

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Bojana MOHAR

ENCIMSKA RAZGRADNJA MORSKIH MAKROAGREGATOV

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MARINE MACROAGREGATES

GRADUATION THESIS
University study

Ljubljana, 2006

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Jadrana Faganelija, za somentorico doc. dr. Nives Kovač in za recenzentko prof. dr. Ines Mandič Mulec.

Mentor: prof. dr. Jadran FAGANELI

Somentorica: doc. dr. Nives KOVAČ

Recenzentka: prof. dr. Ines MANDIČ MULEC

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

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

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mohar Bojana

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.68: 574.5 (043) = 863
KG	morska mikrobiologija/morski makroagregati/severni Jadran/encimska razgradnja/ogljikovi hidrati/proteini/spektrofotometrične metode/FTIR
AV	MOHAR, Bojana
SA	FAGANELI, Jadran (mentor)/KOVAČ, Nives (somentorica)/MANDIČ MULEC, Ines (recenzentka)
KZ	SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	ENCIMSKA RAZGRADNJA MORSKIH MAKROAGREGATOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 63 str., 27 sl., 12 pril., 43 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Spremljali smo proces encimske razgradnje vzorcev morskih makroagregatov (na površini in v vodnem stolpcu) iz Tržaškega zaliva s posebnim poudarkom na strukturnih spremembah posameznih komponent, ki so v naravi predmet mikrobne razgradnje. V organski snovi makroagregatov prevladujejo ogljikovi hidrati, proteini in lipidi in kljub temu da je v makroagregatih prisotna gosta populacija mikroorganizmov, ki imajo na voljo potrebne nutriende, so makroagregati dokaj obstojna formacija v morju. Medsebojna povezava strukturnih komponent ter mehanizem nastanka in mikrobne razgradnje makroagregatov sta še vedno precejšnji uganki. Zato smo izvedli laboratorijski poskus z inkubacijo vzorcev v pogojih, ki so čimbolj podobni naravnim pogojem na mestu vzorčenja. Vzorcem smo dodajali različne kombinacije encimov ter v enakih časovnih intervalih spektrofotometrično določali koncentracije proteinov in ogljikovih hidratov med eksperimentom. Sestavo in strukturne spremembe izbranih vzorcev (pred in po encimski razgradnji) smo spremljali tudi s pomočjo FTIR spektroskopije. Glede na dobljene rezultate lahko povzamemo, da je razgradnja makroagregatov mikrobno vodena ter da poteka že med njihovim razvojem in sedimentacijo v vodnem stolpcu. Ugotovili smo da imamo v makroagregatih prisotno avtohtono združbo mikroorganizmov, ki aktivno hidrolizira zamrežene dele matriksa in porablja nastale mono- in oligosaharide, pri tem pa so bili v obravnavanih vzorcih makroagregatov najlažje dostopni rezervni $\alpha(1-4)$ polisaharidi. FTIR analize pred in po dodatku encimov nam pokažejo, da v zamreženem matriksu makroagregatov obstajajo povezave med ogljikovimi hidrati, proteini, lipidi in minerali. Ogljikovi hidrati in proteini vezani z lipidi, verjetno preko esterskih in amidnih vezi, so precej težje razgradljivi. Sklepamo, da gre v določeni meri najbrž za glikolipide in lipoproteine bakterijskih in fitoplanktonskih celic, ki so v veliki meri odporni na hidrolizo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDK 579.68: 574.5 (043) = 863

CX marine microbiology/marine macroaggregates/northern Adriatic Sea/enzymatic hydrolysis/
carbohydrates/proteins/spectrophotometric methods/FTIR

AU MOHAR, Bojana

AA FAGANELI, Jadran (supervisor)/KOVAČ, Nives (co-advisor)/MANDIĆ
MULEC, Ines (reviewer)

PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology

PY 2006

TI ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MARINE MACROAGGREGATES

DT Graduation thesis (University study)

NO X, 63 p., 27 fig., 12 ann., 43 ref.

LA sl

AL sl/en

AB We studied the enzymatic hydrolysis of marine macroaggregates collected in surface and in the water column in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea) with special reference to the structural transformations due to microbial activity. The macroaggregate organic matter is mainly composed of carbohydrates, proteins and lipids and despite the high microbial density the macroaggregates are quite stable natural marine assemblage. However, the linking of structural components, mechanisms of formation and microbial degradation are still relatively unknown. Hence, we performed a laboratory experiment incubating macroaggregate samples at in situ conditions. The enzymes were added to samples and the concentrations of carbohydrates and proteins were measured at different time intervals. The composition and structural transformations before and after enzymatic hydrolysis were followed using FTIR spectroscopy. The results show that the degradation is microbially mediated and takes place during maturation and sedimentation of macroaggregates within the seawater column. We found that the autochthonous microbial community actively hydrolyses the macroaggregate matrix consuming mono- and oligosaccharides produced. The $\alpha(1-4)$ reserve polysaccharides are the most susceptible for enzymatic attack in the selected samples of macroaggregates. FTIR analyses of macroaggregates before and after the addition of enzymes showed that in the crosslinked matrix the links between carbohydrates, proteins and minerals exist. The carbohydrates and proteins linked to lipids, probably through ester and amide bonds, are less susceptible to microbial degradation. We propose that glycolipids and lipoproteins from bacterial and phytoplankton cells are the most important refractory components towards enzymatic hydrolysis.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo slik	VII
	Kazalo prilog	IX
	Okrajšave in simboli	X
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	1
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	POJAV MAKROAGREGATOV V SEVERNEM JADRANU	3
2.2	NASTANEK MAKROAGREGATOV	4
2.3	KEMIČNA SESTAVA MAKROAGREGATOV	7
2.4	BIOLOŠKA SESTAVA MAKROAGREGATOV	8
2.4.1	Interakcije znotraj mikrobne združbe makroagregatov	9
2.5	RAZGRADNJA MAKROAGREGATOV	11
2.5.1	Odziv morskega ekosistema na prisotnost makroagregatov	13
3	MATERIALI IN METODE	14
3.1	ORIS PODROČJA RAZISKAVE	14
3.2	VZORČENJE IN PRIPRAVA VZORCEV	15
3.2.1	Pregled splošnih hidrografskih pogojev pred in v času sluzenja morja v letu 2004	15
3.2.2	Vzorčenje	18
3.2.3	Priprava vzorcev	19
3.3	ANALIZA VZORCEV	20
3.3.1	Eksperiment	20
3.3.2	Mikroskopski pregled in gojitev vzorcev	24
3.3.3	Določanje sprememb koncentracij ogljikovih hidratov v makroagregatih	25
3.3.4	Določanje sprememb koncentracij proteinov v makroagregatih	26
3.3.5	Strukturna analiza vzorcev s FTIR spektroskopijo	28

4	REZULTATI	30
4.1	MIKROSKOPSKI PREGLED VZORCEV	30
4.2	KONCENTRACIJA OGLJIKOVIH HIDRATOV V VZORCIH	31
4.2.1	Spremembe koncentracij ogljikovih hidratov med encimsko razgradnjo z β-glukozidazo in α-amilazo	31
4.2.2	Spremembe koncentracij ogljikovih hidratov med encimsko razgradnjo s pankreatinom	35
4.3	KONCENTRACIJA PROTEINOV V VZORCIH	36
4.3.1	Spremembe koncentracij proteinov med encimsko razgradnjo s proteinazo K in proteazo ter pankreatinom	36
4.4	SPEKTROSKOPSKE FTIR ANALIZE ENCIMSKO OBDELANIH MAKROAGREGATOV	39
4.4.1	Spektri FTIR makroagregatov vzorčenih na površini (vzorec P) in v vodnem stolpcu (vzorec V)	39
4.4.1.1	Spektra FTIR analiziranih usedlin vzorcev P in V	39
4.4.1.2	Spektra FTIR analiziranih supernatantov (vodotopna frakcija) vzorcev P in V	41
4.4.2	Spektri FTIR vzorcev po encimski razgradnji z izbranimi encimi	42
4.4.2.1	Usedlina vzorca vzorčenega v vodnem stolpcu –V	43
4.4.2.2	Usedlina površinskega vzorca – P	45
4.4.3	Sproščanje sestavin iz usedlin vzorcev makroagregatov v vodni medij po encimski razgradnji	47
5	RAZPRAVA	49
5.1	RAZGRADNJA OGLJIKOVIH HIDRATOV IN PROTEINOV V MAKROAGREGATIH	49
5.2	POMEN ENCIMSKE RAZGRADNJE OGLJIKOVIH HIDRATOV IN PROTEINOV V MAKROAGREGATIH TRŽAŠKEGA ZALIVA	53
6	SKLEPI	55
7	POVZETEK	57
8	VIRI	59
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1:	Makroagregati na morski površini; v vodnem stolpcu; na morskem dnu	4
Slika 2:	Shema agregacije in razgradnje biopolimernih molekul v makroagregatih (Hedges in Keil, 1999)	6
Slika 3:	Posnetek makroagregatov s TEM (Kovač in sod., 2005)	7
Slika 4:	Shema nastanka in razgradnje makroagregatov ter interakcij med organizmi (Leppard, 1999)	11
Slika 5:	Geografska lega Tržaškega zaliva v Jadranskem morju	15
Slika 6:	Lokacija vzorčevalnih mest v Tržaškem zalivu	18
Slika 7:	Shema priprave vzorcev	19
Slika 8:	Način delovanja encima proteaze na polipeptid	22
Slika 9:	Način delovanja encima proteinaze K na polipeptid	23
Slika 10:	Način delovanja encima α -amilaze na polisaharide (Enzymes, 2002)	23
Slika 11:	Shema postopka določanja koncentracije ogljik. hidratov s fenolom in H_2SO_4	26
Slika 12:	Shema postopka določanja koncentracije proteinov s Coomassie blue reagentom	28
Slika 13:	Mikroskopski posnetki makroagregatov (vzorec "vodni stolpec"); 200-kratna povečava	30
Slika 14:	Mikroskopski posnetki vzorcev makroagregatov pobarvanih z DAPI barvilom; 40- in 200- kratna povečava	31
Slika 15:	Kolonije bakterij zraslih na ploščah nacepljenih z vzorcem makroagregatov	31
Slika 16:	Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov β -glukozidaze in α -amilaze za usedlino in supernatant vzorcev "površina" in "vodni stolpec"	33
Slika 17:	Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov β -glukozidaze in α -amilaze za usedlino vzorcev "površina" in "vodni stolpec" z dodanim kloramfenikolom	34
Slika 18:	Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa posamičnega delovanja encima β -glukozidaze ter posamičnega delovanja encima α -amilaze za usedlino vzorcev "površina" in "vodni stolpec"	34
Slika 19:	Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov β -glukozidaze in α -amilaze ter delovanja pankreatina za usedlino vzorcev "površina" in "vodni stolpec"	35

Slika 20: Spreminjanje koncentracije proteinov v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov proteaze in proteinaze K za usedlino in supernatant vzorca "površina"	37
Slika 21: Spreminjanje koncentracije proteinov v odvisnosti od časa delovanja pankreatina ter encimov proteaze in proteinaze K za usedline vzorcev "površina" in "vodni stolpec"	38
Slika 22: Spremembe koncentracij ogljikovih hidratov in proteinov obeh vzorcev v eksperimentalnem časovnem obdobju; prikaz odstotkov povišanja oziroma padca koncentracij ogljikovih hidratov in proteinov po encimskem delovanju glede na začetno vrednost le-teh v obeh vzorcih	39
Slika 23: Spektra FTIR usedlin površinskega vzorca in vzorca makroagregatov iz vodnega stolpca	40
Slika 24: Spektra FTIR supernatantov površinskega vzorca in vzorca makroagregatov iz vodnega stolpca	42
Slika 25: Spektri FTIR neobdelane usedline vzorca makroagregatov iz vodnega stolpca ter njenega trdnega preostanka (sediment/po centrifugiranju) po encimski razgradnji	44
Slika 26: Spektri FTIR neobdelane usedline površinskih makroagregatov ter njenega trdnega preostanka (sediment/po centrifugiranju) po encimski razgradnji	46
Slika 27: Spektri FTIR neobdelane usedline površinskega vzorca ter vodne faze (po centrifugiranju vzorčne raztopine) po encimski razgradnji	48

KAZALO PRILOG

- Priloga A 1: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije ogljikovih hidratov
- Priloga A 2: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov
- Priloga B 1: Spreminjanje vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov β -glukozidaze in α -amilaze za usedlino vzorca "vodni stolpec"
- Priloga B 2: Spreminjanje vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov β -glukozidaze in α -amilaze za usedlino vzorca "površina"
- Priloga C 1: Spreminjanje vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa delovanja pankreatina za usedlino vzorca "vodni stolpec"
- Priloga C 2: Spreminjanje vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa delovanja pankreatina za usedlino vzorca "površina"
- Priloga D 1: Spremembe vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov proteaze in proteinaze K za usedlino vzorca "vodni stolpec"
- Priloga D 2: Spremembe vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov proteaze in proteinaze K za usedlino vzorca "površina"
- Priloga E 1: Spremembe vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa delovanja pankreatina za usedlino vzorca "vodni stolpec"
- Priloga E 2: Spremembe vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa delovanja pankreatina za usedlino vzorca "površina"
- Priloga F: Spremembe koncentracij ogljikovih hidratov in proteinov pri kontrolnih vzorcih - brez dodanih encimov (obeh vzorcev "površina" in "vodni stolpec")
- Priloga G: Preglednica glavnih signalov/absorpcijskih trakov določenih v FTIR spektrih makroagregatov severnega Jadrana (Kovač in sod., 2004; Kovač in sod., 2006)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CFB	-	<i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i> taksonomska skupina bakterij
dest.voda	-	destilirana voda
DOC	-	raztopljeni organski ogljik (angl. dissolved organic carbon)
FTIR	-	infrardeča spektroskopija (angl. Fourier transform infrared spectroscopy)
konc.	-	koncentracija
MBP	-	Morska biološka postaja v Piranu
N/P razmerje	-	razmerje med dušikom in fosforjem
NMR	-	nuklearna magnetna rezonanca
oglj.hidr.	-	ogljikovi hidrati
POC	-	suspendirani organski ogljik (angl. particulate organic carbon)
psu	-	praktična enota slanosti (angl. practical salinity unit)
TEM	-	transmisijski elektronski mikroskop

1 UVOD

Morje je izjemno kompleksno in edinstveno okolje, naseljuje ga velika količina najrazličnejše flore in favne. Predstavlja tesno povezan in občutljiv ekosistem, kjer so vse njegove komponente pomembne ter imajo izjemen medsebojni vpliv. Severni Jadran in Tržaški zaliv imata specifične hidrografske in meteorološke pogoje, ki vplivajo na lastnosti vodnih mas. Poleg tega ima velik vpliv na severni Jadran človek, ki s svojimi intenzivnimi posegi v okolje pospešuje eutrofikacijo rek in morja. Severni Jadran zaradi vseh teh specifičnih lastnosti predstavlja idealen sistem za nastanek morskega snega in sluzastih makroagregatov, ki se v tem predelu Jadrana pojavljajo periodično, v velikih količinah, različnih velikostih ter zajamejo izjemno velike morske površine. Zato severni Jadran nudi idealne pogoje za študij makroagregatov.

Zaradi negativnih posledic prisotnosti makroagregatov v morju, predvsem za turizem, marikulturo in ribištvo, obstaja veliko zanimanje za razumevanje njihovega nastanka, zgradbe in razgradnje. Kljub temu je malo znanega o makroagregatih. Komponente, ki sestavljajo makroagregate, so zelo različne, spreminjajo se časovno in so podvržene vsem možnim zunanjim dejavnikom. Zato je opredelitev njihove sestave, nastanka in procesov v katerih sodelujejo, težavna naloga.

1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Namen diplomske naloge je bil s pomočjo spektroskopskih analiz spremljati proces encimske razgradnje vzorcev morskih makroagregatov, s posebnim poudarkom na strukturnih spremembah posameznih komponent, ki so v naravi predmet mikrobne razgradnje. Ker so predvsem ogljikovi hidrati in v manjši meri proteini pomembne sestavine makroagregatov in zaradi še ne povsem pojasnjene strukture makroagregatov, smo študirali encimsko razgradnjo obeh komponent. Izvedli smo laboratorijski poskus z inkubacijo vzorcev v pogojih, ki so čimbolj podobni naravnim pogojem na mestu vzorčenja. Vzorcem smo dodajali različne kombinacije encimov ter v enakih časovnih intervalih določali koncentracije proteinov in ogljikovih hidratov med eksperimentom.

Sestavo in strukturne spremembe (možne načine povezav posameznih kemičnih skupin) izbranih vzorcev (pred in po encimski razgradnji) smo spremljali tudi s pomočjo FTIR spektroskopije (Fourier transform infrared spectroscopy).

Iz strukturnih sprememb, ki se dogajajo med encimsko razgradnjo smo želeli dobiti vpogled v spremembe, ki naj bi se dogajale v naravi kot posledica delovanja mikroorganizmov.

Dosedanje raziskave kažejo, da je mehanizem nastanka makroagregatov povezan z visokimi koncentracijami raztopljenih makromolekul fitoplanktonskega (pretežno diatomejskega) izvora, ki nato agregirajo. Kljub temu pa sam pojav sluzenja morja in vloga mikroorganizmov v tem pojavu še nista v celoti razjasnjeni. Ker ostajata medsebojna povezava strukturnih komponent in mehanizem postopne (sekvenčne) mikrobne razgradnje makroagregatov še vedno pomembni neznanki, je bil cilj diplomskega dela prispevati k razjasnitvi teh problemov s postopno encimsko razgradnjo heteropolisaharidov, proteinov in lipidov v makroagregatih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POJAV MAKROAGREGATOV V SEVERNEM JADRANU

Nastanek sluzastih makroagregatov je izjemno star naraven pojav v severnem Jadranu. Prvi zapisi o sluzenja morja segajo daleč v leto 1729, ko je omenjen izraz *mare sporco* za sluzaste makroagregate (Fonda-Umani in sod., 1989). Obstaja več izrazov, ki opisujejo s sluzenjem morja povezane pojave, kot so *cvetenje morja* in *morski sneg*. Sam pojav »sluzenja morja« (aglomeracije polimernih molekul v velike *makroagregate*, včasih imenovane kar "sluz") pa ne smemo enačiti s t.i. "*cvetenjem morja*" (algal bloom), kjer gre za prekomerno namnožitev fitoplanktonskih organizmov (masovni razvoj enoceličnih, mikroskopsko majhnih alg), ki je v našem morju del vsakoletne fitoplanktonske dinamike. Podobno, tudi t.i. "*morski sneg*" oziroma prisotnost makroskopskih (očesu vidnih) lebdečih delcev (premer $>0,5$ mm), je v priobalnih vodah že dolgo znan in stalen pojav za severni Jadran. Sestava morskega snega je v veliki meri podobna sestavi sluzastih makroagregatov (polisaharidne fibrile, bakterije, fitoplankton, mineralni delci, biogeni detrit in drugo), vendar njegova prisotnost ne vodi vedno do oblikovanja sluzastih makroagregatov. Le-ta pa je prav tako pomemben za regulacijo vertikalne razporeditve in transport suspendirane snovi v vodnem stolpcu.

Pojav makroagregatov je izjemno zapleten in ga tudi danes še ni mogoče popolnoma razložiti. Makroagregati se običajno pojavijo pozno spomladi oziroma zgodaj poleti, popolnoma pa izginejo ponavadi s homogenizacijo vodnega stolpca (npr. zaradi neviht) jeseni (Penna in sod., 2000). Makroagregati so amorfne želatinaste, sluzaste mase različnih oblik kot so: kosmiči, nitke, mreže, oblaki, zavese, površinske odeje (Stachovitsch in sod., 1991). Predstavljajo nekakšno omrežje oziroma matriks v katerega se ujamejo različni organski in anorganski delci. Lahko jih najdemo na morski površini, vzdolž celega vodnega stolpca in na morskem dnu (Slika 1). Makroagregati so lahko različnih velikosti od nekaj milimetrov pa do več kilometrov. Lahko se pojavljajo v dokaj širokem spektru barv, od mlečno belih, rdečkastih do rjavkastih, rumenih in zelenih (Stachovitsch in sod., 1991).



foto: Kovač N.

foto: Makovec T.

foto: Makovec T.

Slika 1: Makroagregati na morski površini; v vodnem stolpcu; na morskem dnu

2.2 NASTANEK MAKROAGREGATOV

Severni Jadran ima geografski položaj in hidrografske pogoje, ki so ugodni za nastanek makroagregatov. Oligotrofne vode Sredozemskega morja potujejo z morskim tokom vzdolž Hrvaške obale, pridejo do plitve obale severnega Jadrana in vzdolž italijanske obale gredo nazaj v Sredozemlje (Heissenberger in sod., 1996). Posebne razmere se oblikujejo pozno spomladi in poleti, ko je severni Jadran praktično izoliran od ostalega Jadrana in ni prej omenjene cirkulacije. Oligotrofnim vodam se pridružijo spomladanske z nutrienti bogate vode severnojadranskih rek, ki ob ugodnih meteoroloških pogojih ustvarijo močno stratificiran vodni stolpec z veliko količino nutrientov. Stratificiran vodni stolpec z veliko količino nutrientov, ugodni meteorološki pogoji, malo vetra in visoke temperature predstavljajo ugodno okolje za prekomerno namnožitev fitoplanktonskih celic, kar je po večini avtorjev *glavni predhodnik* nastanka makroagregatov.

V literaturi navajajo več možnih teorij nastanka makroagregatov, ki poudarjajo pomen določenih abiotskih ali biotskih dejavnikov, kot so:

- pogoji okolja (geografski, meteorološki in hidrološki dejavniki),
- sladkovodni vnosi,
- hranila (neravnotežje N/P razmerja),
- virusne infekcije (liza celic), bakterijska aktivnost,
- “grazing” ali “paša”, spremembe predatorskega pritiska (Degobbis in sod., 1999) in še drugih.

Večina avtorjev pa soglaša, da so makroagregati severnega Jadrana fitoplanktonskega izvora ter da so za pojav sluzenja morja pomembni trije glavni procesi:

- prekomerna namnožitev fitoplanktonskih celic, hiperprodukcija mukopolisaharidov bakterijskih celic in sluzastih eksopolimerov fitoplanktonskih celic.

