijo soli, da preprečimo ionske interakcije med kolono in vzorcem. Tako dobimo višjo odzivnost in manj interakcij med kolono in komponentami v vzorcu. Konformacija makromolekul v vzorcu pa ostane enaka, kot je bila v morju. Ionsko moč in pH mobilne faze je treba prilagoditi pH in ionski moči vzorca, da ohranimo molekule v vzorcih intaktne. Pogoji morajo čimbolj posnemati lastnosti okolja, kjer smo vzorec odvzeli. Ker se pri ultrafiltraciji naravno prisotna sol (NaCl) s frakcioniranjem izloča, bi jo bilo v prihodnje pri gelski kromatografiji tako dobljenih vzorcev smiselno dodajati predvsem v elucijski pufer. Monomodalna porazdelitev vrhov v kromatogramih neobdelanega vzorca in vzorca po razgradnji po 1 tednu tudi kažejo, da je intersticijska voda makroagregatov

kompleksna zmes, ki je ni enostavno ločiti s HP SEC, in da so makromolekule prisotne v ozkem razponu velikosti (mas) oz. mali polidisperznosti (Chin in sod., 1994). Tudi uporabljeni UV-detektor zaznava le spojine, ki absorbirajo v UV (kromatofori). Vzrok je lahko tudi v konformaciji makromolekul polisaharidov v raztopini (vodi), saj te lahko obstajajo v razponu med linearno obliko, naključnim klobčičem in globularnimi oblikami (Yau in sod., 1979), kar je predvsem odvisno od prisotnosti kovinskih ionov v raztopini (Everett in sod., 1999) in ionske moči raztopine (Chin in Gschwend, 1991; Kilduff in Weber, 1992). Zato lahko nekatere molekule polisaharidov kljub svoji velikosti grede skozi pore kolone, druge pa ne. Pri ločbah HP SEC DOM moramo obvezno upoštevati še možno adsorpcijo oz. desorpcijo in agregacijo oz. deagregacijo makromolekul (Minor in sod., 2002).

5.1.2 Razgradnja posameznih frakcij vodotopnih makroagregatov

Inkubacija intersticijske vode morskih makroagregatov vodi do razgradnje njenih sestavin. Glavna komponenta, katere razgradnji smo sledili v poskusu, so bili ogljikovi hidrati, ki so pomemben substrat za rast mikroorganizmov. Ogljikovi hidrati so ena izmed najbolj pomembno zastopanih in reaktivnih sestavin v morskem rezervoarju C_{org} (Benner in sod., 1992; Pakulski in Benner, 1994). Razgradnja ogljikovih hidratov v intersticijski vodi makroagregatov poteka hitro (v enem tednu) v vseh frakcijah, še posebej v koncentratu UF1/O (nad 30000 MWCO), razen v koncentratu UF3/O (med 5000 in 10000 MWCO). Izsledke potrjuje tudi kromatogram HP SEC frakcionacije intersticijske vode makroagregatov po molskih masah, ki kaže občutno znižanje (skoraj 50 %) vsebnosti ogljikovih hidratov predvsem v koncentratih UF1/O (nad 30000 MWCO) in UF2/O (med 10000 in 30000 MWCO), a manj v koncentratu UF3/O (med 5000 in 10000 MWCO). Podoben časovni potek je viden tudi v vsebnosti C_{org} in N_{tot} . Razlike v reaktivnosti med frakcijami pripisujemo večji prisotnosti glikoproteinov pa tudi aminopolisaharidov v visokomolekularnih frakcijah. Polisaharidna komponenta v glikoproteinih se mikrobno razgrajuje tudi 3-krat hitreje kot proteinska (Ogawa in sod., 2001; Nagata in sod., 2003). Opisano potrjuje padec razmerij C/N v naših ultrafiltratih, posebej še v nižjemolekularnih frakcijah. V nasprotju z ostalimi analizami pa spektri FTIR frakcij vzorcev med razgradnjo ne kažejo velikih sprememb, zato lahko ta analizni pristop označimo kot neustrezen za

tovrsten študij spremenljivosti sestave posameznih komponent vodotopne frakcije sluzastih makroagregatov med razgradnjo (Mohar, 2006; Kofol, 2007).