Do prekomerne namnožitve fitoplanktonskih celic (Herndl, 1992) lahko pride zaradi naslednjih dejavnikov:

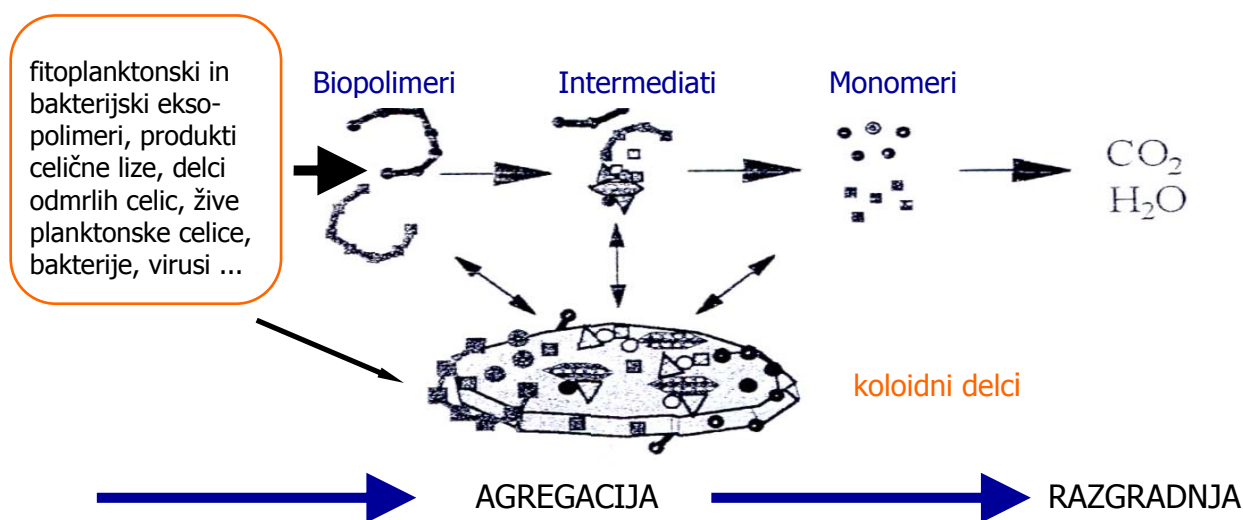
- ugodni meteorološki in hidrografski pogoji (malo vetra, visoke temperature morja, visoko stratificiran vodni stolpec zaradi slabega mešanja vodnih mas), nastanek piknokline (zaradi velike količine padavin in vnosa sladke vode z rekami ter plitvega vodnega stolpca)
- visoka količina nutrientov, bodisi zaradi normalne spomladanske in zimske regeneracije nutrientov z izmenjavo vodnih mas, bodisi zaradi dodatnega zunanjšega vnosa nutrientov z rekami (večje konc. fosforja, dušika, silicija in drugih nutrientov ; Faganeli in sod., 1995)
- ob veliki gostoti fitoplanktona nezmožnost zooplanktona, da kontrolira njihovo število (prenizka stopnja «grazinga» oz. «paše»)
- premajhen delež virusnih infekcij in bakterijske aktivnosti.

Vsi ti dejavniki lahko prispevajo k prekomerni namnožitvi fitoplanktonskih celic, ki na svoji površini izločajo velike količine lepljivih, sluzastih eksopolimerov.

Povečana produkcija sluzastih eksopolimerov fitoplanktonskih celic in mukopolisaharidov pri bakterijah pa je lahko posledica:

- pomanjkanja hranil (predvsem fosforja in dušika) in sprememb N/P razmerja. To se lahko zgodi npr. proti koncu "cvetenja" fitoplanktona, ko celice porabijo hranila vnešena z nutrientno bogatimi vodami (molsko N/P razmerje je lahko nad 100, za fitoplankton pa je optimalno 15)
- pomanjkanja svetlobe (Šolić in Krstulović, 2000)
- visoke temperature morja

Zaradi zgoraj navedenih procesov se pojavi v morju velika količina raztopljenih makromolekul, ki potem tvorijo koloide, ti pa so predpogoj za nastanek makroagregatov (Kovač in sod., 2004). Makromolekularni koloidi lahko nadalje tvorijo nežne fibrile (Slika 2), ki se nato povežejo in organizirajo v manjše in potem v večje agregate.



Slika 2: Shema agregacije in razgradnje biopolimernih molekul v makroagregatih (Hedges in Keil, 1999)

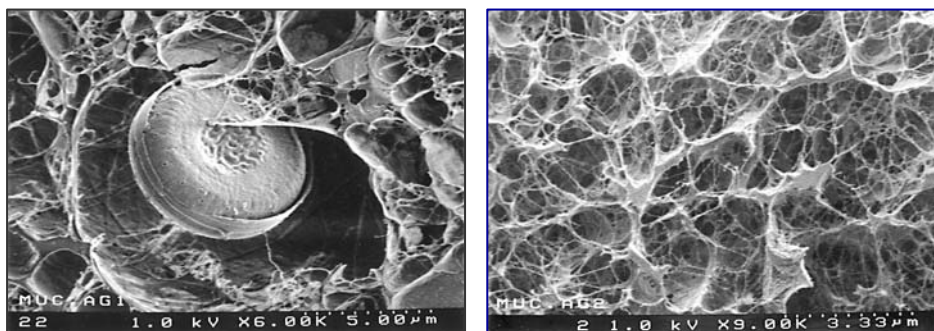
Na takšno lebdečo maso (polimerno mrežo), ki je sama po sebi lepljiva se ujame vse več fitoplanktona, mineralnih delcev, frustul diatomej, bakterioplanktona, zooplanktona, hitinskih oklepov rakcev, detrita in dr. To povzroči povečanje mase in površine agregatov ter njihovo utrjevanje (Heissenberger in sod., 1996).

Celotna struktura makroagregatov se poveže s polisaharidnim matriksom sestavljenim iz eksopolimerov fitoplanktonskih in bakterijskih celic ter postane bolj kompaktna. Pri tem je pomembna povečana produkcija eksopolisaharidov fitoplanktonskih in bakterijskih celic. V procesu nastanka in povezave makroagregatov imajo ključno vlogo, poleg eksopolimerov fitoplanktonskih celic, tudi bakterije, ki izločajo svoje mukopolisaharide in s tem kontrolirajo nadaljni razvoj in strukturo makroagregatov (Azam in sod., 1999). Poleg teh tudi virusi z lizo okuženih fitoplanktonskih celic, cianobakterij in ostalih heterotrofnih bakterij povzročijo sproščanje njihove vsebine v mrežo makroagregatov ter jih s tem dodatno utrdijo. Makroagregate lahko primerjamo z bakterijskim biofilmom, kjer se bakterije pritrjujejo na razpoložljivo površino, le da makroagregati niso sestavljeni le iz bakterij.

2.3 KEMIČNA SESTAVA MAKROAGREGATOV

Dosedanje kemične analize makroagregatov so pokazale, da so le-ti sestavljeni iz vode (95-99 %). Ostalih 1-5 % predstavlja suho snov. Delež organske snovi v preostali suhi snovi iznaša 18-57 %. V organski snovi prevladujejo ogljikovi hidrati (okoli 79 %), manj pa je proteinov (do 8 %) in lipidov (okoli 1 %). Ostali delež pripada nedoločenim organskim sestavinam.

Iz kemične sestave opazimo, da makroagregati vsebujejo največ vode, kar je povezano z gelsko naravo makroagregatov. Zato v literaturi uporabljajo tudi izraz makrogeli. Gelska narava makroagregatov je pogojena tudi z izredno visokimi povprečnimi molskimi masami molekul, ki jih sestavljajo. S posnetki TEM so ugotovili, da osnovo makroagregatov predstavljajo polisaharidne fibrile (Slika 3).



Slika 3: Posnetek makroagregatov s TEM; vidno polisaharidno omrežje oz. matriks in fibrile (Kovač in sod., 2005)

Spektroskopske analize FTIR ter ^1H in ^{13}C NMR so pokazale, da so v makroagregatih poleg vode in anorganskih snovi prisotne 4 glavne organske sestavine: ogljikovi hidrati, estri in amidne funkcionalne skupine, alifatske in organo-silicijeve spojine. Proteinske in alkilne verige so preko amidne in esterske vezi vezane na sladkorne enote. V manjši meri so prisotne še aromatske spojine, najverjetneje iz aromatskih kislin, v bolj «zrelih» (starejših) makroagregatih pa tudi iz huminskih kislin.

Za makroagregate je značilno visoko razmerje C/N, kar je lahko posledica večje količine ogljikovih hidratov glede na proteine, lahko pa nam nakazuje bolj zrelo (razgrajeno)

stopnjo makroagregatov, ko imamo več »stare« organske snovi (Kovač in sod., 2002; Kovač in sod., 2004). Prav tako je v »zrelejših« makroagregatih prisoten večji delež organo-silicijevih in alifatskih (lipidnih) sestavin glede na ogljikove hidrate. Večji delež organo-silicijevih spojin nakazuje na stabilizacijo celotne strukture pri bolj »zreli« stopnji makroagregatov, zaradi povezav s frustulami diatomej in eksopolisaharidi fitoplanktona in bakterij. Vzporedno zmanjšanje deleža polisaharidov pa naj bi bila posledica mikrobne in fotokemične razgradnje polisaharidov.

V vodi netopna frakcija makroagregatov je sestavljena pretežno iz alifatskih spojin in mineralnih delcev in ima nižjo vsebnost ogljikovih hidratov. Vodotopna frakcija makroagregatov vsebuje višje koncentracije ogljikovih hidratov in nižje alifatskih ogljikovodikov (Kovač in sod., 2004); med oligosaharidi izstopata maltoza in pentaoza (Penna in sod., 2003). Dosedanje študije razgradnje vzorcev makroagregatov s pomočjo spektroskopskih metod so pokazale, da se skozi razgradnjo makroagregatov ohranja tudi določen del proteinske komponente, najverjetneje zaradi njene reakcije z bioorganskimi ostanki ter nadaljnje vgradnje v zamreženo strukturo makroagregatov. Podobnost med vodotopno frakcijo makroagregatov in makromolekularnimi izločki diatomej nakazuje, da so slednji prekursorji oz. predhodniki makroagregatov (Kovač in sod., 2002; Kovač in sod. 2004).

Stabilnost makrogelne strukture je povezana z asociacijami organske snovi in mineralnih delcev, ki predstavljajo pomembno frakcijo v strukturi in razvoju sluzastih makroagregatov severnega Jadrana. Analize anorganske frakcije kažejo vsebnost glavnih ionov morske vode, kalcita, kremenca in mineralov glin oziroma vsebnost elementov kot so Na, Cl, C, O, Mg, Al, Si, S, K, Ca in Fe (Kovač in sod., 2002).

2.4 BIOLOŠKA SESTAVA MAKROAGREGATOV

Biološka sestava sluzastih makroagregatov je zelo različna v smislu zastopanih vrst in stopnje razgrajenosti prisotnih celic. Razlikuje se glede na »starost« (stopnjo razvitosti - delež agregiranih molekul in stopnjo razgrajenosti) makroagregatov in znotraj različnih

delov sluzaste mase makroagregatov. V svežih vzorcih prevladujejo žive celice nad delno razgrajenimi in njihovimi anorganskimi ostanki npr. frustulami (Kovač in sod., 2005). V makroagregatih je prisotno veliko število mikrohabitatov (Azam in sod., 1999; Verdugo in sod., 2004), tako da so tudi združbe organizmov, ki jih naseljujejo, različne. Organizmi v makroagregatih so:

- zooplankton (npr. bičkarji, migetalkarji, ličinke rakcev), ki je v večji meri zastopan v «zrelejših» oz. «starejših» makroagregatih
- fitoplankton (različne vrste mikroalg); najbolj pogoste so diatomeje ali kremenaste alge (*Cylindrotheca sp.*, *Rhizosolenia sp.*, *Chaetocheros sp.*, *Cyclotella sp.* in druge) potem dinoflagelati (npr. *Prorocentrum sp.*, *Heterocapsa sp.*), kokolitoforidi in drugi (Baldi in sod., 1997; Kovač in sod., 2005)
- bakterije (njihova filogenetska sestava je izjemno raznovrstna), najbolj pogoste pa so iz skupin: *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*, ε -*Proteobacteria*, *Planctomyces* (Riemann in sod., 2000)
- cianobakterije: npr. *Synechococcus sp.*, *Cyanothece sp.* in druge
- prisotne so celo anaerobne bakterije, sulfat-reducirajoče (Riemann in sod., 2000) in metanogene bakterije (znotraj posameznih flokul imamo lahko anaerobna okolja)

Filogenetska raznolikost bakterij je posledica mikrohabitatov znotraj sluzi. Lahko bi primerjali posamezne flokule znotraj sluzastih makroagregatov s tistimi v bioreaktorjih, kjer imamo izjemno kompleksne mikrobne združbe. V makroagregatih je prisotno precej več bakterij (še posebej v bolj zrelih makroagregatih) kot v okolni morski vodi. V morski vodi je gostota bakterij običajno $10^3 - 10^6$ /ml, v makroagregatih pa lahko doseže celo $10^8 - 10^9$ /ml (Šolić in Krstulović, 2000). Skoraj vse bakterije (75 %) znotraj makroagregatov imajo obilno kapsulo iz mukopolisaharidov, medtem ko jih pelagične bakterije nimajo. Kapsula jim omogoča zaščito pred prodiranjem virusov, pritrditev na površino in kopičenje ektoencimov, ter je past za nutiente (Azam in sod., 1999).

2.4.1 Interakcije znotraj mikrobne združbe makroagregatov

Polisaharidne fibrile so osnovna enota makroagregatov (Penna in sod., 2000). Te tvorijo polimerne povezave med različnimi biotskimi in mineralnimi komponentami

makroagregatov ter tako sestavljajo 3D omrežje, ki vpliva na fizikalne lastnosti makroagregatov (kot so poroznost, gostota, trdnost in plovnost). Fibrile naj bi predstavljale polimerne povezave oz. "mostove" med bakterijami, fitoplanktonom, zooplanktonom, detritnimi delci, biogenimi silikati, mineralnimi delci in delci glin (Leppard, 1999). Polisaharidne fibrile so izjemno površinsko aktivni polimeri, sposobni vezave MnO_2 , $\text{FeO}(\text{OH})$, SiO_2 in CaCO_3 , ekstracelularnih encimov in potrebnih koencimov (različnih kovin). Poleg tega lahko imobilizirajo toksične spojine, spreminjajo površinske karakteristike in interakcije suspendirajočih molekul ter prilagajajo topnost in dostopnost sosednjih molekul (Verdugo in sod., 2004).

Makroagregati predstavljajo mikroorganizmom:

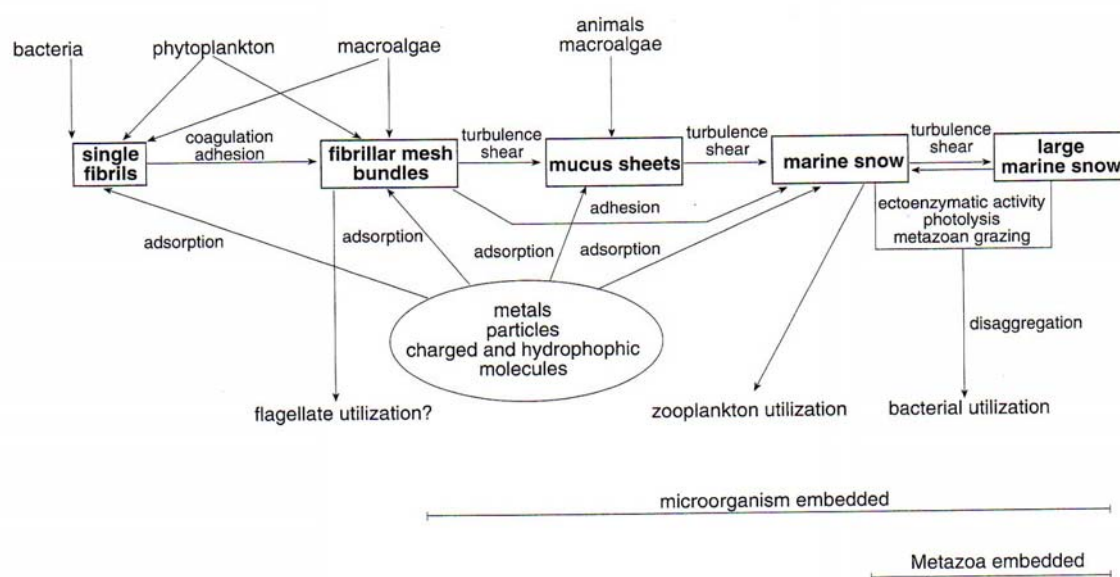
- številne mikrohabitate (aerobne in anaerobne),
- površino za pritrdjevanje,
- substrat za prehranjevanje,
- zaščito pred predatorji in
- mesta velikih količin potrebnih nutrientov («hot spots») (Verdugo in sod., 2004).

Kompleksen substrat kot je sluz, bakterije razgrajujejo s produkcijo velikih količin najrazličnejših ektoencimov, kot so: proteaze, glukozidaze, aminopeptidaze, lipaze, nukleaze, permeaze in drugi. Celice znotraj makroagregatov predstavljajo substrat za bakterijsko rast, bakterije so se temu primerno prilagodile in izločajo ekstracelularne encime, ki jim omogočajo razgradnjo substrata že v nekaj minutah. Bakterije učinkovito hidrolizirajo prisotne polimere in hitro prilagodijo spekter encimov glede na razpoložljiv substrat. Pri "mlajšem"orskem snegu imamo večjo aktivnost α -glukozidaze, pri "zrelejšem" pa β -glukozidaze in lipaze. Razlog temu je, da se sestava makroagregatov konstantno spreminja. Aktivnosti encimov bakterij makroagregatov so tudi do 700-krat višje kot pri pelagičnih bakterijah. Višjo aktivnost od glukozidaz imajo fosfataze in proteaze, najverjetneje zaradi pomanjkanja fosforja (Herndl in sod., 1999).

Novejše raziskave so dokazale ključno vlogo bakterijskih encimov pri obstoju oz. razgradnji makroagregatov (Verdugo in sod., 2004). Potrjujejo namreč, da je vrsta in

stopnja ekspresije bakterijskih encimov določena z razmerami znotraj makroagregatov (vrsta in količina substrata); npr. pomanjkanje anorganskega fosforja vodi do maksimalne ekspresije in aktivnosti fosfataz, kar povzroči sproščanje fosforja, ne le za bakterije, temveč tudi za fitoplanktonske celice.

Vsi organizmi v makroagregatih so medsebojno povezani in vplivajo eni na druge (Slika 4). Fitoplanktonske in druge celice predstavljajo površino za pritrjevanje in substrat za bakterije, bakterije pa poskrbijo s svojimi encimi za permeabilnost makroagregatov in dotok nutrientov za fitoplankton. Poleg tega bakterije pri razgradnji visokoorganskih polimerov makroagregatov sproščajo več raztopljenega organskega ogljika (DOC) kot ga porabijo. Tako priskrbijo nekaj ogljika tudi pelagičnim bakterijam. Fitoplankton in bakterije so vir hrane za protozoje (npr. bičkarje, migetalkarje), njihovi fekalni peleti, odmrle celice in odmrle celice fitoplanktona pa so substrat z nutrienti za bakterije.



Slika 4: Shema nastanka in razgradnje makroagregatov ter interakcij med organizmi (Leppard, 1999)

2.5 RAZGRADNJA MAKROAGREGATOV

Sluzasti makroagregati so izjemno obstojna formacija v vodnem stolpcu. Najpogosteje se oblikujejo na stičnih (mejnih) površinah, kot so: interfaza (oz. meja) morska površina-zrak;

stične površine vodnih mas (npr. piknoklina) in interfaza sediment-morska voda. Makroagregati se ponavadi kopičijo v območju piknokline (najdemo jih na globini 7-15 m, kjer je ta običajno prisotna), kar jim omogoča dolgi obstoj pri ugodnih meteoroloških in hidrografskih pogojih, kadar ni velikih turbulenc vodnih mas.

Razkroj obstoječih formacij sluzi lahko povzročijo različni fizikalni, kemični in biološki procesi, večinoma pa gre za povezavo vseh prej omenjenih procesov. Močno neurje lahko povzroči razpad nežnih agregatov (zgodnja faza agregacije koloidov), kot tudi «zrelih» makroagregatov (konec poletja oziroma zgodaj jeseni), kar lahko bistveno prispeva k ponoru samega pojava sluzenja. Kljub temu je razgradnja makroagregatov večinoma odvisna le od aktivnosti bakterij znotraj njih. Bakterije razgrajujejo organopolimerne substrate v makroagregatih, vendar tudi same izločajo svoje mukopolisaharide, ki so po drugi strani izjemno odporni na mikrobno razgradnjo. Torej bakterije hkrati razgrajujejo in utrjujejo makroagregate, kar je razumljivo, saj le-ti zanje predstavljajo določen habitat z vsemi potrebnimi hranili. Poleg fizikalnih in mikrobnih procesov pa so za razgradnjo makroagregatov pomembne še fotokemične pretvorbe. Fotokemična razgradnja je v plitvem, obalnem vodnem stolpcu zelo pomembna. Pri tem nastali nižjemolekularni fotoprodukti oz. biološko uporabnejše spojine, so del remineralizacijskega procesa makroagregatov. Predstavljajo substrate za mikrobno rast in s tem stimulacijo nadaljnje bakterijske razgradnje (Kovač, 1999).

Razporeditev makroagregatov, tako horizontalna kot vertikalna, je časovno zelo hetoregena in odvisna od različnih abiotskih (hidrometeorološke značilnosti vodnega stolpca, pogoji okolja, velikost in kemična sestava makroagregatov) in biotskih dejavnikov (biološka sestava, aktivnost/metabolizem organizmov). Makroagregati imajo lahko v vodnem stolpcu različne usode: potonejo na dno, se dvignejo na površje, oziroma se gibljejo vertikalno v različnih globinah vodnega stolpca. Dvig na površje povzroči metabolizem bakterioplanktona, zooplanktona in fitoplanktona (Azam in sod., 1999). Sproščujoči mehurčki metabolnih plinov (npr. O_2 , CO_2 , CH_4 , N_2) lahko dvignejo oblake sluzi na površje, kjer se ta fizično razbije z morskim valovanjem ter se naprej razgrajuje s fotodegradacijo zaradi UV-sevanja in seveda z metabolizmom planktona. Makroagregati,

ki potonejo na dno, postanejo del sedimentirane organske snovi. V obeh primerih mikroorganizmi to organsko snov razgradijo in prihaja do remineralizacije organskega ogljika pri kroženju organske snovi v morju.

2.5.1 Odziv morskega ekosistema na prisotnost makroagregatov

Makroagregati na površju imajo negativne posledice zaradi tega, ker masa celic, ki se nahaja na morski površini, preprečuje pretok svetlobe (fotonov) in na ta način reducira primarno produkcijo spodaj ležečega fitoplanktona (Herndl, 1992). Poleg tega velike mase (predvsem površinski makroagregati) sluzi negativno vplivajo na turizem. V vodnem stolpcu se v sluz ujame veliko število ličink pelagičnih organizmov in jajčec rib, kar onemogoča njihovo preživetje. Posledica tega je zmanjšanje števila odraslih osebkov vseh vrst in velika materialna izguba v marikulturi (gojenje rib in školjk) in ribištvu. Poleg tega pa sluz (npr. veliki oblaki sluzi) maši in trga ribiške mreže, kar zmanjša ulov in s tem ekonomski doprinos te dejavnosti.

Najslabše posledice imajo verjetno makroagregati, ki se posedejo na morsko dno. Zaradi visoke koncentracije organske snovi na meji sediment-voda pride do visoke aktivnosti bakterij sedimenta (remineralizacija POC v DOC) in zmanjšanja koncentracije O_2 . Na ta način je difuzija O_2 v sediment omejena dvakrat: skozi piknoklino in na meji sediment-voda ter zaradi tega lahko nastopijo anoksični pogoji (Herndl, 1992). Poleg tega pride do neenakomerne porazdelitve suspendirane organske snovi v sedimentu, kar vpliva na kroženje organske snovi v morju. Formacije sluzi, ki potonejo na dno, prekrijejo večino bentoške favne (najbolj prizadete so spužve, korale, školjke, ožigalkarji in iglokožci) in mehansko zamašijo filtratorske mehanizme, respiratorne in prehranjevalne odprtine teh organizmov ter povzročijo njihov pogin.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ORIS PODROČJA RAZISKAVE

Tržaški zaliv, ki vključuje Tržiški, Miljski, Koprski in Piranski zaliv je najsevernejši del Jadranskega morja (Slika 5). Meri okrog 550 m², globina samega zaliva pa ne presega 30 m. Večinoma se giblje okrog 10 m. Reki Soča in Timav sta glavna pritoka s povprečnim letnim vnosom približno 170 m³/s oziroma 30 m³/s. Sezonske variacije rečnih dotokov in pojav vetrov (burja in jugo) vplivajo na cirkulacijski režim celotnega severnega Jadrana in s tem Tržaškega zaliva. Cirkulacija je večinoma pod vplivom plimovanja (razpon okoli 0,5 m) in vetrov (burja in jugo), pa tudi pod vplivom jadranskega cirkulacijskega sistema (le-ta poteka v nasprotni smeri urinega kazalca). 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 se večinoma giblje med 33 in 38,5 psu v površinski plasti in med 36 in 38,5 psu pri dnu. Sezonsko nihanje površinske slanosti se odraža v nižjih vrednostih, pozno pomladi s povečanim rečnim dotokom zaradi taljenja snega v Alpah, ko je redkejša plast porazdeljena po celotnem bazenu. Pozimi ima hladna vodna masa visoko gostoto ($\rho_T = 30$). Poleti znaša vertikalni temperaturni gradient 8-10 °C. Slojevitost na račun slanosti in temperature oziroma gostote (nastanek piknokline in termokline) je pogosto vzrok hipoksije (včasih celo anoksije) pri dnu. Močni vetrovi lahko v nekaj dneh premešajo celotni vodni stolpec in na ta način povečajo izmenjavo vodne mase v nekaj dneh do nekaj tednov. Sezonske variacije temperature (zima-poletje) se gibljejo večinoma med 8 in 24 °C na površini, ter 8 in 20 °C pri dnu (Izvajanje monitoringa MBP, 2004). Glavni izvor nutrientov N, P in Si v Tržaškem zalivu je reka Soča. Pomembna procesa v kroženju dušika v zalivu sta nitrifikacija in denitrifikacija, medtem ko se fosfor večinoma deponira v sedimentu.



Slika 5: Geografska lega Tržaškega zaliva v Jadranskem morju (Položaj MBP Piran, 2002)

Pretežno peščen karbonatni površinski sediment v severnem delu Tržaškega zaliva izvira iz nanosov reke Soče, muljeviti južni del zaliva pa je posledica vnosa produktov erozije fliša v severni Istri. Hitrost sedimentacije, določena z ^{210}Pb , je nad 5 mm/leto v manjših zalivih, proti sredini Tržaškega zaliva pade na približno 1 mm/leto. Proti izlivu Soče ponovno narašča do 3 mm/leto. Sedimentirajoči delci so torej sestavljeni iz: avtohtonega morskega biogenega in mineralnega materiala; delcev, ki nastanejo z erozijskimi in abrazijskimi procesi priobalja ter delcev kopenskega materiala vnešenih z rekami.

Posamezni dejavniki, kot so temperatura zraka, smer in hitrost vetra ter porazdelitev padavin lahko neposredno vplivajo na hidrografske razmere in tako usmerjajo razvoj določenih organskih in kemičnih procesov v morju. Povečan sezonski dotok sladke vode z rekami, praviloma pomeni tudi povečan dotok hranilnih snovi, kar ima za posledico povečanje biomase in primarne produkcije ter v določenih primerih, nadalje posledično 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.

3.2 VZORČENJE IN PRIPRAVA VZORCEV

3.2.1 Pregled splošnih hidrografskih pogojev pred in v času sluzenja morja v letu 2004

- Temperatura -

Najnižje temperature morske vode so bile izmerjene v mesecu februarju in marcu (zgornji/5m sloj oziroma srednji/10 in 15 m sloj; okoli 7,7 °C), najvišje pa v mesecu avgustu (površinski sloj; od 25,8 do 26,7 °C). Podobno kot v prejšnjih letih so bile nizke temperature (≤ 10 °C) značilne v prvih štirih mesecih, v maju pa se je začel vodni stolpec razslojevati. Temperaturna razlika površinskih in globljih slojev je bila največja avgusta (Izvajanje monitoringa MBP, 2004) ko je bila termoklina prisotna v globini 5-10 m. Vodni stolp je bil popolnoma premešan od oktobra dalje.

- Slanost -

V splošnem slanost morja kaže največja nihanja v spomladanskem obdobju po koncu deževja, ko je močno povečan dotok sladke vode z rekami. Nižje površinske slanosti < 37 psu so bile predvsem značilne za celotno spomladansko-poletno obdobje, manjši vpliv sladke vode pa je bil viden še v mesecu avgustu (Izvajanje monitoringa MBP, 2004).

- Kisik in nutrienti -

Koncentracije raztopljenega kisika so bile v letu 2004 najvišje marca (okoli 9,60 mg/L) in so postopoma padale do septembra, ko so v povprečju dosegle najnižjo vrednost (okoli 6,20 mg/L). Kljub najnižji izmerjeni vrednosti v poznopoletnih mesecih (okoli 4,8 mg/L) pa se koncentracije raztopljenega kisika niso nikoli pribžale hipoksičnim koncentracijam ($< 2,86$ mg/L).

Najvišje koncentracije nitratov so bile praviloma prisotne v površinskem sloju, ko so bile slanosti najnižje. Najvišje koncentracije amonija in fosfata pa so bile določene v pridnenem sloju v poletno-jesenskih mesecih, kar kaže na razgradnjo organske snovi v sloju pri dnu. Najvišje koncentracije silikata so bile izmerjene v površinskem sloju (pomlad, pozna jesen: rečni vnosi) in tudi v pridnenem sloju (jesen: razgradnja); (Izvajanje monitoringa MBP, 2004).

- Biomasa fitoplanktona -

Na primarne producente, ki potrebujejo hranila za svojo rast in povečanje biomase je vplivala predvsem dinamika hranilnih snovi. V letu 2004 je bila povprečna fitoplanktonska masa višja (1,55-1,92 $\mu\text{g/L}$) kot v letu 2003 (1,19-1,28 $\mu\text{g/L}$). Tudi v tem letu sta bila v

spomladanskih (maj, junij) in jesenskih mesecih (november) prisotna značilna sezonska viška. Avgustovski pridneni višek je bil povezan z neporabljeno, posedlo biomaso. Ob spomladanskem povečanju koncentracij klorofila *a* in abundance so prevladovali mikroflagelati, ob jesenskem pa diatomeje (Izvajanje monitoringa MBP, 2004). V manjših belih kosmičih (komaj nastala sluz) so prevladovali dinoflagelati vrste *Gonyaulax fragilis*, v bolj formiranih (oz. «starejši» sluzi) makroagregatih pa je bil matriks naseljen s tipično združbo organizmov za sluz. Tukaj so bile dominantne diatomeje, potem flagelati in dinoflagelati, cianobakterije, heterotrofne bakterije in drugi organizmi.

- Opazovanje pojavljanja makroagregatov v letu 2004 -

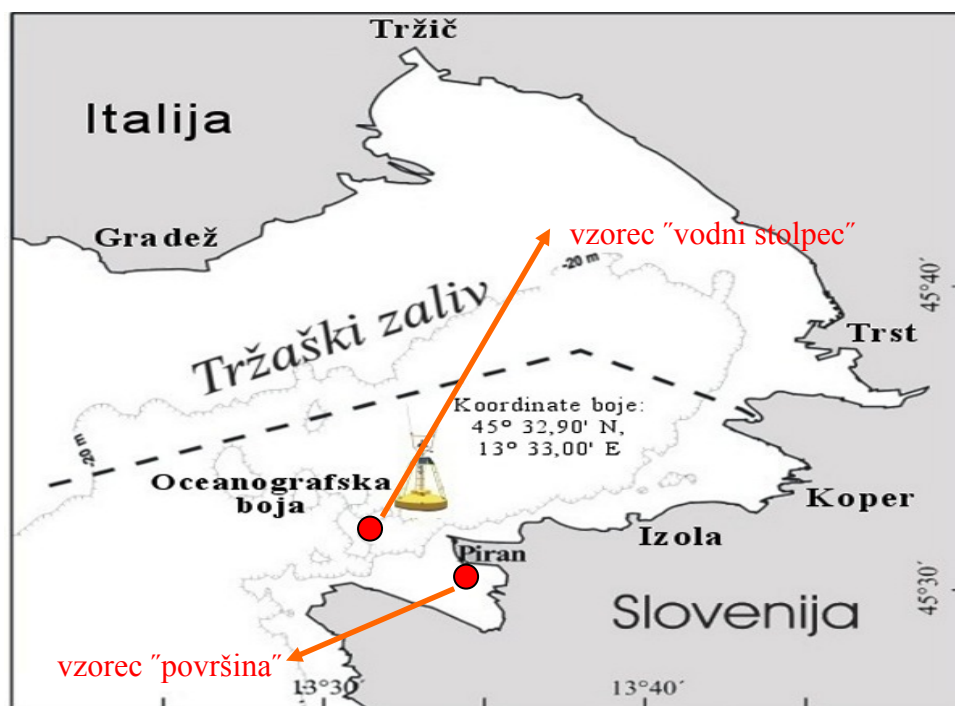
- 18.05.2004 - opažena prisotnost majhnih agregatov, kosmičev (morski sneg) v vodnem stolpcu, v območju približno 3 milje od obale
- 14.06.2004 - podobna opažanja morskega snega kot v mesecu maju
- 15.06.2004 - prisotnost stabilne pene na površini morja
- 16.06.2004 - prva opažanja površinske sluzi (ob obali)
- 24.06.2004 - po neurju, pojav velikih, nekaj kilometrov dolgih, belih površinskih odej. Pred tem so bili v vodnem stolpcu prisotni predvsem agregati v obliki nitk in mrež. V naslednjih dneh je potekala intenzivna agregacija in oblikovanje večjih sluzi, ki so bile prisotne tako na površini morja kot v samem vodnem stolpcu. Tu so se sluzi kopičile v sloju piknokline (na globini okoli 15 m).
- 30.06.2004 - video-posnetki potapljačev potrjujejo prisotnost večjih rumenih oblakov sluzi v celem vodnem stolpcu v času vzorčevanja. Opazili so tudi sedimentirane sluzi, ki so prekrivale organizme na dnu.
- 01.07.2004 - vzorčenje kaže podobno situacijo iz preteklih dni. Še vedno so bili prisotni površinski makroagregati, belo-rumenkaste barve. Potapljači so prav tako poročali o prisotnosti večjih in manjših agregacij v celotnem vodnem stolpcu. Največjo gostoto makroagregatov so opazili na globini 10-15 m. Prisotni so bili tudi veliki makroagregati v obliki gostih trodimenzionalnih prepletov, zaves in oblakov.

Makroagregati ob morskem dnu so prekrivali bentoške organizme in oteževali njihovo dihanje in lokomocijo. Kljub temu pa večjih črnih madežev, ki bi kazali na večje pomanjkanje kisika in anoksijo niso opazili.

Po 5. juliju 2004 so bile opažene le posamične površinske sluzi ter pridneni sluzasti makroagregati. Sredi julija je bil 25-metrski vodni stolpec osrednjega dela zaliva brez agregacij in transparenten (prozoren) do 20 m. V spodnjem 5-m pridnenem sloju pa je bil nakopičen organski material. Kljub junijskemu intenzivnemu sluzenju morja, je bil sam pojav v večji meri prisoten v Tržaškem zalivu le dober mesec.

3.2.2 Vzorčenje

Vzorce smo odvzeli dne 01.07.2004 na dveh različnih lokacijah. Prvi vzorec (vzorec "površina" - P) smo odvzeli na morski površini pred morsko biološko postajo v Piranu (Slika 6). Vzorec je bil odvzet ročno s polietilensko posodo, zaradi kompaktnosti samih makroagregatov je pri tem bila zajeta minimalna količina okolne morske vode. Temperatura morja je bila 26 °C.



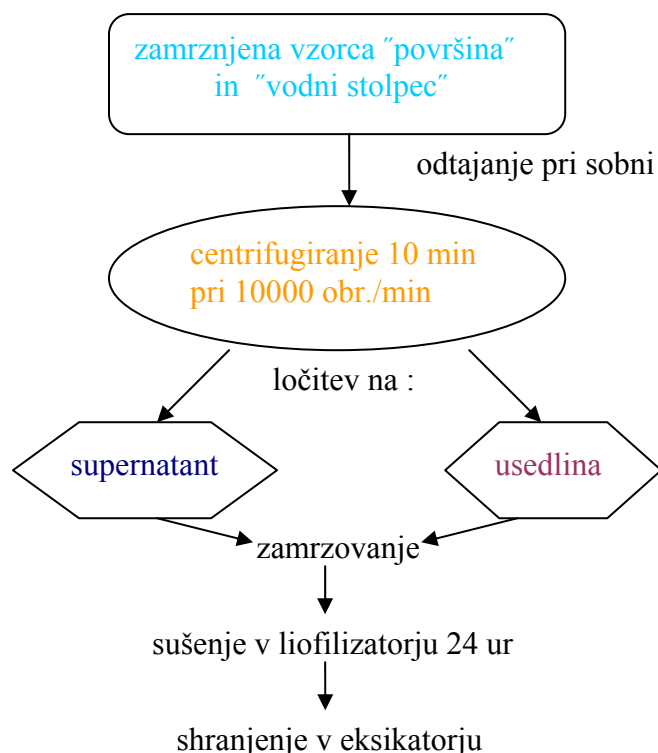
Slika 6: Lokacija vzorčevalnih mest v Tržaškem zalivu

Drugi vzorec (vzorec "vodni stolpec" - V) je odvzel potapljač na postaji s koordinatami 45° 32' N, 13° 33' E (Slika 6), kjer je locirana oceanografska boja MBP Piran, tj. okrog 3 milje od obale v južnem delu Tržaškega zaliva. Vzorec je bil odvzet na globini 10 m, s črpalko v polietilensko posodo. Temperatura morja je bila 24 °C.

Oba vzorca sta bila zelo kompaktna, sluzasta oz. želatinasta. V površinskem vzorcu je bilo nekaj delcev makrofitov in je na prvi pogled izgledal bolj rigiden in želatinast od vzorca iz vodnega stolpca.

3.2.3 Priprava vzorcev (Slika 7)

Do začetka eksperimentalnega dela so bili vzorci shranjeni v posodah v hladilniku pri temperaturi od -20 °C. Vzorce smo nato odtalili na sobni temperaturi (20 °C), razdelili v posode in centrifugirali 10 min pri 10000 obratov na minuto, prav tako na sobni temperaturi. Tako ločene dele makroagregatov, supernatant in bolj rigidno usedlino, smo ločeno zamrznili in nato posušili v liofilizatorju (24 ur). Liofilizirane vzorce smo pri nadaljnjem delu imeli shranjene v eksikatorju.



Slika 7: Shema priprave vzorcev

Vzorci za FTIR analizo smo pripravili tako, da smo po končanem delovanju encimov (čas 360 min) eksperimentalno mešanico (usedline vzorcev, voda in dodani encimi) centrifugirali, ločili vodno fazo in sediment ter ju zamrznili in liofilizirali. Vzorce smo nato poslali na Kemijski inštitut v Ljubljani, kjer je bila narejena FTIR analiza. S FTIR spektroskopijo smo snemali KBr peletke, ki smo jih pripravili iz liofiliziranih naravnih vzorcev (usedlina in supernatant centrifugiranih naravnih vzorcev, ter celoten naraven vzorec) in sicer je bilo dodano 2,6 mg vzorca in 43 mg KBr. V primeru encimsko obdelanih usedlin vzorcev (usedline so bile ločene na vodno fazo in sediment) pa smo imeli na razpolago manj liofiliziranih vzorcev zaradi razgradnje, tako da je bilo dodano le 0,85 do 1,1 mg vzorca in 43 mg KBr.

3.3 ANALIZA VZORCEV

3.3.1 Eksperiment

Eksperiment smo si zamislili, kot ponazoritev oz. simulacijo bakterijske razgradnje makroagregatov v morju. Na ta način smo želeli dobiti več informacij o poteku bakterijske razgradnje makroagregatov ter o strukturnih povezavah med posameznimi komponentami makroagregatov. Načeloma smo se želeli pri našem delu čimbolj približati dejanskim pogojem v morju, v času sluzenja morja. Zato smo pri izbiri encimov za razgradnjo sluzi (makroagregatov) morali upoštevati (Dell'Anno in sod., 2000) :

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

Makroagregati so izjemno kompleksna in zamrežena struktura sestavljena večinoma iz vode, heteropolisaharidov, lipidov, organosilicijevih spojin ter v manjši meri tudi proteinov in mineralov. Med polisaharidi prevladujejo strukturni in rezervni polisaharidi fitoplanktonskih celic, kot so: škrob, celuloza, hemiceluloza, krizolaminarin (β -1,3-glukan) in drugi. Poleg teh pa so prisotni še rezervni in strukturni polisaharidi drugih alg, in bakterij. Zaradi takšne kemične sestave in spektra bakterijskih encimov smo kot glavne

encime za razgradnjo polisaharidov izbrali α -amilazo in β -glukozidazo (Dell'Anno in sod., 2000). Proteinov v makroagregatih ne najdemo v velikih količinah, vendar so skupaj s polisaharidi povezani v kompaktno omrežje glikoproteinskih in alifatskih (lipidnih) verig. Zaradi tega smo izbrali še encime, ki bi deloma razgradili zamreženo strukturo makroagregatov in omogočili dostop do večine strukturnih in rezervnih sestavin. Za te encime smo izbrali proteinazo K in proteazo (Dell'Anno in sod., 2000). Na koncu smo se še odločili, da kot mešanico različnih vrst encimov uporabimo pankreatin, ki vsebuje mešanico različnih encimov, kot so: amilaze, tripsin, lipaze, ribonukleaze in proteaze.

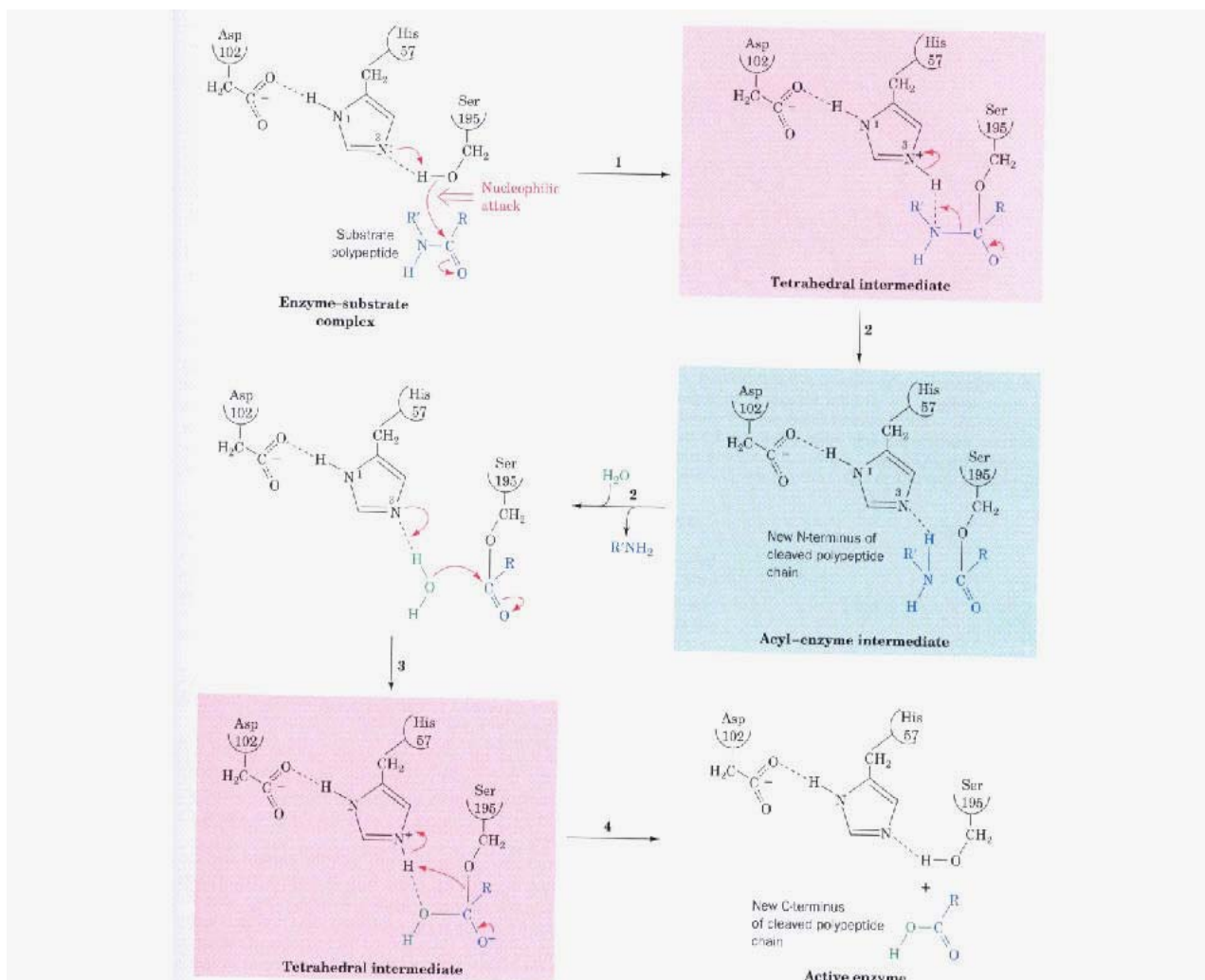
Vzorci sluzastih makroagregatov so izjemno heterogeni in kompleksni. Zaradi njihove gelske narave je delo z njimi izjemno težavno, od vzorčenja, mikroskopiranja do nadaljnjih analitičnih poskusov. Zaradi tega se večinoma dela z liofiliziranimi vzorci, kar smo prakticirali tudi pri našem eksperimentalnem delu. Optimalne količine vzorcev in dodanih encimov (opisani v poglavju 3.3), smo določili s pomočjo literature (Dell'Anno in sod., 2000; Zaccone in sod., 2002; Rath in sod., 1994) in rezultatov eksperimentalnega dela, kjer smo uporabili različne kombinacije količin encimov in vzorcev. Vse kvantitativne spektrofotometrične analize smo delali v večih ponovitvah. Eksperimentalno časovno obdobje smo določili tako da smo najprej poskus spremljali skozi 7-dnevno obdobje ter na ta način ugotovili, da se največje spremembe zgodijo v prvem dnevu, kar smo tudi pričakovali. Eksperimentalne pogoje, temperatura 27 °C, odsotnost pufrov in rahlo stresanje smo izbrali zato, da smo se čimbolj približali dejanskim pogojem v morju.