Naši izsledki se ujemajo z rezultati Kovač in sod. (2006) o ohranjanju organskega dušika v »starejših« (»zrelih«) makroagregatih in opisujejo tudi možni način znižanja razmerja C/N ob razgradnji organske snovi v morju. V splošnem velja, da višje ko je razmerje C/N, bolj je morska organska snov razgrajena. Znano je sicer, da je značilno razmerje C/N morske organske snovi približno 8, organske snovi kopenskega izvora pa je višje (Ogrinc in sod., 2005). Zaradi prisotnosti velike bakterijske biomase pa je lahko razmerje C/N tudi precej nižje (Benner in Kaiser, 2003).

5.2 SKLEPI

- V intersticijskih vodah makroagregatov (t.i. vodotopna frakcija) prevladujejo ogljikovi hidrati. Na osnovi nižjega razmerja C/N sklepamo, da v visokomolekularnih frakcijah pomemben delež predstavljajo glikoproteini in aminopolisaharidi. Nižjemolekularne frakcije so najbrž sestavljene predvsem iz polisaharidov in oligosaharidov. Vsekakor so makromolekule v intersticijski vodi makroagregatov prisotne v razmeroma ozkem razponu molskih mas, ki jih ni enostavno ločiti. Vzroke iščemo v različnih konformacijah makromolekul v vodni raztopini in vrsti fizikalno-kemijskih procesov: adsorpcije/desorpcije, agregacije/deagregacije.
- Velika razgradnja v vseh frakcijah, razen v nižjemolekularni, je potekla v prvem tednu trajanja eksperimenta, ker je bilo takrat na voljo največ substrata za mikrobno rast. Takrat je prišlo tudi do razgradnje največjega deleža ogljikovih hidratov v intersticijski vodi makroagregatov. Razlike v reaktivnosti med frakcijami najverjetneje izvirajo iz razlik v sestavi posameznih frakcij. V visokomolekularnih frakcijah je polisaharidna komponenta hitreje razgradljiva kot glikoproteinska in aminopolisaharidna ter predstavlja tako možno pot ohranjanja dušika v makroagregatih med razgradnjo.

6 POVZETEK

Severni Jadran epizodno doživlja nastanek morskega snega in sluzastih makroagregatov različnih oblik, barv in velikosti. Pri pojavu sluzenja igrajo pomembno vlogo morski mikroorganizmi, predvsem fitoplankton, katerega izločki polisaharidov tudi prispevajo k nastanku sluzastih makroagregatov. Za nastanek sluzi so pomembni posebni hidrološki in meteorološki pogoji (visoka temperatura vode, odsotnost vetrov, mirno morje in stabilen vodni stolpec). Sluzenje morja se ponavlja prične pozno spomladi/zgodaj poleti in ga povezujejo s spremembo ravnotežja razmerja $\text{NO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$, ki povzroči spremembe v fiziologiji fitoplanktona in povečano izločanje polisaharidnih izločkov. Nastanek makroagregatov obsega procese, ki pretvorijo raztopljeno organsko snov (DOM), večinoma v koloidno organsko snov (COM) in nato še v suspendirano organsko snov (POM). V zgoščenih in želatinastih sluzastih makroagregatih najdemo ujete različne organske in anorganske delce (fitoplankton, mikrozoooplankton, ostanke celic, detrit, fekalne peletke, mineralne delce ipd). Kopičenje in stabilnost makrogelov sta verjetno povezana tudi z interakcijami med organsko snovjo, kationi in mineralnimi delci. Običajno se agregati sluzi kopičijo ob faznih mejah. Dosedanje raziskave so pokazale zelo kompleksno sestavo makroagregatov, ki vključuje: ogljikove hidrate, alifatske (lipidne) spojine, organosilicijeve spojine in anorganske frakcije sestavljene iz mineralnih delcev. Spremembe sestave makroagregatov v času kažejo izrazito zmanjšanje koncentracije ogljikovih hidratov zaradi mikrobne in fotokemične razgradnje hkrati s povečanjem deleža organosilicijevih in alifatskih spojin, ki so bolj odporne proti razgradnji. V morskih makroagregatih prisotna dušikova komponenta se ohranja dalj časa in je bolj odporna proti razgradnji kot ogljikovi hidrati.

Namen diplomskega dela je bila kemijska karakterizacija posameznih frakcij vodotopnih morskih makroagregatov z različno molsko maso in spremljanje poteka mikrobne razgradnje teh frakcij v pogojih, čim bolj podobni pogojem *in situ*. V določenih časovnih razmikih smo odvzeli podvzorce intersticijske vode makroagregatov, ki smo jih s pomočjo ultrafiltracije ločili na frakcije z različno molsko maso. V posamezni frakciji smo nato določili koncentracijo ogljikovih hidratov ter vsebnost organskega C (C_{org}) in celotnega N (N_{cel}) ter razmerje C/N. Sestavo posameznih frakcij vzorcev, vzorčenih pred

eksperimentom in po zaključku eksperimenta, smo proučevali s pomočjo spektroskopije FTIR. Za ločevanje posameznih molskih mas sladkorjev smo uporabili kromatografijo HP SEC.

Frakcionacija intersticijske vode makroagregatov z ultrafiltracijo in njihova karakterizacija z analizo $C_{org.}$ in $N_{tot.}$, ogljikovih hidratov in FTIR je pokazala, da je vsebnost ogljikovih hidratov največja v frakcijah z najvišjo molsko maso, najvišje razmerje C/N pa smo dobili v frakcijah z najnižjo molsko maso. To kaže na možnost, da so glikoproteini in aminopolisaharidi pomembne sestavine visokomolekularnih frakcij intersticijske vode makroagregatov. V nizkomolekularnih frakcijah pa naj bi bili večinoma prisotni poli- in oligosaharidi. Dobljeni rezultati kažejo hitro razgradnjo polisaharidne komponente v vseh frakcijah vodotopnih makroagregatov, ki se razgrajuje hitreje od proteinske. To lahko razberemo tudi iz kromatograma HP SEC frakcionacije vodotopnih makroagregatov po molski masah, ki kaže znatno znižanje koncentracije ogljikovih hidratov že po prvem tednu trajanja eksperimenta.

7 VIRI

Allredge A. L., Silver M. W. 1988. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Progress in Oceanography*, 20: 42–82

Aluwihare L. I., Repeta D. J. 1999. A comparison of the chemical characteristics of oceanic DOM and extracellular DOM produced by marine algae. *Marine Ecology Progress Series*, 186: 105–117

Benner R., Pakulski J. D., McCarthy M., Hedges J. I., Hatcher P. G. 1992. Bulk chemical characterization of dissolved organic matter in the ocean. *Science Magazine*, 255: 1561–1564

Benner R., Kaiser K. 2003. Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter. *Limnology Oceanography*, 48: 118–128

Biddanda B., Oghdahl M., Cotner J. 2001. Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic water. *Limnology Oceanography*, 46: 730–739

Binkley E. R., Binkley R. W. 1999. *Carbohydrate photochemistry*. Washington DC, American Chemical Society: 448 str.

Boon J. J., Klap V. A., Eglinton T. I. 1998. Molecular characterization of microgram amounts of oceanic colloidal organic matter by direct temperature-resolved ammonia chemical ionization mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, 29: 1051–1061

Cappiello A., Trufelli H., Famiglini G., Pierini E., Capellacci S., Peena A., Ricci F., Ingarao C., Penna N. 2007. Study on the oligosaccharides composition of the water-soluble fraction of marine mucilage by electrospray tandem mass spectrometry. *Water Research*, 41, 13: 2911–2920

Chin Y-P., Aiken G., O'Loughlin E. 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*, 28, 1853–1858

Chin Y-P., Gschwend P.M., 1991. The abundance, distribution, and configuration of porewater organic colloids in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55, 1309-1317

Cole J., Likens G., Strayer D. 1982. Photosynthetically produced dissolved organic carbon: an important carbon source for planktonic bacteria. *Limnology Oceanography*, 27: 1080–1090

Cowie G. I., Hedges J. I., 1984. Carbohydrate sources in a coastal marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48; 2075–2087

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

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

Degobbi D., Precali R., Ferrari C. R., Djakovac T., Rinaldi A., Ivancic I., Gismondi M., Smolaka N. 2005. Changes in nutrient concentrations and ratios during mucilage events in period 1999-2002. *Science of the Total Environment*, 353: 103–114

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

Everett C.R., Chin Y.-P. 1999. High-pressure size exclusion chromatography analysis of dissolved organic matter isolated by tangential-flow filtration. *Limnology and Oceanography*, 44, 1316–1322