Med encimsko razgradnjo makroagregatov smo spektrofotometrično spremljali spremembe v koncentraciji ogljikovih hidratov in proteinov; pred in po končanem encimskem delovanju pa smo posneli še FTIR spektre. FTIR spektri so nam omogočili nekaj informacij o strukturnih spremembah komponent v makroagregatih po encimski razgradnji ter vpogled v način razgradnje.

- *Značilnosti izbranih encimov* -

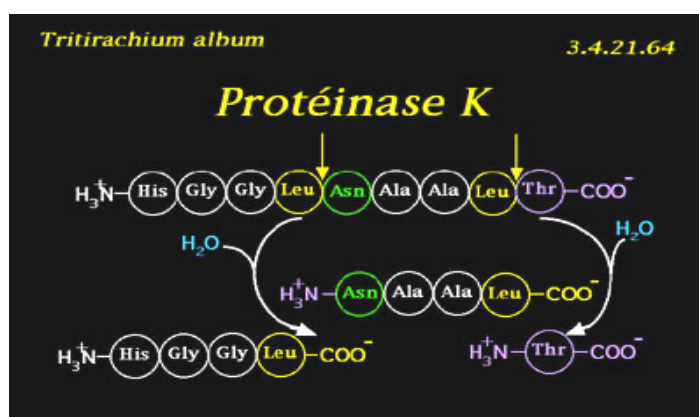
- o **PROTEAZA** je endopeptidaza (Moriyama in Oda, 1992), ki hidrolizira oz. cepi peptidne vezi na karboksilnih ostankih glutamata ali aspartata (Slika 8). Sinonim za

proteazo je pronaza E. Proteaza ima 3 različne proteolitične aktivnosti; v glavnem je serinska proteaza z aktivnim mestom, sestavljenim iz Asp-His-Ser .



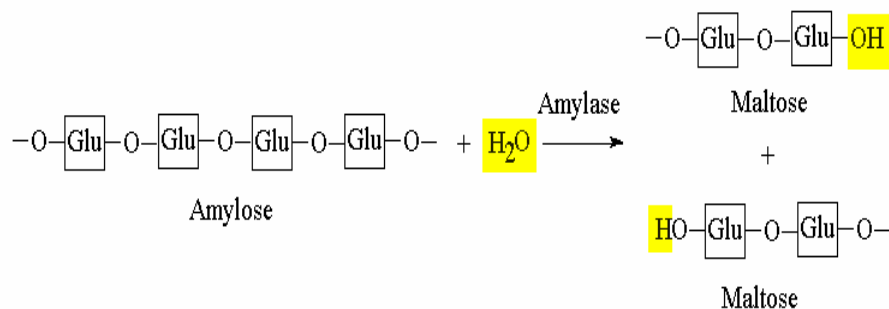
Slika 8: Način delovanja encima proteaze na polipeptid (Enzymes, 2002)

o **PROTEINAZA K** je endolitična proteaza, ki cepi peptidne vezi na karboksilnih ostankih alifatskih, aromatskih oz. hidrofobnih aminokislin (Moriyama in Oda, 1992). Proteinaza K hidrolizira (cepi) proteine, glikoproteine, peptide in estre aminokislin; najmanjši peptid, ki ga cepi, je tetrapeptid (Slika 9). Proteinaza K je serinska proteaza z aktivnim mestom Asp-His-Ser.



Slika 9: Način delovanja encima proteinaze K na polipeptid (Enzymes, 2002)

- o ***α-AMILAZA*** je encim, ki hidrolizira oz. cepi α(1-4) vezi v molekuli škroba in sicer na naključnih mestih vzdolž verige amiloze in amilopektina (Slika 10). Ne more hidrolizirati α(1-6) vezi in zraven ležečih (sosednjih) α(1-4) vezi (Antranikian, 1992). Kompletna hidroliza (cepitev) polisaharidov kot so glikogen in škrob z α-amilazo ima za produkt mešanico kratkih glukoznih oligomerov (dimerov do heksamerov), kot so maltoza in maltotrioza. Poleg oligomerov, pri prolongirani razgradnji oz. hidrolizi nastane nekaj več čiste glukoze.



Slika 10: Način delovanja encima α-amilaze na polisaharide (Enzymes, 2002)

- o ***β-GLUKOZIDAZA*** (sinonim celubiaza) je encim, ki hidrolizira oz. cepi β-glukozide (npr. β-metilglukozid, celubioza, celuloza) na glukozne monomere. β-glukozidaza hidrolizira β(1-6) vezi v glikozidih (polisaharidih in oligosaharidih). β-D-glukozidna veriga se ob vključitvi vode razgradi do D-glukoze in alkohola (Ghost in Ghost, 1992).

- o **PANKREATIN** vsebuje sestavine prebavnega soka pancreasa (trebušne slinavke). Vsebuje mešanico različnih encimov kot so: amilaze, tripsin, lipaze, ribonukleaze, proteaze in druge. Pankreatin razgradi ogljikove hidrate do monomerov.

Encime smo izbrali tako, da imajo optimalno delovanje pri temperaturi inkubacije, torej s temperaturnim optimumom okrog 25-27 °C ter da za njihovo delovanje niso nujno potrebni posebni pufri. Na ta način smo se želeli čimbolj približati naravnim pogojem v morju.

3.3.2 Mikroskopski pregled in gojitev vzorcev

Vzorci smo pregledali pod svetlobnim mikroskopom pri 200- in 400- kratni povečavi, na ta način smo se prepričali o kompleksni in raznovrstni sestavi makroagregatov.

Da bi ugotovili gostoto populacije prokariontov (predvsem število bakterij) znotraj samih makroagregatov, smo vzorce pobarvali tudi z DAPI barvilom. Obarvane vzorce smo opazovali z epifluorescenčnim mikroskopom Olympus BX51 pri 40-, 200- in 2000-kratni povečavi.

Mikroskopsko opazovanje nam je omogočilo vpogled v obsežnost bakterijske populacije znotraj makroagregatov, želeli pa smo izvedeti tudi nekaj informacij o rasti samih bakterij iz vzorcev makroagregatov v *in vitro* pogojih. Nacepili smo po 2 ml redčenega vzorca iz vodnega stolpca (10 mg liofiliziranega vzorca v 10 ml sterilizirane morske vode) na plošče z gojiščem za morske bakterije Zobell-Oppenheimer 2216E. Sestava gojišča **Zobell 2216E**, pH = 7,6 :

- pepton 5 g
- kvasni ekstrakt 1 g
- FePO₄ 0,1 g
- agar 15 g
- morska voda (starana) 750 ml
- destilirana voda 250 ml

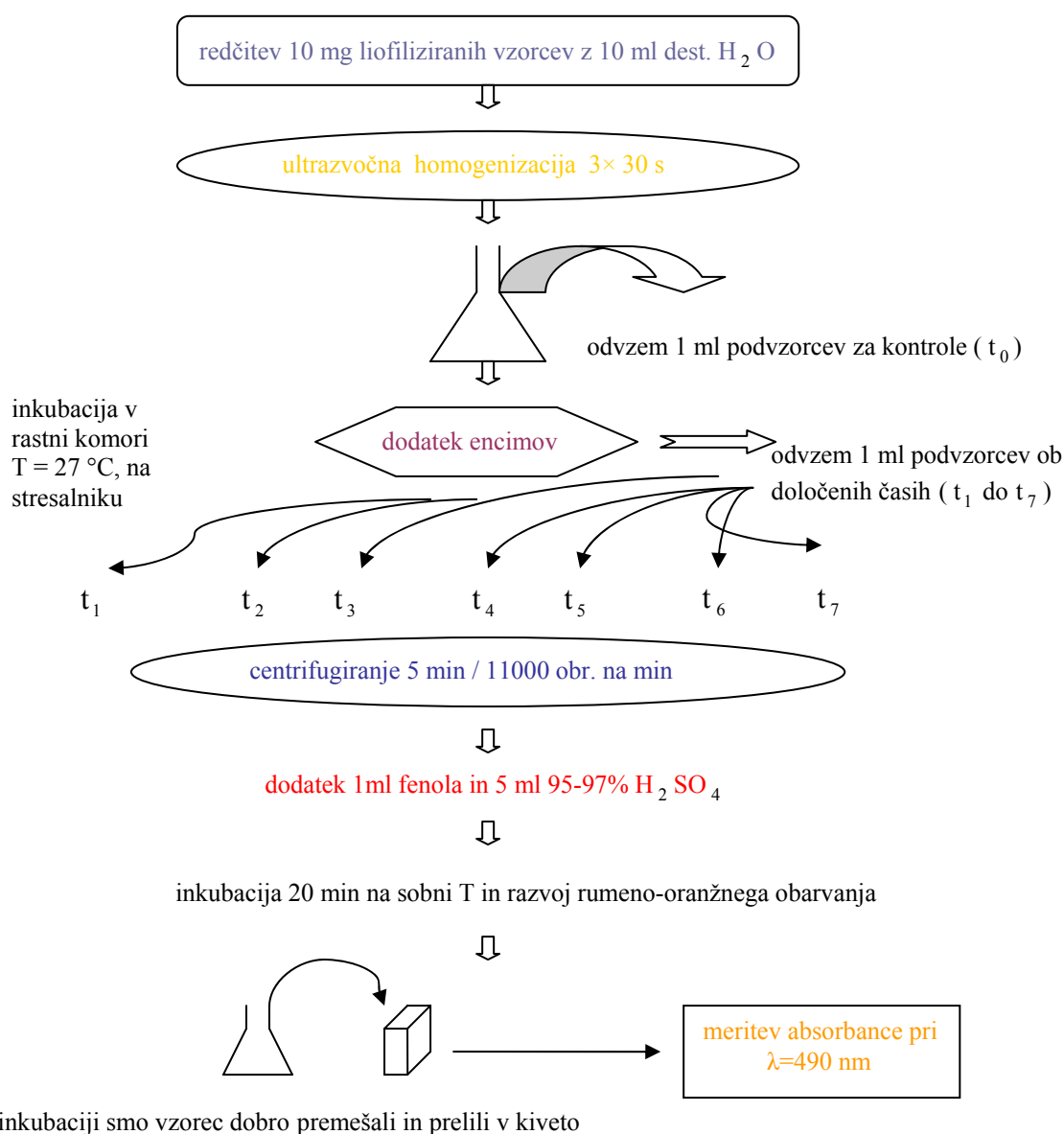
Sterilizacija gojišča je potekala 20 min v avtoklavu pri T=120 °C. Tako nacepljene plošče smo inkubirali 24 ur pri enakih pogojih kot pri encimskem poskusu (T=27 °C).

3.3.3 Določanje sprememb koncentracij ogljikovih hidratov v makroagregatih (Slika 11)

Uporabili smo nekoliko modificirano spektrofotometrično metodo za določanje celotnih ogljikovih hidratov po Duboisu in sod. (1956). Med ogljikovimi hidrati in H_2SO_4 pride do dehidracije, kjer iz pentoz nastane furfural iz heksoz pa hidroksimetilfurfural. Nastali furfurali (aldehidi) tvorijo pri reakciji s fenolom značilno rumeno-oranžno obarvanje.

10 mg liofiliziranih vzorcev smo redčili z 10 ml dest. H_2O ter redčene vzorce narahlo homogenizirali s sonikatorjem (ultrazvočno) 3×30 sekund (Dell'Anno in sod., 2000). Iz homogeniziranih vzorcev smo nato odvzeli 2×1 ml podvzorcev za kontrolo, brez encimov (čas t_0 pri 0 min). Ti podvzorci so pokazatelj razgradnje ogljikovih hidratov kot posledice delovanja mikroorganizmov. Vzorcem smo potem dodali encime bodisi 500 μ l β -glukozidaze in 500 μ l α -amilaze bodisi 1 ml pankreatina. Vsi encimi so bili nabavljeni pri proizvajalcu "Sigma" (ZDA) in smo jih pripravljali v koncentraciji 1 mg/ml.

Vzorce smo ves čas delovanja encimov inkubirali v komori pri temperaturi 27 °C in na stresalniku (zelo rahlo stresanje). Merili smo količino ogljikovih hidratov glede na čas delovanja encimov v časovnem obdobju 360 minut in sicer za 7 različnih časov: t_1 pri 5 min, t_2 pri 10 min, t_3 pri 30 min, t_4 pri 60 min, t_5 pri 120 min, t_6 pri 240 min ter t_7 pri 360 min po dodatku encimov. Pri vsakem izmed časov (t_1 do t_7) smo vzorec v komori premešali in odvzeli 1 ml podvzorca, ga dali v centrifugirko, centrifugirali 5 min/11000 obratov na min., prelili v steklene erlenmajerice ter dodali po 1 ml 5 % fenola in 5 ml 95-97 % H_2SO_4 . Po 20 minutah se je razvilo rumeno-oranžno obarvanje, raztopino smo dobro premešali ter izmerili absorbanco v 1 cm kiveti pri valovni dolžini $\lambda = 490$ nm. Slepa proba je bila 1 ml dest. H_2O z dodanimi reagenti: 1 ml fenola in 5 ml H_2SO_4 . Za izdelavo umeritvene krivulje (priloga A1) smo kot standard uporabili β -D-glukozo (proizvajalec "Sigma", ZDA).



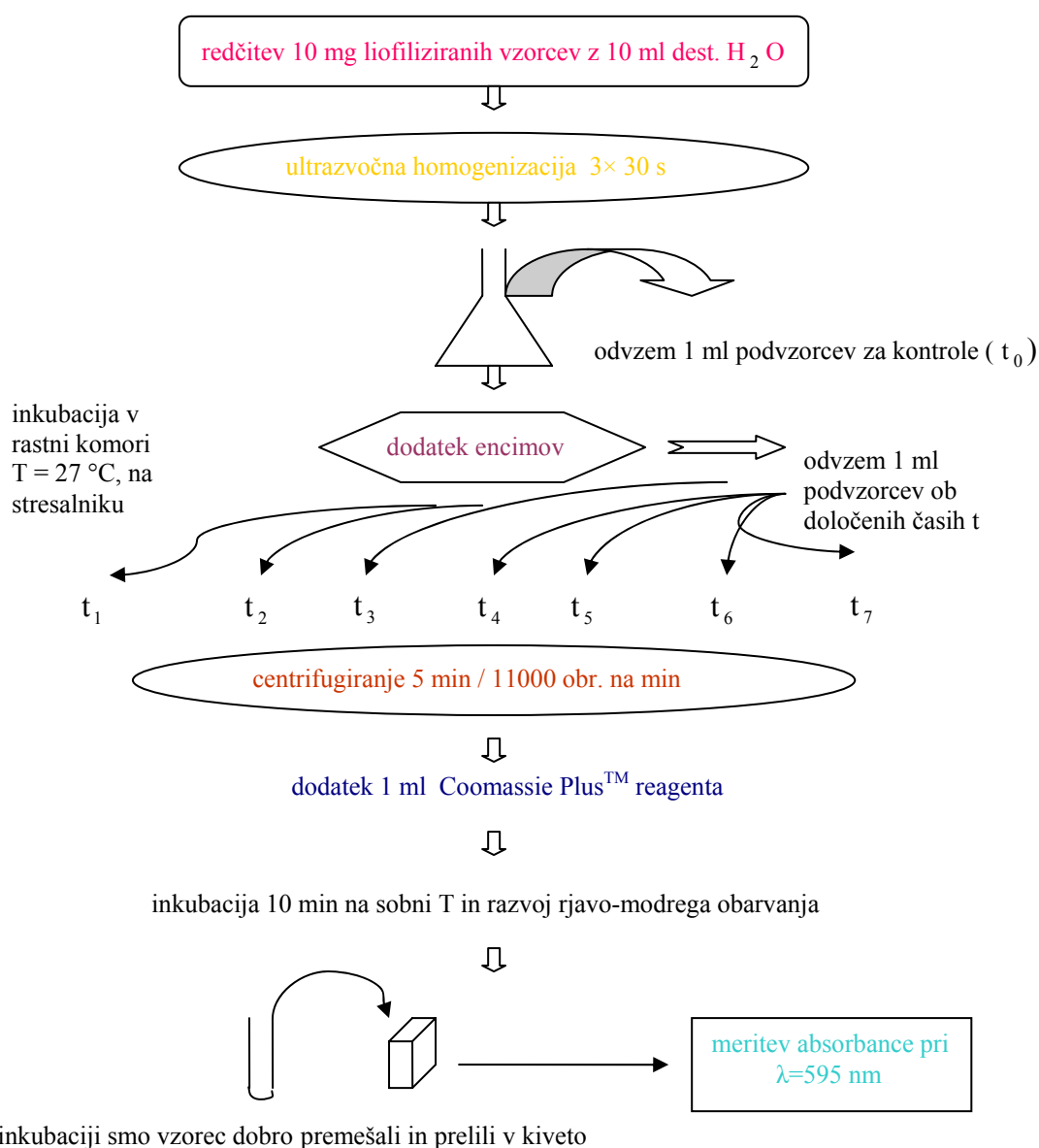
Slika 11: Shema postopka določanja koncentracije ogljik. hidratov s fenolom in H_2SO_4

3.3.4 Določanje sprememb koncentracij proteinov v makroagregatih (Slika 12)

Količino proteinov smo določali z modificirano metodo po Bradfordu, tj. s kolorimetrično metodo *Coomassie PlusTM* (The Better Bradford Assay Kit 23236, Pierce). Gre za spektrofotometrično metodo za določanje koncentracije proteinov, kjer se zunanje kisle sulfonske skupine reagenta Coomassie Brilliant Blue vežejo na zunanje bazične in aromatske skupine aminokislin v proteinih. Pri tem pride do premika absorpcijskega maksimuma od 465 nm na 595 nm in do značilnega, rjavo do modrega obarvanja.

10 mg liofiliziranih vzorcev smo dodali 10 ml dest. H_2O ter redčene vzorce narahlo homogenizirali s sonikatorjem (ultrazvočno) 3×30 sekund (Dell'Anno in sod., 2000). Iz homogeniziranih vzorcev smo nato odvzeli 2×1 ml podvzorcev za kontrole, brez encimov (čas t_0 pri 0 min). Vzorcem smo potem dodali encime bodisi 500 μ l proteinaze K in 500 μ l proteaze bodisi 1 ml pankreatina (Dell'Anno in sod., 2000). Vsi encimi so bili nabavljeni pri proizvajalcu "Sigma" in smo jih pripravljali v koncentraciji 1 mg/ml. Vzorce smo ves čas delovanja encimov inkubirali v komori pri temperaturi 27 °C in na stresalniku (zelo rahlo stresanje).

Merili smo količino proteinov glede na čas delovanja encimov za časovno obdobje 360 minut in sicer za 7 različnih časov: t_1 pri 5 min, t_2 pri 10 min, t_3 pri 30 min, t_4 pri 60 min, t_5 pri 120 min, t_6 pri 240 min, ter t_7 pri 360 min po dodatku encimov. Pri vsakem izmed časov (t_1 do t_7) smo vzorec v komori premešali in odvzeli 1 ml podvzorca ter ga dali v centrifugirko in centrifugirali 5 min/11000 obratov na min. Vzorce smo po centrifugiranju prelili v epruvete ter jim dodali po 1 ml reagenta, dobro premešali in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi, da se je razvilo svetlo plavo do modro obarvanje. Nato smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini $\lambda = 595$ nm na Philips spektrofotometru. Za pripravo slepe probe (vrednost 0), za podvzorce brez dodanih encimov (tj. za kontrolne vzorce), smo uporabili 1 ml dest. H_2O v katero smo dodali 1 ml Coomassie blue reagenta. Za vzorce, kjer so bili dodani encimi smo le-te morali upoštevati pri določanju konc. proteinov, zato smo v tem primeru slepo probo pripravili iz 10 ml dest. H_2O in bodisi 500 μ l proteinaze K in 500 μ l proteaze, bodisi 1 ml pankreatina (glede na to katere od encimov smo uporabili v eksperimentu). Za izdelavo umeritvene krivulje (priloga A2), smo kot standardne raztopine uporabili raztopine z različno koncentracijo BSA proteina (proizvajalec "Sigma", ZDA).