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

Faganeli, J., Ogrinc N., Kovač N., Kukovec K., Falnoga I., Mozetič P., Bajt O. 2008. ^{13}C and ^{15}N in POM in relation to mucilage formation in the northern Adriatic Sea. V: 2008 Ocean Sciences Meeting. From the watershed to the global Ocean, Orlando, 2.-7. marec 2008. Orlando, ASLO, AGU, The Oceanography Society: 108–108

Fonda-Umani S., Ghirardelli E., Specchi M. 1989. Gli episodi di »mare sporco« nell'Adriatico da 1729 ai giorni nostri. Trieste, Ufficio stampa e pubbliche relazioni della Regione Friuli-Venezia Giulia: 178 str.

Fonda-Umani S. 1996. Pelagic production and biomass in the Adriatic Sea. *Scientia Marina*, 60, 2: 65–77

Fuks D., Radić J., Radić T., Najdek M., Blažina M., Degobbis D., Smolaka N. 2005. Relationships between heterotrophic bacteria and cyanobacteria in the northern Adriatic in relation to the mucilage phenomenon. *Science of the Total Environment*, 353: 178–188

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

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

Grossart H.-P., Kiørboe T., Tang K. W., Allgaier M., Yam E. M., Ploug H. 2006. Interactions between marine snow and heterotrophic bacteria: aggregate formation and microbial dynamics. *Aquatic Microbial Ecology*, 42: 19–26

Guerrini F., Mazzotti A., Boni L. Pistocchi R. 1998. Bacterial-algal interactions in polysaccharide production. *Aquatic Microbial Ecology*, 15: 247–253

van Heemst J.D.H., Baas M., de Leeuw J.W., Benner R. 1993. Molecular characterization of marine dissolved organic matter (DOM). V: *Organic geochemistry*. Oygard K. (ed.). Oslo, Falch Hutigtrykk: 694–698

Heissenberger A., Leppard G. G., Herndl G. J. 1996. Ultrastructure of marine snow. II. Microbiological considerations. *Marine Ecology Progress Series*, 135, 299–308

Herndl G. J., Weinbauer M. G. 2003. *Marine Microbial Food Web Structure and Function*. V: *Marine science frontiers for Europe*. Wefer G., Lamy F., Mantoura F. (eds.). Berlin, Springer: 265–277

Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S., 1977. Use of nucleopore filter for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 1225–1228

Hoyle B. D., Robinson R. 2007. *Microbes in the ocean*. V: *The water encyclopedia: hydrologic data and internet resources*. Fierro P., Nyer E. K. (eds.). USA, Boca Raton: CRC/Taylor & Francis

<http://www.waterencyclopedia.com/Mi-Oc/Microbes-in-the-Ocean.html> (6. 5. 2008): 1 str.

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

Kilduff J., Weber W.J. 1992. Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration processes. *Environmental Science and Technology*, 26: 569–577

Kjørboe T., Tang K., Grossart H.-P., Ploug H. 2003. Dynamics of microbial communities on marine snow aggregates: colonization, growth, detachment and grazing mortality of attached bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6: 3036–3047

Kofol R. 2007. Encimska razgradnja lipidov v morskih makroagregatih. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 62 str.

Kovač N., Bajt O., Faganeli J., Šket B., Orel B. 2002. Study of macroaggregate composition using FTIR and H-NMR spectroscopy. *Marine Chemistry*, 78, 205–215

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

Kovač N. 2005. Pojav sluzastih makroagregatov v severnem Jadranu. *Kemija v šoli*, 17, 3: 25–31

Kovač N., Faganeli J., Bajt O., Orel B., Šket B. 2006. Composition and formation of macroaggregates in the northern Adriatic Sea. V: *Production and fate of dissolved organic matter in the Mediterranean Sea*. CIESM, Cambados, 21-24 sept. 2005. Monaco, CIESM: 75–80

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

Kovač N., Faganeli J., Bajt O. 2008. Mucous macroaggregates in the Northern Adriatic. V: *Geochemistry: Research advances*. Stefansson O. (ed.). New York, Nova Science Publishers: 119–141

McCarthy M. D., Hedges J. I., Benner R. 1997. Major bacterial contribution to marine dissolved organic nitrogen. *Science Magazine*, 281, 5374: 231–234

Minor E. C., Simjouw J.-P., Boon J. J., Kerkhoff A. E., van der Horst J. 2002. Estuarine/marine UDOM as characterized by size-exclusion chromatography and organic mass spectrometry. *Marine Chemistry*, 78: 75–102

Mohar B. 2006. Encimska razgradnja morskih makroagregatov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 63 str.