Slika 12: Shema postopka določanja koncentracije proteinov s Coomassie blue reagentom

3.3.5 Strukturna analiza vzorcev s FTIR spektroskopijo

Infrardeča spektroskopija FTIR se uporablja za določanje kemične sestave določene snovi. Temelji na fotonih infrardeče svetlobe z valovnimi dolžinami 2,5-50 μm, ki imajo dovolj veliko energijo za vzbujanje nihanj atomov v molekulah. Pri tem pride do spremembe valenčnega kota med vezmi v molekuli oz. do spremembe dolžine vezi med posameznimi

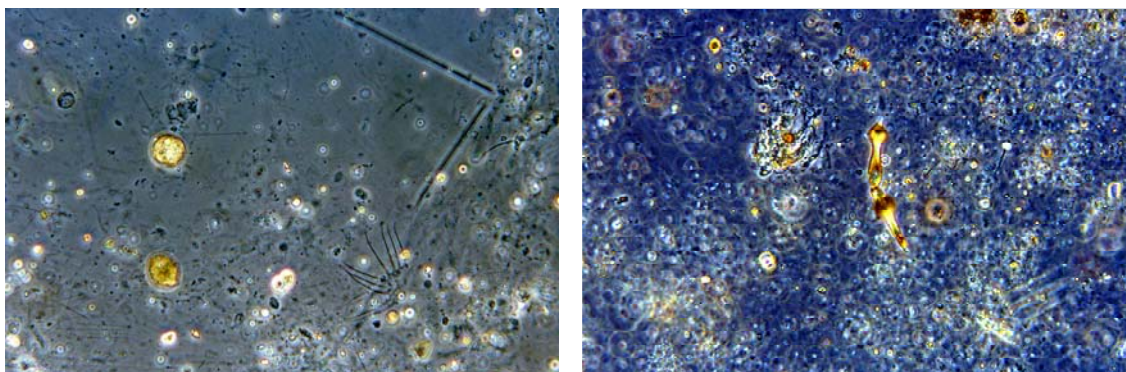
atomi v molekuli. Intenziteta absorpcije infrardeče svetlobe je sorazmerna spremembi dipolnega momenta skupine (oz. molekule), ki to svetlobo absorbira. Pri FTIR analizi dobimo absorpcijske trakove oz. vrhove posameznih tipov vezi (funkcionalnih skupin), ki so prisotne v analiziranem vzorcu. V določenih območjih IR spektra se pojavlja zelo veliko število absorpcijskih trakov, kot posledica različnih funkcionalnih skupin, tako da je njihova določljivost dokaj zapletena. Zato uporabljamo FTIR spektroskopijo v kombinaciji z drugimi metodami (Kovač in sod., 2002).

Infrardeče spektre FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) so posneli s spektrometrom Perkin-Elmer System 2000 z uporabo KBr peletk na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Analize so bile narejene na naravnih vzorcih brez encimov (celoten vzorec, usedlina vzorca in supernatant vzorca) ter na usedlinah vzorcev, ki so bili obdelani z encimi. Zaradi majhnih količin encimov uporabljenih za pripravo vzorčnih raztopin encimov, ki smo jih prav tako v majhnih količinah dodali vzorcem makroagregatov, smo prispevek strukture samih encimov k spektru vzorca zanemarili. Postopek priprave vzorcev za analize z infrardečo spektroskopijo (FTIR) je opisan v poglavju 3.2.3 (glej priprava vzorcev).

3 REZULTATI

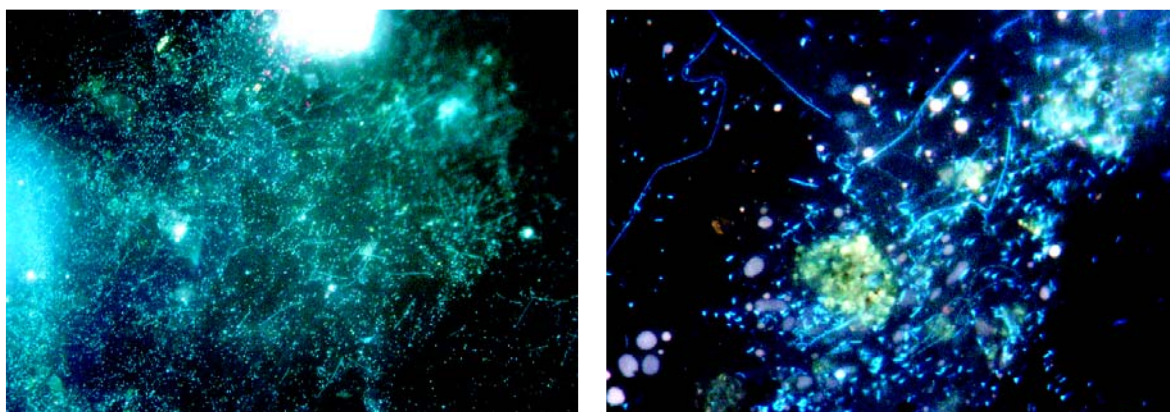
4.1 MIKROSKOPSKI PREGLED VZORCEV

S svetlobnim mikroskopom smo opazili da so sluzasti makroagregati sestavljeni iz osnovnega matriksa (na sliki 13 je opazen kot amorfna želatinasta masa) oziroma omrežja v katero so ujeti različni organski in anorganski delci, kot so: fitoplankton, zooplankton, bakterije, fekalne peletke in ličinke zooplanktona. Poleg teh so v sluzasto omrežje ujeti tudi hitinski oklepi rakcev, prazne frustule diatomej, detritni material odmrlih celic in delci makrofitskih alg.



Slika 13: Mikroskopski posnetki naravnih (mokrih) makroagregatov (vzorec "vodni stolpec") ; 200-kratna povečava (foto: Mozetič P.)

Obarvane naravne oz. mokre vzorce smo opazovali tudi z epifluorescenčnim mikroskopom (Slika 14). Modro obarvane celice na sliki predstavljajo bakterijske celice, ki nam kažejo na visoko gostoto bakterijske populacije znotraj samih makroagregatov v odnosu na okolno morsko vodo. Znotraj polisaharidnega matriksa se nahaja veliko število cianobakterij in heterotrofnih bakterij.



Slika 14: Mikroskopski posnetki vzorcev makroagregatov pobarvanih z DAPI barvilom; 40- in 200-kratna povečava

Liofilizirani vzorec iz vodnega stolpca (10mg vzorca v 10 ml sterilizirane morske vode) smo nacepili na plošče z Zobell gojiščem (za postopek glej poglavje 3.3.2) in opazovali rast avtohtonih bakterij makroagregatov v *in vitro* pogojih po 72-urni inkubaciji. Po 24 urah so na gojišču zrasle 3 kolonije in njihovo število je pri nadaljni inkubaciji ostalo enako, edino velikost samih kolonij se je povečala (Slika 15).



Slika 15: Kolonije bakterij zraslih na ploščah z Zobell gojiščem nacepljenih z 2ml vzorca makroagregatov (foto: Makovec T.)

4.2 KONCENTRACIJA OGLJIKOVIH HIDRATOV V VZORCIH

4.2.1 Spremembe koncentracij ogljikovih hidratov med encimsko razgradnjo z β -glukozidazo in α -amilazo

Zaradi velike vsebnosti ogljikovih hidratov in še ne povsem pojasnjene strukture makroagregatov smo študirali encimsko razgradnjo ogljikovih hidratov makroagregatov.

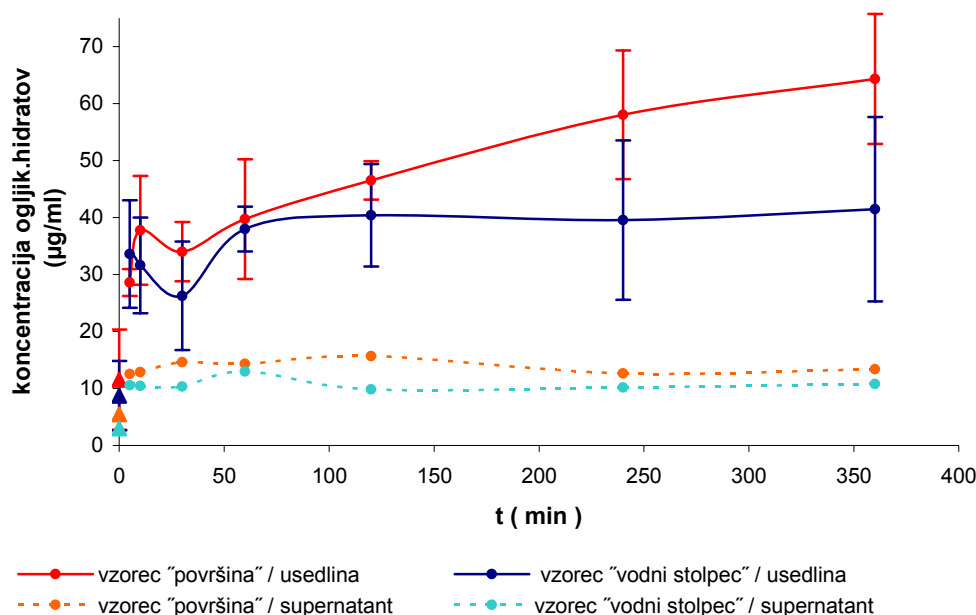
Liofiliziranim vzorcem (10 mg vzorca površina oz. vodni stolpec v 10 ml dest.vode) smo na začetku eksperimenta dodali 500 μ l β -glukozidaze in 500 μ l α -amilaze ter med potekom eksperimenta spremljali spreminjanje koncentracij ogljikovih hidratov torej njihovo razgradnjo v vzorčnih raztopinah supernatantov ali usedlin makroagregatov (Slika 16). Vse meritve so bile narejene vsaj v treh ponovitvah, koncentracije ogljikovih hidratov pa smo izračunali iz povprečnih vrednosti absorbanc vseh ponovitev (priloge B1-C2).

Pri tem smo spremljali tudi spremembe koncentracij ogljikovih hidratov v kontrolnih vzorcih v katere nismo dodali encimov. V primeru kontrolnih vzorcev smo potrdili aktivnost avtohtonih bakterijskih encimov v makroagregatih, saj se koncentracija ogljikovih hidratov poveča (v časovnem obdobju 360 minut) in sicer:

- pri vzorcu "površina" se poveča za 58 % začetne vrednosti (priloga F)
- pri vzorcu "vodni stolpec" se poveča za 88 % začetne vrednosti (priloga F)

Začetne koncentracije celotnih ogljikovih hidratov, ki smo jih določili v vzorcih pred dodatkom encimov (neobdelanih vzorcih), so bile višje v usedlinah kot v supernatantih analiziranih vzorcev makroagregatov. Koncentraciji v usedlinah obeh vzorcev sta bili za več kot 50 % višji od tistih izmerjenih v supernatantih (Slika 16). To je bil tudi pričakovan rezultat, saj večina polisaharidnega matriksa ostane po centrifugiranju v usedlini vzorcev.

Eksperimentalni rezultati encimske razgradnje kažejo povišanje koncentracije celotnih ogljikovih hidratov pri obeh vzorcih, tj. pri usedlinah in supernatantih vzorcev med potekom eksperimenta in sicer največji porast se pokaže v prvih 5 minutah eksperimenta (Slika 16). V supernatantu vzorca "površina" je bila začetna koncentracija ogljikovih hidratov nekoliko višja kot v supernatantu vzorca "vodni stolpec" in je tudi ostala rahlo višja skozi celotno eksperimentalno obdobje. V prvih petih minutah eksperimentalnega časovnega obdobja je rahlo višja konc. oglj. hidratov pri usedlini vzorca "vodni stolpec" kot pri usedlini vzorca "površina", kar nakazuje na to, da so določeni polisaharidi v tem vzorcu takoj dostopni za encimsko delovanje, vendar je že po 10 minutah in potem ves čas eksperimenta koncentracija višja pri vzorcu "površina". Prav tako je bil ves čas trend naraščanja koncentracij ogljikovih hidratov višji pri vzorcu "površina".

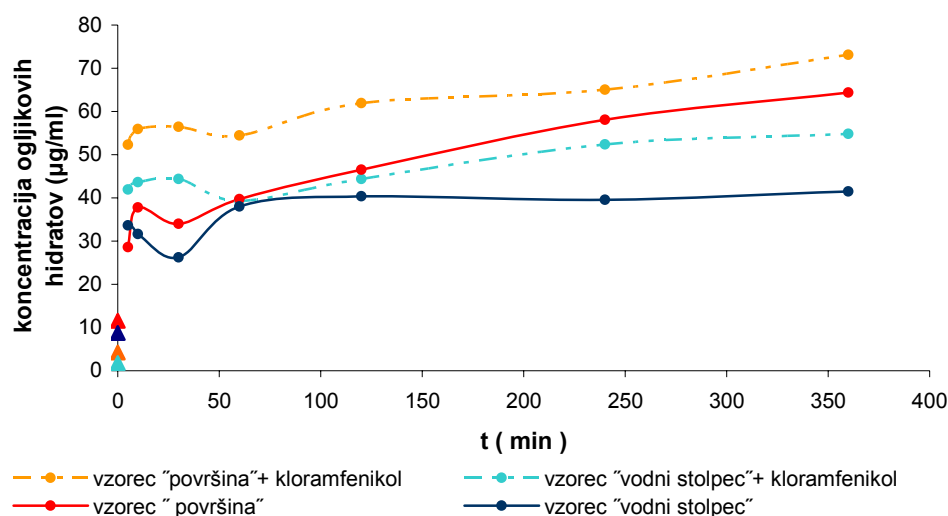


Slika 16: Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov β -glukozidaze in α -amilaze za usedlino in supernatant vzorcev "površina" in "vodni stolpec"; začetne vrednosti (na sliki označene s trikotniki) so vrednosti kontrolnih vzorcev brez dodanih encimov; navpične črte označujejo standardne odklone

Največje povečanje koncentracij oglj. hidratov smo opazili v prvih dveh urah (Sliki 16 in 22) eksperimenta, vendar le-ta narašča ves čas in sicer:

- pri vzorcu "površina" se koncentracija oglj.hidr. poveča v eksperimentalnem časovnem obdobju štirikrat več od prvotne (za 450 %)
- pri vzorcu "vodni stolpec" se koncentracija oglj.hidr. poveča v eksperimentalnem časovnem obdobju trikrat več od prvotne (za 340 %).

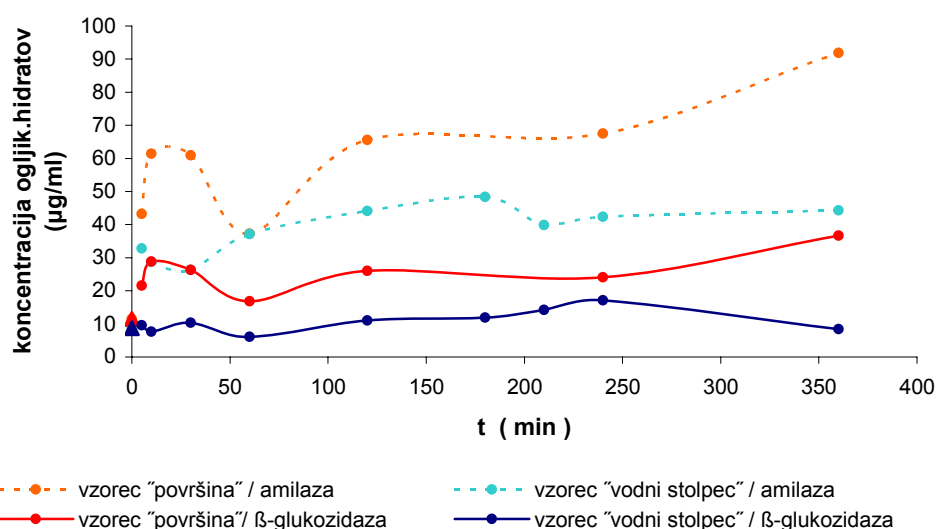
Zaradi majhnih sprememb koncentracij ogljik. hidratov v supernatantih obeh vzorcev smo pri nadaljnjem delu spremljali le spremembe koncentracij v usedlinah obeh vzorcev. Naredili smo več ponovitev prej omenjene encimske razgradnje na posameznih vzorcih. Pri tem smo opazili določena nihanja vrednosti skozi časovni potek encimske razgradnje (padci in porast koncentracij oglj. hydr.). Zato smo vzorcem dodali 100 μ l kloramfenikola konc. 10 mg/ml (končna koncentracija v poskusni mešanici je bila 100 μ g/ml) in jih nato inkubirali 1 uro na sobni T. Po inkubaciji smo vzorcem dodali še mešanico encimov β -glukozidaze in α -amilaze ter izmerili koncentracije ogljikovih hidratov. Na ta način smo se želeli prepričati ali so (in v kolikšni meri) za porabo razgrajenih ogljikovih hidratov odgovorni tudi avtohtoni mikroorganizmi znotraj makroagregatov.



Slika 17: Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov β -glukozidaze in α -amilaze za usedlino vzorcev "površina" in "vodni stolpec" z dodanim kloramfenikolom; začetne vrednosti (na sliki označene s trikotniki) so vrednosti kontrolnih vzorcev brez dodanih encimov

Izmerjene koncentracije ogljikovih hidratov v vzorcih z antibiotikom so bile višje od tistih določenih v vzorcih brez dodatka antibiotika (Slika 17), kar dokazuje sočasno mikrobn (avtohtono) razgradnjo in porabo ogljikovih hidratov. Prisotnost aktivnih avtohtonih bakterij vzorca potrjuje tudi rast kolonij na gojišču po nacepiti vzorca makroagregatov (Slika 15).

Poleg študija razgradnje ogljikovih hidratov pri sočasnem delovanju encimov β -glukozidaze in α -amilaze smo primerjali tudi učinkovitost posameznih encimov.



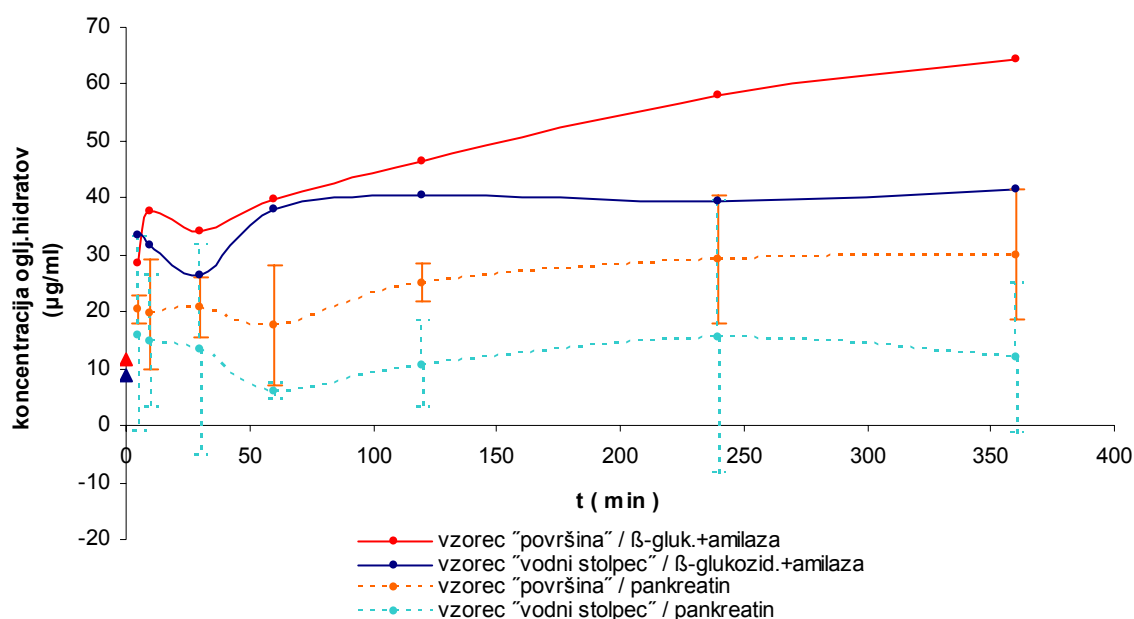
Slika 18: Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa posamičnega delovanja

encima β -glukozidaze ter posamičnega delovanja encima α -amilaze za usedline vzorcev "površina" in "vodni stolpec"; začetne vrednosti (na sliki označene s trikotniki) so vrednosti kontrolnih vzorcev brez dodanih encimov

Pri posamičnem delovanju encimov je koncentracija ogljikovih hidratov veliko bolj naraščala ob učinkovanju encima α -amilaze, posebno v primeru razgradnje površinskega vzorca (Slika 18). Glede na biološko sestavo obravnavanih vzorcev lahko sklepamo, da so pri tem pomembni rezervni polisaharidi planktonskih celic, kot so škrob in drugi $\alpha(1,4)$ polisaharidi.

4.2.2 Spremembe koncentracij ogljikovih hidratov med encimsko razgradnjo s pankreatinom

Slika 19 prikazuje spreminjanje vrednosti absorbanc oz. koncentracij ogljikovih hidratov, izbranih vzorcev med encimsko razgradnjo, ob učinkovanju pankreatina. Vzorcem smo na začetku eksperimenta dodali 1000 μ l pankreatina. Izmerjene vrednosti koncentracij ogljik.hidr. so med potekom eksperimenta nihale oziroma dosegale višjo ali nižjo vrednost. To je verjetno posledica heterogenosti vzorcev oziroma trenutne razpoložljivosti substrata za encimsko razgradnjo. Pankreatin je zmes različnih encimov, ki razgrajujejo različne sestavine izbranih (kompleksno zgrajenih, zamreženih) vzorcev, zato se skozi encimsko razgradnjo polisaharidne verige pretežno sproščajo ali/in razgrajujejo.



Slika 19: Spreminjanje koncentracije ogljikovih hidratov v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov

β -glukozidaze in α -amilaze ter delovanja pankreatina za usedlino vzorcev "površina" in "vodni stolpec"; začetne vrednosti (na sliki označene s trikotniki) so vrednosti kontrolnih vzorcev brez dodanih encimov; navpične črte označujejo standardne odklone

Primerjava delovanja pankreatina in mešanice encimov β -glukozidaze in α -amilaze (Sliki 19 in 22) kaže manjša nihanja koncentracij ogljik.hidrat. v primeru pankreatina. Pri opazovanju delovanja pankreatina na usedline obeh vzorcev smo ugotovili, da narašča koncentracija ogljikovih hidratov počasneje kot pri delovanju β -glukozidaze in α -amilaze. Pri delovanju pankreatina smo prav tako opazili višje koncentracije ogljikovih hidratov pri razgradnji vzorca "površina".