Nagata T., Meon B., Kirchman D. L. 2003. Microbial degradation of peptidoglycan in seawater. *Limnology and Oceanography*, 48: 745–754

NASA. 2005. Blue Marble: next generation. Washington, NASA's Earth Observatory.

<http://earthobservatory.nasa.gov/Newsroom/BlueMarble/> (maj 2008): 1 str.

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

Ogawa H., Amagai Y., Koike I., Kaiser K., Benner R. 2001. Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science Magazine*, 292: 917–920

Orožen Adamič M. 2002. Geomorfološke značilnosti Tržaškega zaliva in obrobja. V: Dela: Oddelek za geografijo Filozofske fakultete Univerze v Ljubljani. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Filozofska fakulteta, Oddelek za geografijo: 143–155

Pakulski J. D. in Benner R. 1994. Abundance and distribution of dissolved carbohydrates in the ocean. *Limnology Oceanography*, 39: 930–940

Penna N., Capellaci S., Ricci F., Kovač N. 2003. Characterisation of carbohydrates in mucilage samples from the northern Adriatic sea. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376: 436–439

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

Pugnetti A., Armeni M., Camatti E., Crevatin E., Dell' Anno A., Del negro P., Milandri A., Socal G., Umani S. F., Danovaro R. 2005. Imbalance between phytoplankton production and bacterial carbon demand in relation to mucilage formation in the Northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353: 162–177

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

Skoog A., Biddanda B., Benner R. 1999. Bacterial utilization of dissolved glucose in the upper water column of the Gulf of Mexico. *Limnology and Oceanography*, 44, 7: 1625–1633

Slapar A. 2001. Metalotioneinom podobne beljakovine v epifitskih in terestičnih lišajih. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 72 str.

Šolić M., Krstulović N. 2000. Ekologija morskog bakterioplanktona. Split, Institut za oceanografijo i ribarstvo: 472 str.

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

Tanoue E., Nishiyama S., Kamo M., Tsugita A. 1995. Bacterial membranes: Possible source of major dissolved protein in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59, 12: 2643–2648

Umani S.F., Milani L., Borme D., de Olazabal A., Parlato S., Precali R., Kraus R., Lučić D., Njire J., Totti C., Romagnoli T., Pompei M., Cangini M. 2005. Inter-annual variations of planktonic food webs in the northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353: 218–231

Urbani R., Magaletti E., Sist P., Cicero A. M. 2005. Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudomonana* and *Skeletonema costatum*: Effect of P-depletion and growth status. *Science of the Total Environment*, 353: 300–306

Verity P. G., Williams S. C., Hong Y. 2000. Formation, degradation, and mass: volume ratios of detritus derived from decaying phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 207: 53–68

Zaccone R., Caruso G., Cali C. 2002. Heterotrophic bacteria in the northern Adriatic Sea: seasonal changes and ectoenzyme profile. *Marine Environmental Research*, 53: 1–19

Yau W.J., Kirkland J.J., Bly D.D. 1979. Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography. New York, Wiley: 496 str.

ZAHVALA

Hvala mentorju prof. dr. Jadranu Faganeliju in doc. dr. Nives Kovač za usmerjanje tekom praktičnega dela na Morski biološki postaji v Piranu in za koristne nasvete v času pisanja diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Morski biološki postaji Piran za vso tehnično pomoč in odgovore na moja vprašanja.

Hvala dr. Ingrid Falnoga in dr. Zdenki Šejkovec za pomoč in nasvete med praktičnim delom na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani (še posebej, ko ni zadeve niso tekale po naših pričakovanjih).

Vesna hvala za družbo (ob vseh dolgotrajnih filtracijah in kromatografijah) in pomoč pri delu in iskanju rešitev pri praktičnem delu diplomske naloge.