4.3. KONCENTRACIJA PROTEINOV V VZORCIH

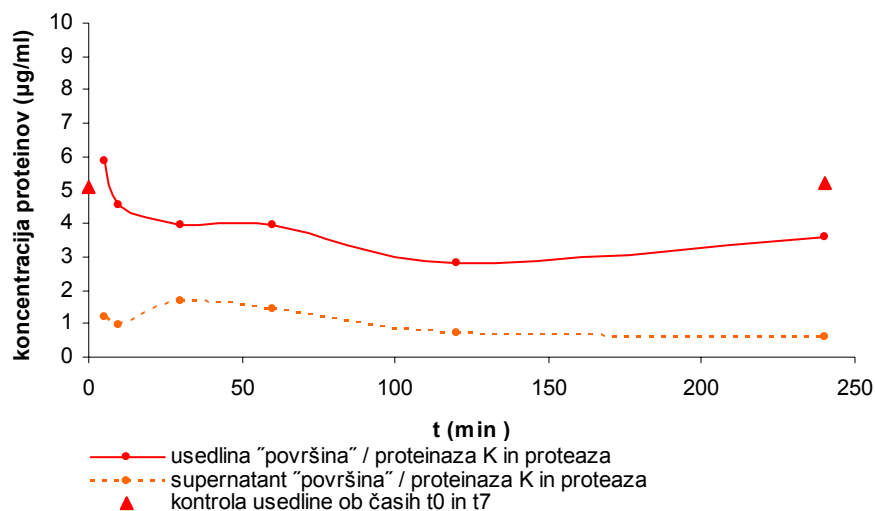
4.3.1 Spremembe koncentracij proteinov med encimsko razgradnjo s proteinazo K in proteazo ter pankreatinom

Poleg encimske razgradnje ogljikovih hidratov makroagregatov smo preučevali tudi encimsko razgradnjo proteinov. Vse meritve proteinov so bile narejene vsaj v treh ponovitvah, koncentracije smo izračunali iz povprečnih vrednosti absorbanc vseh ponovitev (priloge D1-E2). Pri tem smo vzorcem dodali mešanico 500 μ l proteinaze K in 500 μ l proteaze oziroma 1000 μ l pankreatina. Pri tem smo spremljali tudi spremembe koncentracije proteinov v kontrolnih vzorcih, tj. v eksperimentu, kjer nismo dodali encimov. V primeru kontrolnih vzorcev smo pri merjenju konc. proteinov ugotovili nizko stopnjo aktivnosti avtohtonih bakterij makroagregatih, saj se koncentracija proteinov zelo malo zniža (v časovnem obdobju 360 minut) in sicer:

- pri vzorcu "površina" se zniža za 17 % začetne vrednosti (priloga F)
- pri vzorcu "vodni stolpec" se zniža za 33 % začetne vrednosti (priloga F)

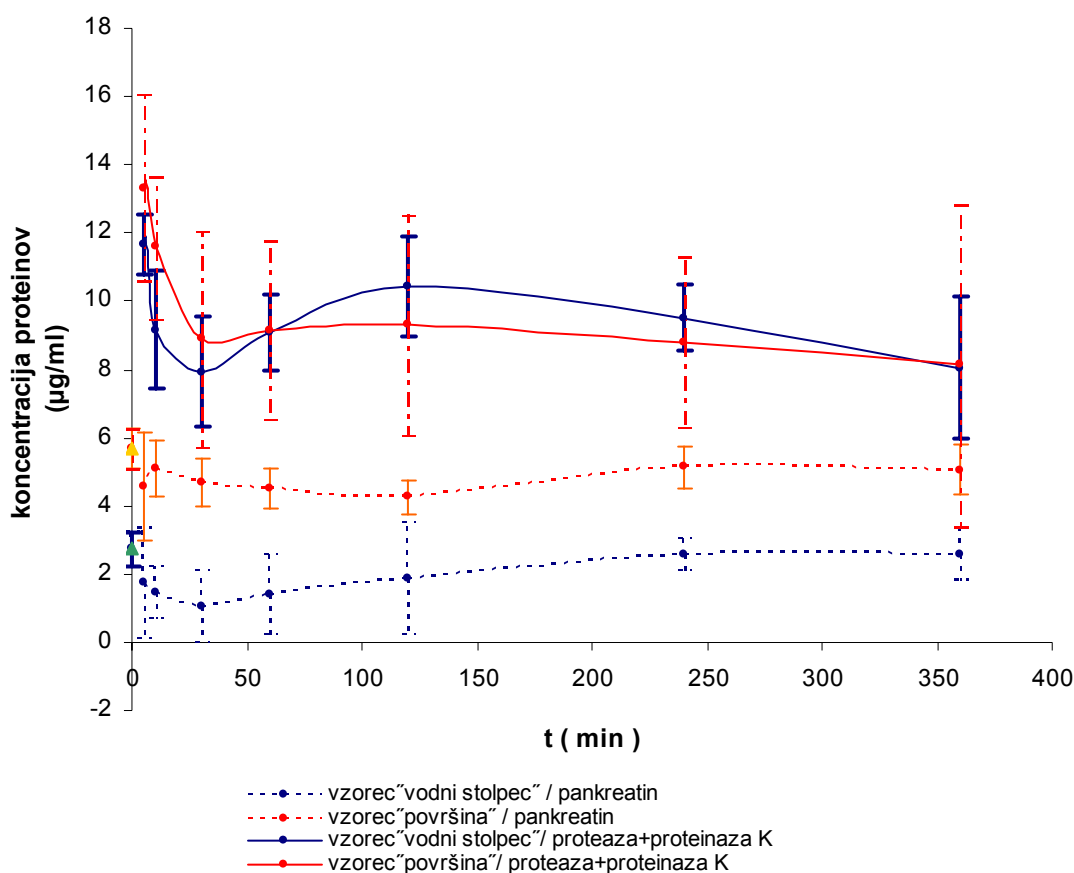
Pri merjenju koncentracije proteinov smo ugotovili, da je koncentracija teh višja v usedlinah obeh vzorcev kot v supernatantih. Zaradi zelo majhnih koncentracij proteinov v supernatantih obeh vzorcev in posledično majhnih spremembah v koncentracijah

proteinov, smo pri nadaljnem delu spremljali le spremembe koncentracij v usedlinah obeh vzorcev (Slika 20).



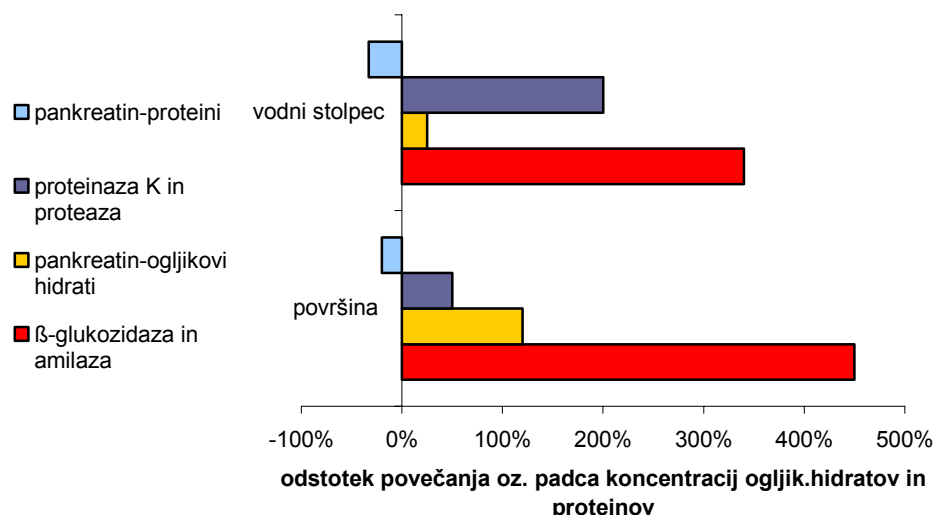
Slika 20: Spreminjanje koncentracije proteinov v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov proteaze in proteinaze K za usedlino in supernatant vzorca "površina"

Potek razgradnje proteinov prikazuje slika 21. Rezultati nam pokažejo majhno vsebnost proteinov v vzorcih.



Slika 21: Spreminjanje koncentracije proteinov v odvisnosti od časa delovanja pankreatina, ter encimov proteaze in proteinaze K za usedline vzorcev "površina" in "vodni stolpec"; prikazana je primerjava različnega delovanja posameznih encimov; navpične črte označujejo standardne odklone; začetne vrednosti (na sliki označene s trikotniki) so vrednosti kontrolnih vzorcev brez dodanih encimov

V prvih 30 minutah poteče najintenzivnejša razgradnja, verjetno lažje dostopnih proteinov. Zanimivo pa je da se pokaže velik porast koncentracije proteinov pri obeh vzorcih (pri času 5 min.) pri delovanju proteinaze K in proteaze, iz česar lahko sklepamo, da delovanje le-teh omogoči dostop oz. «odpre» določene proteinske skupine, ki se potem naprej hidrolizirajo in zato spet opazimo padec koncentracije proteinov oziroma njihovo razgradnjo (Sliki 21 in 22). Primerjava encimske razgradnje proteinov pri delovanju s pankreatinom in z mešanico encimov proteinaze K in proteaze nam pokaže porast koncentracij proteinov pri dodatku zmesi encimov proteinaze K in proteaze (Sliki 21 in 22). Dobljeni rezultat je verjetno posledica višje koncentracije encimov, ki razgrajujejo proteine glede na vsebnost le-teh v pankreatinu.



Slika 22: Spremembe koncentracij ogljikovih hidratov in proteinov obeh vzorcev v eksperimentalnem časovnem obdobju (360 minut) pri $T=27^{\circ}\text{C}$; prikaz odstotkov povišanja oziroma padca koncentracij ogljikovih hidratov in proteinov po encimskem delovanju glede na začetno vrednost le-teh v obeh vzorcih

Podobno kot v primeru razgradnje ogljikovih hidratov se proteini in njihova aktivna mesta za vezavo reagenta sproščajo ali razgrajujejo skozi encimsko razgradnjo izbranih vzorcev, kar se odraža v nihanju vrednosti izmerjenih koncentracij proteinov. Največje spremembe koncentracij proteinov smo ugotovili v prvih dveh urah eksperimenta.

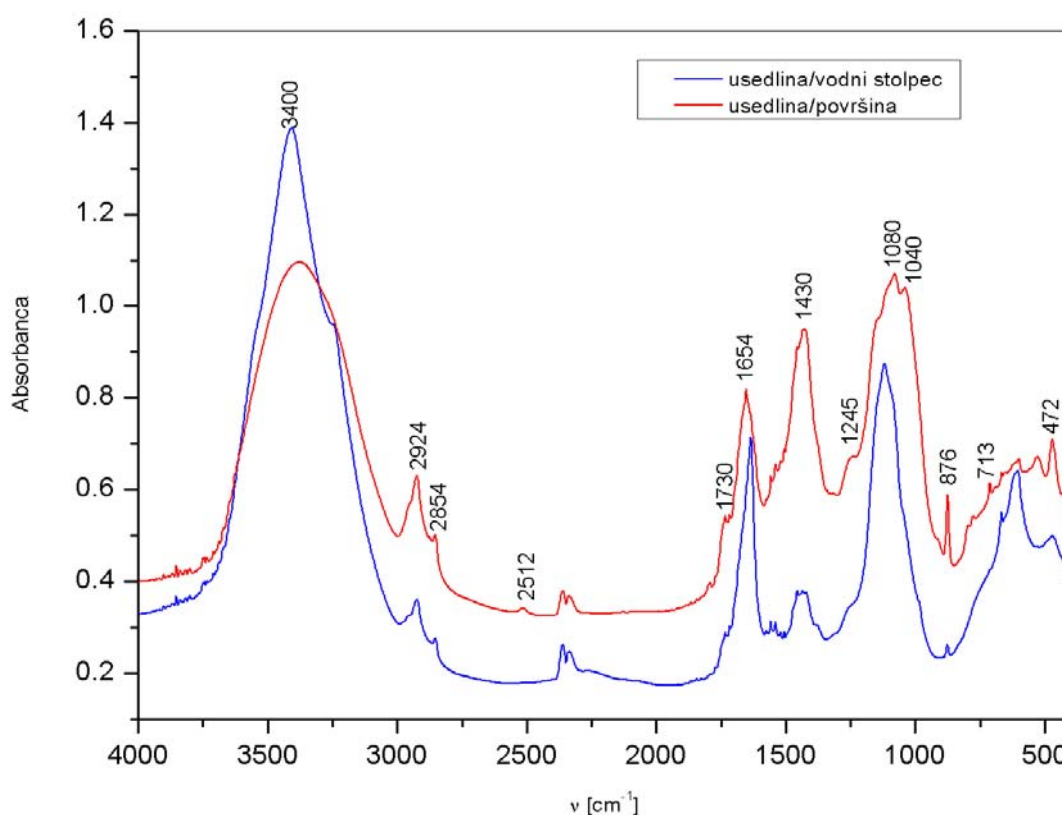
4.4 SPEKTROSKOPSKE FTIR ANALIZE ENCIMSKO OBDELANIH MAKROAGREGATOV

4.4.1 Spektri FTIR makroagregatov vzorčenih na površini (vzorec P) in v vodnem stolpcu (vzorec V)

Sestavo sluzastih makroagregatov pred in po encimski razgradnji smo proučevali tudi s pomočjo spektroskopije FTIR.

4.4.1.1 Spektra FTIR analiziranih usedlin vzorcev P in V (Slika 23)

FTIR spektra usedlin obeh analiziranih vzorcev (vzorec P in vzorec V) pred dodatkom encimov sta si po prisotnosti glavnih signalov zelo podobna (Slika 23).



Slika 23: Spektra FTIR usedlin površinskega vzorca in vzorca makroagregatov iz vodnega stolpca

Širok trak oz. signal v območju $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ je rezultat vibracij O-H in N-H skupin (za lažje razumevanje glej prilogo G). Prisotnost alifatskih C-H vibracij metilnih in metilenskih skupin kažejo vrhovi pri 2854 in 2924 cm^{-1} . Manjši trak pri 1730 cm^{-1} lahko pripišemo C=O vibracijam karbonilnih skupin karboksilnih kislin, estrov ali ketonov. Vrha pri 1654 cm^{-1} (usedlina, vzorec P) oziroma pri 1635 cm^{-1} (usedlina, vzorec V) pa verjetno pripadata amidom (C=O vibracije; amid I) proteinske frakcije. V tem območju pa se pojavljajo tudi signali vode. Vidni so tudi signali pri 1558 in 1540 cm^{-1} (N-C=O vibracije; amid II), vendar so zelo majhni. Pri valovnem številu 1430 cm^{-1} je prisoten trak, ki je lahko posledica deformacijskih vibracij CH_3 in CH_2 ter kalcita. Prisotnost kalcita potrjujejo še manjša vrha pri valovnih številih 876 in 713 cm^{-1} , ki sta bolj izrazita v spektru usedline vzorca P. Kot posledica C-O-C eterskih vibracij in C-O vibracij pa nastane trak pri 1245 cm^{-1} . Trakovi oz. vrhovi, ki se pojavljajo v območju $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, so značilni za polisaharidne in druge C-O vezi (Slika 23), ter tudi za silikatne minerale in organosilicijeve

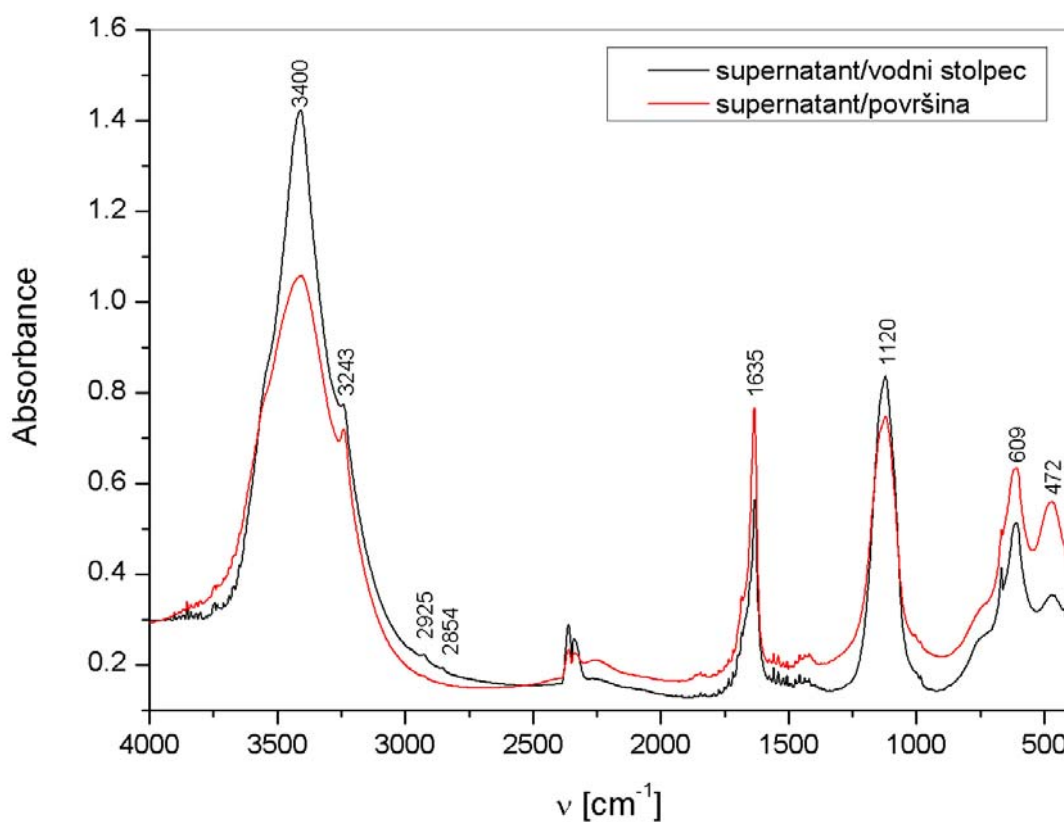
spojine ($900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$). V spektru usedline vzorca P so vrhovi značilni za kremen (SiO_2), ki so prisotni pri valovnih številih: $1080, 800, 780, 472\text{ cm}^{-1}$, bolj izraziti.

Elementna analiza usedline površinskega vzorca ($16,4\text{ \% C}_{\text{org}}$ in $0,7\text{ \% N}_{\text{cel}}$) je pokazala večjo vsebnost organske frakcije površinskega vzorca v primerjavi z vzorcem, ki je bil vzorčen v vodnem stolpcu ($7,6\text{ \% C}_{\text{org}}$ in $0,3\text{ \% N}_{\text{cel}}$).

4.4.1.2 Spektra FTIR analiziranih supernatantov (vodotopna frakcija) vzorcev P in V (Slika 24)

Pri FTIR spektrih supernatanta obeh analiziranih vzorcev (vzorec P in V) smo prav tako opazili veliko podobnost. Glavni absorpcijski vrhovi organske komponente so vidni pri $3400, 1635$ in 1120 cm^{-1} in pripadajo OH, NH in različnim C-O skupinam, tj. proteinom (amid I) ter ogljikovim hidratom vodotopne frakcije. V območju $3400, 3250$ in 1630 cm^{-1} pa se pojavljajo tudi absorpcijski trakovi vode, signali blizu 2350 cm^{-1} in 667 cm^{-1} pa so posledica ogljikovega dioksida, ki nastaja pri segrevanju oz. termičnem razpadu KBr-peletk (Slika 24).

V spektrih obeh vzorcev so vidni tudi šibki signali alkilne komponente, ki so bolj izraziti v supernatantu vzorca iz vodnega stolpca (vzorec V). Manjši absorpcijski vrhovi v območju $1860\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ odražajo prisotnost različnih tipov karbonilnih ogljikovih atomov, v območju $1520\text{--}1570\text{ cm}^{-1}$ so prisotni absorpcijski vrhovi proteinov (amid II) ter v območju $1420\text{--}1470$ signali C-H deformacij. Signali pod 600 cm^{-1} verjetno pripadajo vibracijam mineralov in soli.



Slika 24 : Spektra FTIR supernatantov površinskega vzorca in vzorca makroagregatov iz vodnega stolpca

4.4.2 Spektri FTIR vzorcev po encimski razgradnji z izbranimi encimi

S pomočjo FTIR spektroskopije smo študirali tudi spremembe usedlin makroagregatov po encimski razgradnji (po 360 minutah). Ker so rezultati spektrofotometričnih metod določanja količine proteinov in ogljikovih hidratov kazali na majhne spremembe organske snovi v supernatantu makroagregatov, le-teh v tem delu raziskave nismo obravnavali. Eksperiment encimske razgradnje izbranih usedlin makroagregatov je potekal v vodnem mediju (glej poglavje 3.2.3), zato so se med eksperimentom razgradni produkti (iz usedline) sproščali in kopičili v samem vodnem mediju. Da bi dobili natančnejši vpogled v razgradne procese in strukturo usedlin, smo opravili po končanem eksperimentu FTIR

analize sedimenta in vodne faze, ki smo ju dobili po centrifugiranju eksperimentalne raztopine.

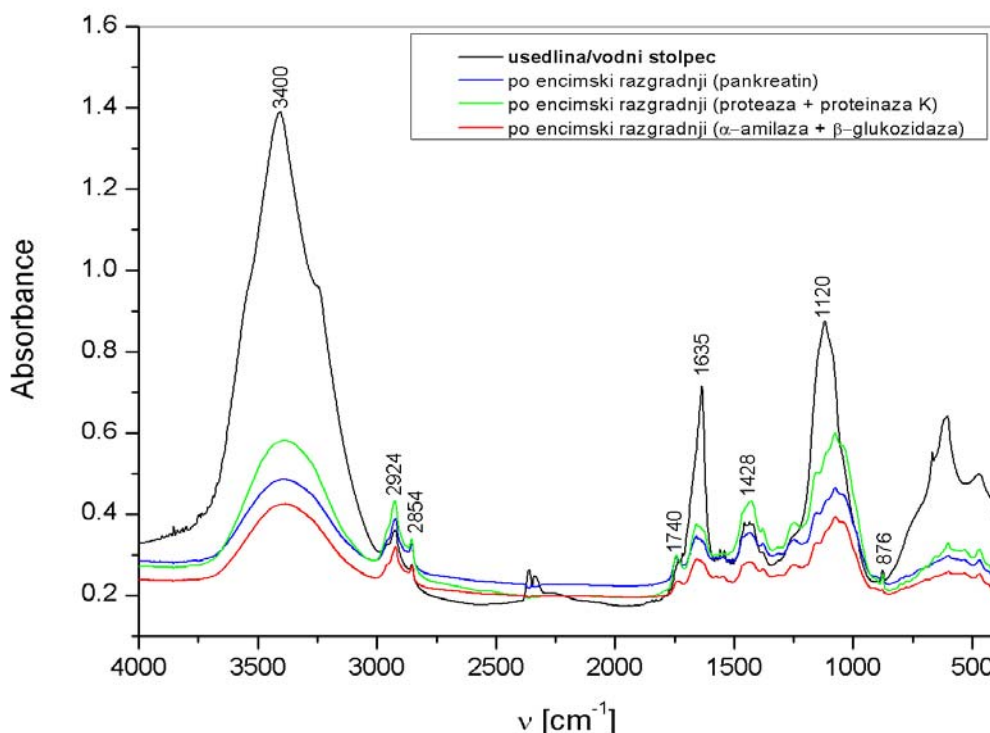
4.4.2.1 Usedlina vzorca vzorčenega v vodnem stolpcu (V)

- Spremembe po encimski razgradnji (Slika 25) -

Po encimski razgradnji opazimo v vseh spektrih, tj. podobno po učinkovanju z zmesjo encimov α -amilaze in β -glukozidaze ali proteaze in proteinaze K ali pankreatina, relativno zmanjšanje vseh glavnih trakov, ki so bili prej prisotni v spektru neobdelanega vzorca. Primerljivi ali celo nekoliko višji ostanejo le signali alifatskih skupin. Zmanjšanje trakov gre predvsem na račun manjše količine vzorca, deloma pa lahko zmanjšanje absorpcijskega traku pri valovnem številu 3400 cm^{-1} pripišemo zmanjšanju vsebnosti O-H in N-H skupin, kar je predvsem posledica encimske razgradnje ogljikovih hidratov in morebitnega sočasnega sproščanja proteinske frakcije (zaradi razgradnje polisaharidnega matriksa) iz usedline v vzorčno raztopino. Ti rezultati nakazujejo na povezave med proteini in ogljikovimi hidrati v obravnavanih vzorcih makroagregatov. Spremembe proteinske komponente potrjuje tudi zmanjšanje in premik absorpcijskega vrha od 1635 cm^{-1} k 1656 cm^{-1} . V neobdelanem vzorcu je bil v območju od $950\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ prisoten močan trak z absorpcijskim vrhom blizu 1120 cm^{-1} , v spektru obdelanega vzorca pa postanejo, zaradi razgradnje polisaharidov, vidni absorpcijski vrhovi pri 1248 , 1150 , 1074 in 1036 cm^{-1} . Le-ti verjetno pripadajo preostalim (težje razgradljivim ali/in bolj zamreženim) ogljikovim hidratom ter silikatom (Si-komponenti).

V primeru signalov alifatskih skupin (pri 1428 , 2924 in 2854 cm^{-1}) ter C=O karbonilnih skupin (karboksilnih kislin, estrov ali ketonov; pri 1742 cm^{-1}) opazimo po encimski razgradnji višjo intenziteto glede na signale v spektru neobdelanega vzorca (Slika 25). To nakazuje na porast vsebnosti snovi, ki absorbirajo pri zgoraj omenjenih valovnih številih ob vzporedni razgradnji ogljikovih hidratov in proteinov. Poleg večje vsebnosti lipidne komponente v vzorcu po encimski razgradnji mogoče k temu traku prispeva tudi povečanje vibracij (nihanj vezi) lipidov (alifatske komponente), zaradi encimske

razgradnje in posledično manjše zamreženosti, kompleksnosti vzorca. Zaradi encimske razgradnje organske snovi opazimo v spektrih vzorcev po učinkovanju encimov, bolj izrazite signale mineralne frakcije. Le-ti so bili v spektru neobdelanega vzorca (v območju pod 700 cm^{-1}) verjetno prekriti s trakovi drugih sestavin makroagregatov, predvsem soli (ki po encimski razgradnji izginejo).



Slika 25: Spektri FTIR neobdelane usedline vzorca makroagregatov iz vodnega stolpca ter njenega trdnega preostanka (sediment/po centrifugiranju) po encimski razgradnji

Po učinkovanju z zmesjo α -amilaze in β -glukozidaze opazamo v spektru tako obdelanega vzorca (Slika 25) zmanjšanje signala kalcita pri 876 cm^{-1} glede na tistega v spektru neobdelanega vzorca. Tudi drugi signali, ki odražajo prisotnost mineralov (v območju pod 700 cm^{-1}) so manj izraziti kot v spektrih vzorca po učinkovanju z zmesjo proteaze in proteinaze K. To nakazuje na morebitno sproščanje mineralov (v povezavi z ogljikovimi hidrati) iz usedline v medij (vodno fazo), zaradi encimske razgradnje polisaharidnega matriksa vzorca makroagregatov. Po encimski razgradnji proteinov (učinkovanje z zmesjo proteaze in proteinaze K) pa so signali mineralov, tj. kalcita (pri 1428, 876 in 713 cm^{-1}) in kremena (pri 800, 780, 530, 472 cm^{-1}) v spektru obdelanega

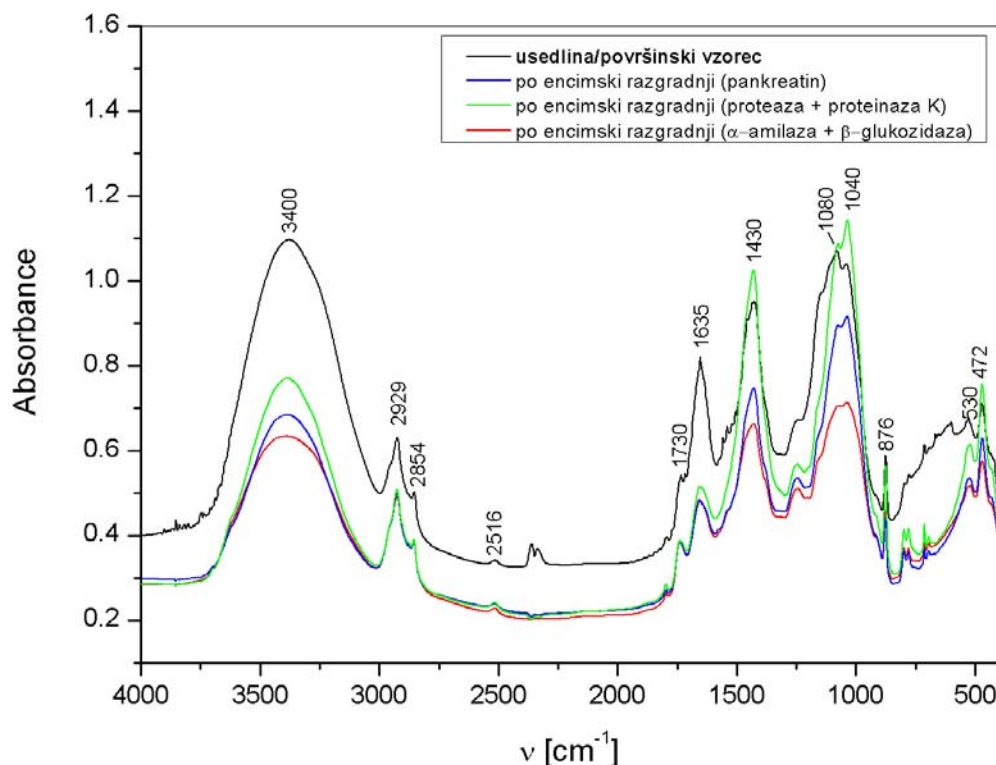
vzorca bolj vidni oziroma ločljivi. Pri tem lahko sklepamo, da je interakcija proteinov in mineralov manjša oziroma, da razgradnja proteinov ne vpliva na vgrajenost/sproščanje mineralne komponente makroagregatov.

Spekter vzorca usedline je po učinkovanju s pankreatinom zelo podoben spektru, ki smo ga dobili po encimski razgradnji z mešanico α -amilaze in β -glukozidaze, vendar je razgradnja substrata nekoliko šibkejša (Slika 25). Kljub temu, da je pankreatin zmes različnih encimov in da vsebuje tudi lipaze, ostanejo intenzitete signalov alifatske komponente podobne kot v spektru neobdelanega vzorca. Ti rezultati kažejo, da je alifatska komponenta težje razgradljiva in/ali bolj zamrežena v strukturi makroagregatov ter zato manj dostopna za učinkovanje encimov. Refraktornost oziroma težjo razgradljivost alifatske komponente makroagregatov potrjujejo tudi rezultati študij Kovač in sod. (2002, 2004).

4.4.2.2 Usedlina površinskega vzorca (P)

- *Spremembe po encimski razgradnji* (Slika 26) -

V spektrih usedline površinskega vzorca po učinkovanju prej omenjenih encimov, opazimo podobne spremembe kot pri omenjeni encimski razgradnji usedline vzorca vzorčenega v vodnem stolpcu. Razgradnjo ogljikovih hidratov spremljajo pretvorbe/sproščanje proteinske frakcije oziroma obratno. V tem primeru je ohranjanje oziroma kopičenje alifatske (lipidne) komponente skozi razgradnjo prav tako dobro vidno.



Slika 26: Spektri FTIR neobdelane usedline površinskih makroagregatov ter njenega trdnega preostanka (sediment/po centrifugiranju) po encimski razgradnji

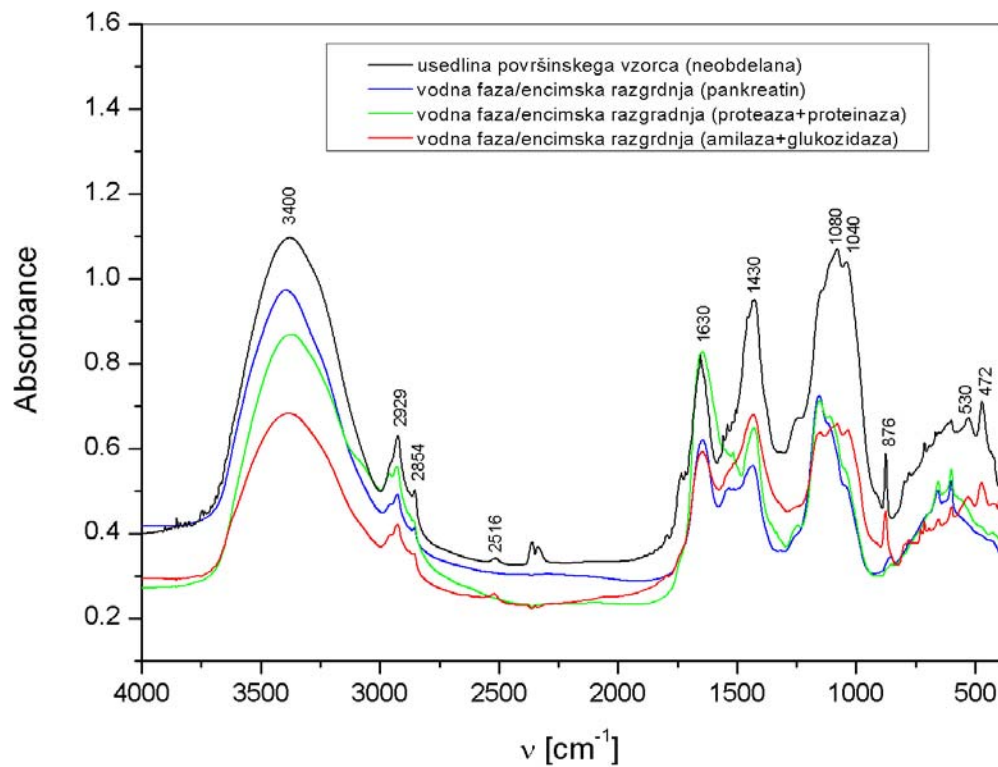
To potrjujejo močnejši (glede na spekter neobdelanega vzorca) trakovi alifatskih (2955, 2929 in 2854 cm^{-1} : CH_2 in CH_3 skupin) skupin in signali, ki pripadajo $\text{C}=\text{O}$ vibracijam karbonilnih skupin karboksilnih kislin, estrov ali ketonov (od 1680-1740 cm^{-1}). V spektrih encimsko obdelanega vzorca je še vedno prisoten močan absorpcijski vrh pri 1430 cm^{-1} , kar je verjetno predvsem posledica prisotnosti kalcita in v manjši meri deformacijskih vibracij CH_3 in CH_2 . Prav tako postane trak blizu 1250 cm^{-1} bolj izrazit (signali $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ in $\text{C}-\text{O}$), ker se signali v območju 900-1110 zmanjšajo, tj. predvsem zaradi razgradnje ogljikovih hidratov. V območju 900-1110 cm^{-1} ostaneta vidna absorpcijska vrha blizu 1076 in 1040 cm^{-1} , ki verjetno pripadata silikatom (Si-komponenti) in nerazgrajeni frakciji ogljikovih hidratov (Slika 26). FTIR rezultati neobdelane usedline površinskega vzorca makroagregatov kažejo na jasne signale mineralov glede na usedlino vzorca iz vodnega stolpca. Ti signali so v spektrih encimsko obdelane usedline veliko bolj ločljivi, manj

prekriti z drugimi signali (npr. signali soli in termičnega razpada KBr tabletk). Absorpcijski vrhovi pri 2516, 1796, 1430, 876, 713 cm^{-1} potrjujejo vsebnost kalcita, dobro viden dublet pri 798 in 778 cm^{-1} in trakovi pri 695, 530 in 470 cm^{-1} pa kažejo na vsebnost kremena (Slika 26). Pri encimski razgradnji usedline površinskega vzorca z zmesjo encimov α -amilaze in β -glukozidaze ali proteaze in proteinaze K oziroma pankreatina, se vsebnost mineralne komponente (zaradi razgradnje organske snovi) povečuje in ohranja v matriksu usedline makroagregata. Encimska razgradnja ogljikovih hidratov je bila bolj učinkovita pri obdelavi vzorca z zmesjo α -amilaze in β -glukozidaze v primerjavi s pankreatinom.

4.4.3 Sproščanje sestavin iz usedlin vzorcev makroagregatov v vodni medij po encimski razgradnji (Slika 27)

Spektri FTIR vodnih faz usedline makroagregata iz vodnega stolpca so podobni spektrom neobdelanih usedlin. Ti rezultati kažejo na to, da se med encimsko razgradnjo osnovnega matriksa sproščajo (podobno pri učinkovanju vseh izbranih encimov) vse glavne organske sestavine makroagregatov, tj. ogljikovi hidrati, proteini in v manjši meri tudi lipidi (Slika 27).

Podobne rezultate smo dobili tudi pri spektroskopski analizi vodnih faz, dobljenih po encimski razgradnji usedline površinskega makroagregata, razen v primeru učinkovanja z zmesjo encimov α -amilaze in β -glukozidaze. V tem primeru so bili v spektru vodne faze prisotni še signali mineralov (predvsem kalcita in silikatov). To nakazuje, da se pri razgradnji polisaharidov (pri učinkovanju z α -amilazo in β -glukozidazo) sproščajo v medij z manjšimi enotami ogljikovih hidratov tudi nanje «na nek način vezani» minerali. To ponovno potrjuje močno interakcijo mineralov z ogljikovimi hidrati v matriksu makroagregatov.



Slika 27: Spektri FTIR neobdelane usedline površinskega vzorca ter vodne faze (po centrifugiranju vzorčne raztopine) po encimski razgradnji

5 RAZPRAVA

5.1 RAZGRADNJA OGLJIKOVIH HIDRATOV IN PROTEINOV V MAKROAGREGATIH

Razgradnja (hidroliza) ogljikovih hidratov v makroagregatih poteka hitro (največja nihanja izmerjenih koncentracij se pokažejo v prvih 30 minutah) in je sodeč po razlikah pri uporabi antibiotika mikrobno vodena. Izrazitejša nihanja koncentracij v poskusih so posledica heterogene sestave obravnavanih naravnih vzorcev, trenutne razpoložljivosti substrata za encime ter sočasne mikrobne aktivnosti. Mikroorganizmi s svojim metabolizmom prispevajo k nihanju koncentracij ogljikovih hidratov (padec oz. porast), ker s svojimi encimi razgrajujejo daljše verige polisaharidov in hkrati porabljajo enostavne sladkorje (monosaharide in oligosaharide, ki jim predstavljajo takoj dostopna hranila), nastale zaradi delovanja dodanih encimov. Poleg tega so za ta nihanja odgovorne še različne kemične reakcije med novonastalimi molekulami in interakcije znotraj večjih molekul.

Poskusi so pokazali, da so v polisaharidih v naših vzorcih makroagregatov prisotne pretežno $\alpha(1,4)$ glikozidne vezi. Delovanje posameznih encimov nam pokaže, da ima delovanje α -amilaze za posledico večji porast koncentracij ogljikovih hidratov kot delovanje β -glukozidaze. To nam nakazuje večjo vsebnost in/ali dostopnost substrata s prisotnostjo $\alpha(1,4)$ glikozidnih vezi. Glede na biološko sestavo obravnavanih vzorcev lahko sklepamo, da so pri tem pomembni rezervni polisaharidi planktonskih celic, kot so škrob in drugi $\alpha(1,4)$ polisaharidi. Škrob je tudi glavni rezervni polisaharid dinoflagelatov (npr. *Gonyaulax fragilis*), tj. skupine fitoplanktona, ki je bila v veliki meri zastopana predvsem v našem površinskem vzorcu. V vzorcu vodni stolpec so prevladoval predvsem diatomeje, tako da je bil učinek α -amilaze v tem vzorcu manjši. Herndl in sod. (1999) ter Zaccane in sod. (2002) so v makroagregatih prav tako zasledili, da sta aktivnosti teh dveh encimov obratno sorazmerni. Če je bila prisotna visoka aktivnost α -amilaze, je bila aktivnost β -glukozidaze nizka in obratno. V bistvu pa je profil in aktivnost posameznih vrst encimov v naravi odgovor avtohtonih mikroorganizmov na sestavo makroagregatov (vrsto in količino razpoložljivega substrata: ogljikovih hidratov, lipidov, proteinov in drugih) in

se zaradi tega razlikuje med posameznimi vzorci makroagregatov (Herndl in sod., 1999; Verdugo in sod., 2004).

Koncentracija ogljikovih hidratov narašča pri delovanju pankreatina počasneje kot pri delovanju β -glukozidaze in α -amilaze. To je verjetno predvsem posledica manjše količine posameznih encimov v raztopini dodanega pankreatina izbrane koncentracije, ki razgrajujejo ogljikove hidrate. Pankreatin je namreč zmes različnih encimov, ki razgrajujejo različne sestavine izbranih (kompleksno zgrajenih, zamreženih) vzorcev, zato se skozi encimsko razgradnjo polisaharidne verige pretežno sproščajo ali/in razgrajujejo. Glede na to, kateri izmed teh procesov v danem trenutku prevladuje, smo izmerili porast ali padec koncentracije ogljikovih hidratov v vzorčni raztopini. Dostopnost aktivnih mest za delovanje posameznih encimov kot tudi substratov za reakcijo z reagentom za določanje količine ogljikovih hidratov, se med razgradnjo nenehno spreminja. Pri uporabi višjih koncentracij pankreatina, so bila nihanja izmerjenih koncentracijah oglj. hidratov precej višja. To nam pokaže uspešno razgradnjo makroagregatov, kjer različni encimi pankreatina delujejo na različne segmente makroagregatov oziroma «odpirajo» različne strukturne enote matriksa makroagregatov. Zaradi lažjega spremljanja dinamike in trenda razgradnje ogljikovih hidratov oz. proteinov smo raje uporabili manjše količine pankreatina.

Rezultati elementne analize so pokazali višjo vsebnost organske komponente pri usedlini površinskega vzorca kar je tudi v skladu s spektrofotometrično določenimi koncentracijami ogljikovih hidratov in proteinov, ki so bile višje v površinskih vzorcih. Ugotovili smo izrazitejšo razgradnjo ogljikovih hidratov površinskega vzorca (ki ima manjšo zamreženost osnovne strukture) v primerjavi z vzorcem odvzetim globlje v vodnem stolpcu (ta ima bolj tesne povezave osnovnega matriksa). Vse skupaj nam pokaže uspešno razgradnjo organske snovi makroagregatov že med njihovim nastankom, razvojem ter v končni fazi med sedimentacijo na morsko dno.

Spektri FTIR encimske razgradnje organskega matriksa makroagregatov pa nam pokažejo sočasno razgradnjo ogljikovih hidratov in proteinov ter ohranjanje alifatske (lipidne) komponente. Podobne ugotovitve so zasledili tudi Kovač in sod. (2002), ki so spremljali časovno razgradnjo makroagregatov s spremembami deležev posameznih organskih

komponent v makroagregatih z uporabo ^1H NMR spektroskopije. Avtorji so ugotovili, da razmerje med lipidi in ogljikovimi hidrati raste od 1.1 v svežih do 3.4 v vzorcih starih tri mesece, kar je lahko posledica, da so ogljikovi hidrati vezani z lipidi preko esterskih in amidnih vezi manj razgradljivi. To potrjujejo tudi analize nevtralnih monosaharidov, saj je bila koncentracija glukoze v svežih do trikrat višja kot pa v starejših sedimentiranih makroagregatih (Faganeli in sod., 1995). Vzrok je najbrž v hidrolizi rezervnih in tistih glukanov, ki niso vezani na lipide (alifatske strukture). Absorpcijski vrhovi, ki ostanejo vidni v FTIR spektrih encimsko obdelanih usedlin tako najverjetneje pripadajo težko razgradljivim in bolj zamreženim ogljikovim hidratom, proteinom (oziroma dušik vsebujoči komponenti) ter silikatom. Lahko bi sklepali, da gre za določene dele oz. ostanke bakterijskih in fitoplanktonskih polisaharidov, glikoproteinov in lipopolisaharidov, ki so dokaj odporni na hidrolizo. Vsi zgoraj opisani rezultati dokazujejo, da se najverjetneje rezervni polisaharidi v makroagregatih hitro razgrajujejo v nasprotju z bolj obstojnimi heteropolisaharidi, vezanimi na lipide. Ti rezultati se ujemajo tudi z rezultati razgradnje fitoplanktonskih eksopolimerov v kulturah mikroalg in njihovo elementno analizo (Aluwihare in Repeta, 1999).

Tudi encimska razgradnja proteinov v makroagregatih poteka hitro in se ujema s prejšnjimi raziskavami razgradnje proteinov v suspendirani snovi v Tržaškem zalivu (Posedel in Faganeli, 1991). Kot je bilo že prej omenjeno, ob razgradnji polisaharidne komponente kompleksnega organskega matriksa potekajo vzporedno tudi pretvorbe/razgradnja proteinov. Spremembe proteinske komponente so v naših FTIR spektrih vidne kot zmanjšanje in premik absorpcijskega vrha od 1635 cm^{-1} k 1656 cm^{-1} (značilnega za proteine) v spektrih encimsko obdelanih vzorcev. To nam potrjuje obstoj določenih interakcij med proteini in ogljikovimi hidrati. Primerjava encimske razgradnje proteinov pri delovanju s pankreatinom in z mešanico encimov proteinaze K in proteaze nam pokaže večjo učinkovitost pri dodatku zmesi encimov proteinaze K in proteaze. Podobno kot pri razgradnji ogljikovih hidratov je ta rezultat verjetno posledica manjše koncentracije dodanih encimov v raztopini pankreatina, ki razgrajujejo proteine. Pri dodatku mešanice encimov proteinaze K in proteaze pa smo najprej izmerili višjo koncentracijo proteinov (glede na kontrolno vrednost), nato pa izrazit padec koncentracije proteinov. Verjetno encimi s svojim učinkovanjem najprej omogočijo vezavo barvila na prej nedostopne

aminokislinske skupine, v naslednji fazi pa sledi intenzivna razgradnja sproščenih proteinov, kar se odraža kot izrazit padec koncentracije proteinov. Večina proteinov je v makroagregatih povezana z drugimi alifatskimi, sladkornimi oz. mineralnimi komponentami. Različni encimi v pankreatinu verjetno postopoma razgrajujejo vse komponente, ki so povezane s proteini ter omogočijo večji dostop do proteinov. Na ta način omogočijo bolj postopno hidrolizo proteinov.