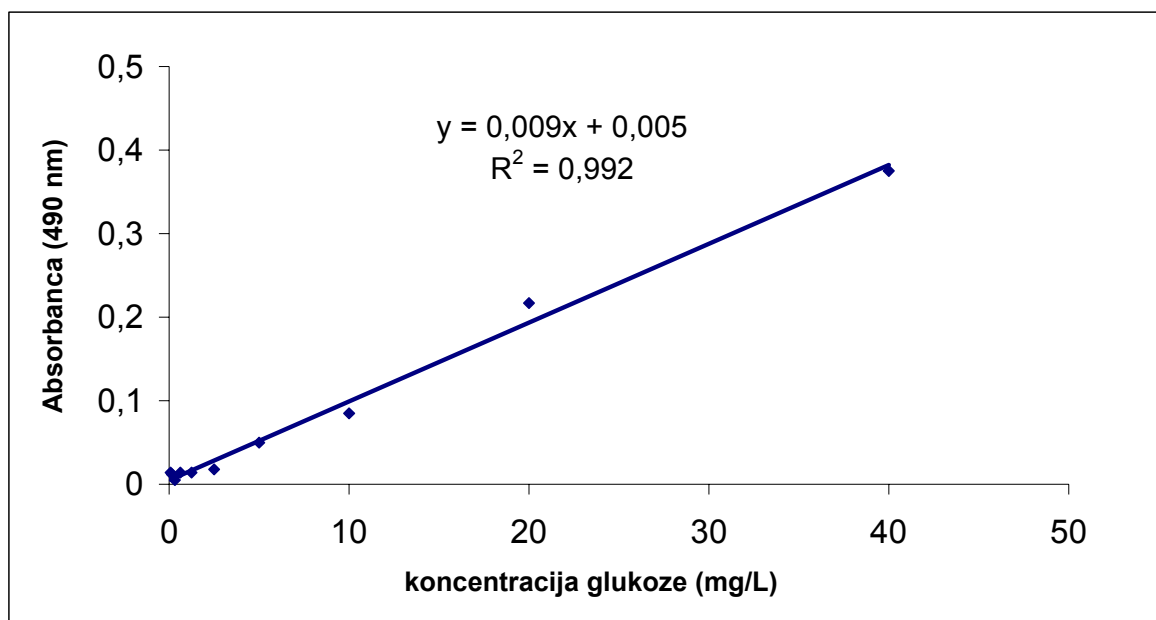
Hvala atiju, mami, bici in sestri Kaji za oporo in spodbudo skozi vsa leta guljenja šolskih klopi. Hvala, ker verjamete vame.

Hvala vsem prijateljem, ki ste me nenehno spraševali kako napreduje diploma, me spodbujali in potrpežljivo poslušali, ko sem vam poskušala razložiti kaj pravzaprav je sluzenje morja. Alenka hvala, da si si vzela čas za lektoriranje moje diplome.

Hvala vsem »sorodnikom« z Laz za pomoč vedno, kadar sta moj računalnik in tiskalnik ob najbolj neprimernem času zatajila.

Na koncu pa en velik hvala Damjanu, ki je z vso potrpežljivostjo prenašal nihanje mojega razpoloženja, ki je bilo odvisno od rezultatov pri praktičnem delu in količine navdiha pri pisanju.

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije ogljikovih hidratov

Priloga B: Vsebnost organskega ogljika, celotnega dušika in molsko razmerje C/N v posameznih frakcijah intersticijske vode morskih makroagregatov (iz leta 2004) pri naravni razgradnji morskih makroagregatov

	začetek inkubacije			1 teden			4 tedni		
vzorec	% C _{org.}	% N _{tot.}	C/N	% C _{org.}	% N _{tot.}	C/N	% C _{org.}	% N _{tot.}	C/N
UF1/O	0,15	0,08	2,1	0,09	0,09	1,2	0,05	0,04	1,4
UF1/F	0,18	0,11	1,9	0,08	0,07	1,2	0,03	0,04	1,0
UF2/O	0,15	0,07	2,6	0,06	0,08	1,0	0,08	0,03	2,6
UF2/F	1,01	0,10	12,2	0,16	0,08	2,3	0,06	0,03	2,5
UF3/O	0,84	0,06	17,7	0,18	0,07	2,9	0,12	0,03	4,5

Pomen oznak v tabeli:

UF1/O → frakcija nad 30000 MWCO;

UF1/F → frakcija pod 30000 MWCO;

UF2/O → frakcija med 10000 in 30000 MWCO;

UF2/F → frakcija pod 10000 MWCO;

UF3/O → frakcija med 5000 in 10000 MWCO.