Moramo pa poudariti, da koncentracije spektrofotometričnih merjenih sestavin ne odražajo vedno dejansko vsebnost oz. količino sestavine, ki jo merimo. Trenutno izmerjena koncentracija je v veliki meri odvisna od kemijske sestave, strukture ter zamreženosti vzorca in s tem povezane trenutne dostopnosti (npr. zaradi delovanja encimov) substrata za encime in nadalje aktivnih mest za vezavo barvila in tvorbe obarvanega kompleksa, ki je osnova določanja koncentracije merjene sestavine.

Analiza spektrov FTIR encimsko obdelanih usedlin in vodne faze (dobljene po centrifugiranju celotne eksperimentalne raztopine; glej poglavje 3.2.3) kaže tudi povezanost organske komponente in mineralov. Pri tem smo opazili predvsem močno interakcijo mineralov z ogljikovimi hidrati v matriksu usedline površinskega vzorca. Pri učinkovnjju z zmesjo encimov α -amilaze in β -glukozidaze na usedlino površinskega vzorca, so se le-ti sproščali v vodno fazo z manjšimi enotami ogljikovih hidratov tudi nanje «na nek način vezani» minerali, kar je dobro vidno na sliki 26. Podobno smo sklepali tudi na osnovi spektrov FTIR encimsko (z α -amilazo in β -glukozidazo) obdelane usedline iz vodnega stolpca, toda sami FTIR spektri odgovarjajoče vodne faze tega ne kažejo jasno kot v primeru površinskega vzorca. Verjetno je temu vzrok večja heterogenost in večja zamreženost (tudi sladkorne in mineralne komponente) samega vzorca iz vodnega stolpca.

Iz tega sklepamo, da obstajajo določene interakcije/asociacije med ogljikovimi hidrati in minerali, ter da so te precej izrazitejšje od povezav s proteini, oziroma da so mineralni delci na določen način «ujeti» in povezani v polisaharidni matriks in se lahko z njegovo razgradnjo sprostijo.

Z našimi rezultati smo potrdili, da je zamreženost organskega matriksa vsekakor bistvena za razgradnjo, dostopnost in sproščanje hidroliziranih sestavin makroagregatov. Pri tem lahko sklepamo, da imamo v vzorcu "vodni stolpec" verjetno večjo zamreženost matriksa, saj je njegova struktura bolj gosta in gre za bolj tesne povezave (Kovač in sod., 2005) ter da gostota povezav vsekakor vpliva na možnost razgradnje tega vzorca.

5.2 POMEN ENCIMSKE RAZGRADNJE OGLJIKOVIH HIDRATOV IN PROTEINOV V MAKROAGREGATIH TRŽAŠKEGA ZALIVA

Makroagregati iz Tržaškega zaliva so v letu 2004 vsebovali 7-16 % totalnih ogljikovih hidratov in 1-2 % proteinov. Z encimi hidrolizirani ogljikovi hidrati in proteini so predstavljali približno 70 % celotnih ogljikovih hidratov in 50 % celotnih proteinov v teh vzorcih makroagregatov, kar kaže, da je organska snov v makroagregatih razgradljiva >50 % med sedimentacijo v stratificiranem vodnem stolpcu v poletnem obdobju. Razgradnja totalnih ogljikovih hidratov v makroagregatih, določena iz spremembe kemične sestave sedimentirane organske snovi, je podobna razgradnji v suspendirani organski snovi med sedimentacijo v stratificiranem vodnem stolpcu, v poletnem obdobju treh mesecev v Tržaškem zalivu ob prisotnosti makroagregatov, razgradnja proteinov pa je približno 2-krat manjša (Posedel in Faganeli, 1991). Dejansko naj bi alifatske verige vezane na ogljikove hidrate in/ozroma na mineralne delce (silikati), bile odgovorne za dolg obstoj in stabilnost makroagregatov v morju. Nerazgrajena organska snov se deponira v morskem sedimentu, kjer se dalje selektivno razgrajuje. Opisana razgradljivost makroagregatov je precej večja kot razgradljivost organske snovi v površinskem morskem sedimentu, saj npr. Dell'Anno in sod. (2000) navajajo 13 % razgradnjo za totalne ogljikove hidrate in 10-20 % za proteine v Atlantiku. Nadaljna razgradnja makroagregatov v sedimentu torej poteka bolj počasi, kar je tudi razumljivo glede na okoljske pogoje znotraj sedimenta (anoksija), vendar pa je potrebno poudariti da se določeni deli organske snovi, ki se v vodnem stolpcu ne razgradijo v sedimentu lahko precej hitro razgradijo. Razlog temu je verjetno popolnoma drugačen spekter encimov bakterij, ki so prisotne v sedimentu (Arnosti, 2004).

V primerjavi z dosedanjimi raziskavami makroagregatov smo tudi mi podobno ugotovili, da imajo bakterijski encimi ključno vlogo pri razgradnji kompleksne strukture makroagregatov, predvsem zaradi njihove raznovrstnosti (možnost hidrolize najrazličnejših sestavin makroagregatov) in visoke učinkovitosti glede na spreminjajočo se sestavo razpoložljivega substrata tj. makroagregatov.

V določeni meri poteka še fotokemična razgradnja makroagregatov, ki je pomembna predvsem v plitvem vodnem stolpcu, kjer tako nastali nižje molekularni substrati (npr. monosaharidi) predstavljajo dodaten izvor hranil za mikroorganizme in tako stimulirajo nadaljno mikrobno razgradnjo makroagregatov (Kovač in sod., 1998).

6 SKLEPI

- Iz kvantitativnih spektrofotometričnih meritev smo ugotovili, da so koncentracije ogljikovih hidratov in proteinov višje v površinskem vzorcu kot v vzorcu iz vodnega stolpca, kar se dopolnjuje z rezultati elementne analize, ki je prav tako pokazala višjo vsebnost organske snovi v površinskem vzorcu. Pri obeh vzorcih pa smo imeli opazne spremembe v koncentracijah ogljikovih hidratov in proteinov. Iz tega lahko sklepamo da poteka razgradnja organske snovi makroagregatov že med njihovim nastankom in razvojem ter med sedimentacijo na morsko dno.
- Meritve koncentracij ogljikovih hidratov v in brez prisotnosti antibiotika kažejo, da poteka razgradnja makroagregatov hitro (največji preskoki merjenih koncentracij ogljikovih hidratov in proteinov se pokažejo v prvih 30 minutah eksperimenta) in je mikrobno vodena. Pri tem smo ugotovili izjemno učinkovitost v makroagregatih prisotnih mikroorganizmov, ki so takoj začeli s svojimi encimi hidrolizirati daljše verige polisaharidov in hkrati porabljati mono- in oligosaharide nastale zaradi delovanja dodanih encimov.
- Iz sprememb koncentracij ogljikovih hidratov in spremljanja delovanja posameznih encimov smo ugotovili, da je delovanje α -amilaze bolj učinkovito, kot delovanje β -glukozidaze, kar nakazuje na to, da so bili v obravnavanih vzorcih rezervni $\alpha(1-4)$ polisaharidi planktonskih celic favoriziran in lažje razgradljiv substrat za bakterijske encime.
- Rezultati spektroskopskih FTIR analiz encimsko hidroliziranih vzorcev so nam pokazali, da razgradnjo organskega matriksa makroagregatov spremljajo sočasne pretvorbe oziroma razgradnja/sproščanje ogljikovih hidratov in proteinske frakcije ter v manjši meri tudi lipidov. To nam potrjuje obstoj različnih interakcij med posameznimi organskimi sestavinami osnovnega omrežja makroagregatov. Med učinkovito hidrolizo ogljikovih hidratov in proteinov makroagregatov se ohranja lipidna (alifatska) komponenta. Sklepamo, da gre za ohranjanje predvsem težko

razgradljivih glikolipidov in lipoproteinov bakterijskih celic ter lipidov fitoplanktonskih celičnih sten, ki so v veliki meri odporni na hidrolizo.

- Prav tako smo s pomočjo rezultatov FTIR spektroskopije ugotovili, da obstajajo določene povezave med minerali in organskimi sestavinami makroagregatov. Dobljeni rezultati kažejo močnejše povezave med ogljikovimi hidrati in minerali glede na povezave ogljikovih hidratov s proteini.
- Povzamemo lahko da je organski matriks oziroma omrežje, ki predstavlja osnovno strukturo makroagregatov, sestavljen večinoma iz polisaharidov. V njem so prisotne različne povezave med ogljikovimi hidrati, proteini, lipidi in minerali. Struktura in povezave znotraj matriksa so verjetno pomembne za nastanek, razvoj in še posebno za razgradnjo makroagregatov, kjer imajo bakterijski encimi ključno vlogo pri razgradnji kompleksne strukture makroagregatov.

7 POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo spremljali proces encimske razgradnje vzorcev morskih makroagregatov (na površini in v vodnem stolpcu) iz Tržaškega zaliva, s posebnim poudarkom na strukturnih spremembah posameznih komponent, ki so v naravi predmet mikrobne razgradnje.

Tržaški zaliv zaradi svojih specifičnih hidrografskih in meteoroloških pogojev ter prisotne evτροφikacije morja predstavlja idealen sistem za nastanek morskega snega in sluzastih makroagregatov. Makroagregati se v tem predelu Jadrana pojavljajo periodično skoraj vsako leto. Dosedanje raziskave kažejo, da je mehanizem nastanka makroagregatov povezan z visokimi koncentracijami raztopljenih makromolekul fitoplanktonskega izvora, ki nato agregirajo. V organski snovi makroagregatov prevladujejo ogljikovi hidrati, proteini in lipidi in kljub temu, da je v makroagregatih prisotna precej velika populacija mikroorganizmov, ki imajo na voljo potrebne nutriende, so makroagregati dokaj obstojna formacija v morju. Zaradi negativnih posledic prisotnosti makroagregatov v morju, predvsem za turizem, marikulturo in ribištvo, obstaja veliko zanimanje za razumevanje njihovega nastanka, zgradbe in razgradnje. Komponente, ki sestavljajo makroagregate so zelo različne, spreminjajo se časovno in so podvržene najrazličnejšim zunanjim dejavnikom. Medsebojna povezava strukturnih komponent ter mehanizem nastanka in mikrobne razgradnje makroagregatov sta še vedno precejšnji uganki.

V okviru diplomske naloge smo zato izvedli laboratorijski poskus z inkubacijo vzorcev v pogojih, ki so čimbolj podobni naravnim pogojem na mestu vzorčenja. Vzorcem smo dodajali različne kombinacije encimov ter v enakih časovnih intervalih spektrofotometrično določali koncentracije proteinov in ogljikovih hidratov med eksperimentom. Sestavo in strukturne spremembe (možne načine povezav posameznih kemičnih skupin) izbranih vzorcev (pred in po encimski razgradnji) smo spremljali tudi s pomočjo FTIR spektroskopije. Iz strukturnih sprememb, ki se dogajajo med encimsko razgradnjo, smo želeli dobiti vpogled v spremembe, ki naj bi se dogajale v naravi kot posledica delovanja mikroorganizmov.

Glede na dobljene rezultate lahko povzamemo, da je razgradnja makroagregatov mikrobno vodena ter da poteka že med razvojem in potem sedimentacijo makroagregatov v vodnem stolpcu. Ugotovili smo, da imamo v makroagregatih prisotno avtohtono združbo mikroorganizmov, ki aktivno hidrolizira zamrežene dele matriksa in pri tem porablja tako nastale nižjemolekularne produkte (mono- in oligosaharide).

Delovanje dodanih encimov nam pokaže večjo vsebnost in dostopnost substrata z $\alpha(1-4)$ vezmi, verjetno rezervnih polisaharidov planktona. FTIR rezultati pred in po dodatku encimov nam pokažejo sočasne pretvorbe ogljikovih hidratov in proteinske frakcije ter sočasno pretežno ohranjanje lipidne (alifatske) komponente znotraj makroagregatov. To nam pove, da v zamreženem matriksu makroagregatov obstajajo povezave med posameznimi organskimi sestavinami (ogljikovimi hidrati, proteini in lipidi). Skozi encimsko razgradnjo se tako ohranja predvsem težko razgradljiva frakcija lipidne komponente, pri čemer so verjetno pomembni glikolipidi in lipoproteini bakterijskih celic ter lipidi celičnih sten fitoplanktona, ki so v veliki meri odporni na hidrolizo.

8 VIRI

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*, 186: 105- 117.

Antranikian G. 1992. Microbial degradation of starch. V: *Microbial degradation of natural product*. Winkelmann G. (ed.) Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 28-56.

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

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

Baldi F., Minacci A., Sailot A., Mesanelle L., Mozetič P., Turk V., Malej A. 1997. Cell lysis and release of particulate polysaccharides in extensive marine mucilage assessed by lipid biomarkers and molecular probes. *Marine Ecology Progress Series*, 153: 45-57.

Cottrell M.T., Kirchman D.L. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5116-5122.

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.

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

Denniston K.J., Topping J.J., Caret R.L. 2001. General, organic and biochemistry. 3rd ed. New York, McGraw-Hill: 822 str.

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.

Eilers H., Pernthaler J., Glockner F.O., Amann R. 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3044-3051.

Enzymes. 2002. Minnesota, Winona State University.

<http://bio.winona.edu/berg/ChemStructures/> (oktober 2005): 32 str.

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.

Fajon C., Cauwet G., Lebaron P., Terzič S., Ahel M., Malej A., Mozetič P., Turk V. 1999. The accumulation and release of polysaccharides by planktonic cells and the subsequent bacterial response during controlled experiment. *FEMS Microbial Ecology*, 29: 351-363.

Fonda Umani S., Ghirardelli E., Specchi E.M. 1989. Gli episodi di mare sporco nell'Adriatico dal 1729 ai giorni nostri. Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia. Trieste, Direzione Regionale dell'Ambiente. 178 str.

Ghost B.K., Ghost A. 1992. Degradation of cellulose by fungal cellulase. V: Microbial degradation of natural product. Winkelmann G. (ed.) Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 84-126.

Hagstrom A., Pinhassi J., Zweifel U.L. 2000. Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 21: 231-244.

Hedges J.J., Keil R.G. 1999. Organic geochemical perspectives on estuarine processes: sorption reactions and consequences. *Marine Chemistry*, 65: 55-65.

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. 1992. Marine snow in the northern Adriatic Sea: possible causes and consequences for a shallow ecosystem. *Marine Microbial Food Webs*, 6: 149-172.

Herndl G.J., Arrieta J. M., Stoderegger K. 1999. Interaction between specific hydrological and microbial activity leading to extensive mucilage formation in the northern Adriatic Sea. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 35: 405-409.

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

Kovač N. 1994. Pretvorbe suspendirane organske snovi med sedimentacijo v vodnem stolpcu. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 48 str.

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

Kovač N., Bajt O., Faganeli J., Sket B., Orel B. 2002. Study of macroaggregate composition using FT-IR and ¹H-NMR spectroscopy. *Marine Chemistry*, 78: 205-215.

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

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

Kovač N., Faganeli J., Sket B., Bajt O. 1998. Characterization of macroaggregates and photodegradation of their water soluble fraction. *Organic Geochemistry*, 29: 1623-1634.

Kovač N., Mozetič P., Trichet J., Defarge C. 2005. Phytoplankton composition and organic matter organization of mucous aggregates by means of light and cryo-scanning electron microscopy. *Marine Biology*, 147: 261-271.

La Ferla R., Zaccone R., Azzaro M., Caruso G. 2002. Microbial respiratory and ectoenzymatic activities in the northern Adriatic Sea (Mediterranean sea). *Chemistry and Ecology*, 18: 75- 84.

Leppard G. G. 1999. Structure /function /activity relationships in marine snow. Current understanding and suggested research thrusts. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 35: 389-395.

Morihara K., Oda K. 1992. Microbial degradation of proteins. V: Microbial degradation of natural product. Winkelmann G. (ed.) Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 294-364.

Penna N., Berluti S., Penna A., Ridolfi F. 2000. Study and monitoring of mucilage in the Adriatic Sea. *Water Science and Technology*, 42: 299-304.

Penna N., Capellacci J., Ricci F., Kovač N. 2003. Characterisation of carbohydrates in mucilage samples from northern Adriatic sea. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376: 436-439.

Položaj MBP Piran. 2002. Piran, Morska biološka postaja Piran.
<http://portal.mbss.org/portal.php?do=location> (oktober 2005): 1str.

Posedel N., Faganeli J. 1991. Nature and sedimentation of suspended particulate matter during density stratification in shallow coastal waters (Gulf of Trieste, Northern Adriatic). *Marine Ecology Progress Series*, 77: 135-145.

Rath J., Herndl G.J. 1994. Characteristics and diversity of β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) activity in marine snow. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 807-813.

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

Stachowitsch M., Fanuko N., Richter M. 1991. Mucous aggregates in the Adriatic Sea: an overview of types and occurrences. *Marine Ecology*, 11: 327-350.

Šolič M., Krstulović N. 2000. *Ekologija morskog bakterioplanktona*. Split, Institut za oceanografiju i ribarstvo: 452 str.

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

Zaccone R., Caruso G. 2002. Microbial hydrolysis of polysaccharides and organic phosphates in the northern Adriatic Sea. *Chemistry and Ecology*, 18: 85-94.

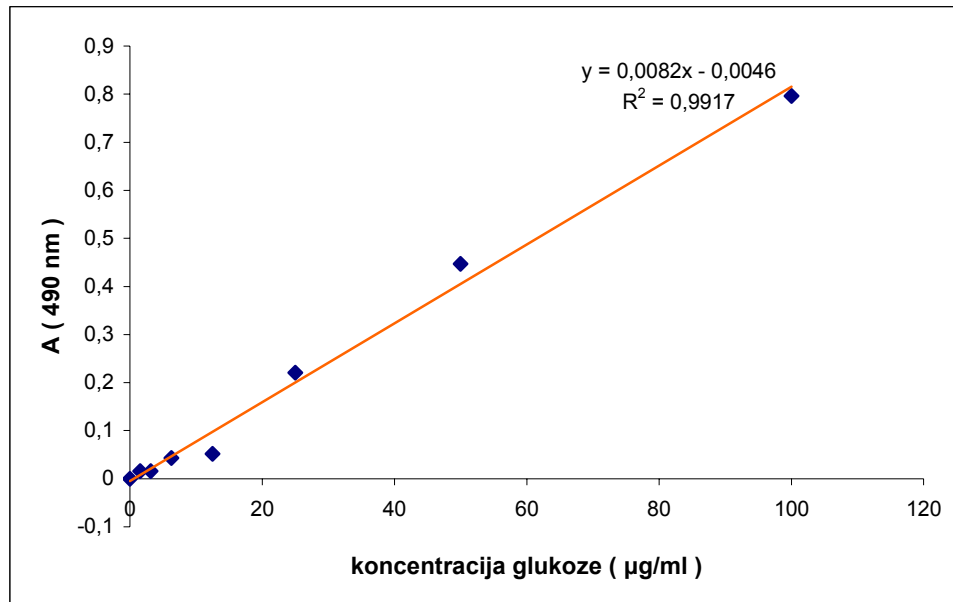
Zaccone R., Caruso G., Cali C. 2002. Heterotrophic bacteria in the northern Adriatic Sea: seasonal changes and ectoenzyme profile. *Marine Environmental Research*, 54: 1-19.

ZAHVALA

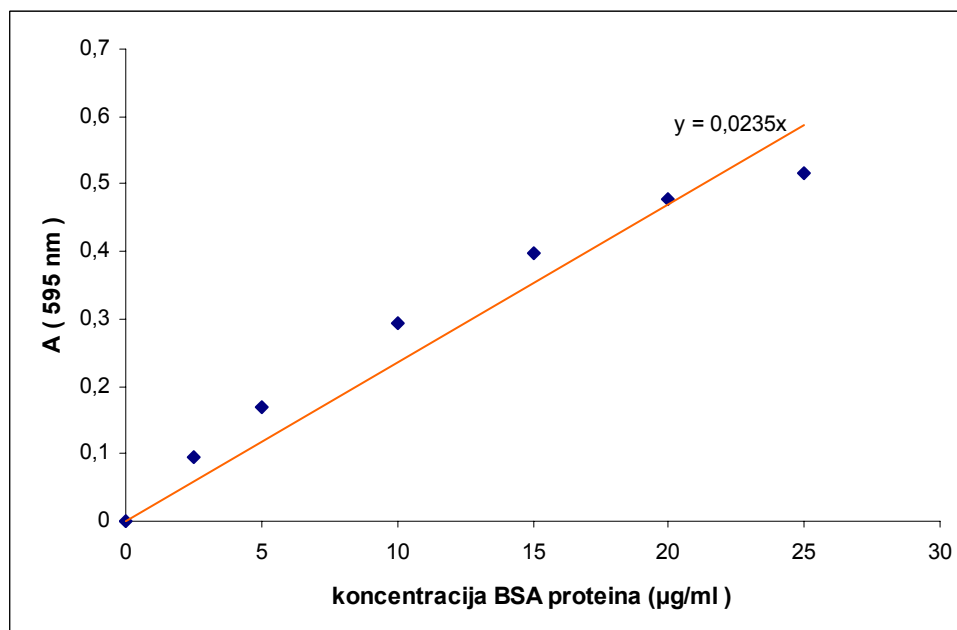
Zahvaljujem se svojima mentorjema prof. dr. Faganeliju in doc. dr. Kovač ter vsem delavcem Morske biološke postaje v Piranu, ki so mi pomagali pri mojem delu (dr. Valentina Turk, dr. Patricija Mozetič, dr. Oliver Bajt, dr. Vesna Flander Putrle, mag. Branko Bogunović, Jamšek Meta, Silva Maslo, Mira Avčin, Tihomir Makovec, Alma Hvala, Vlado Bernetič in ostali). Posebej se še zahvaljujem dr. Angeli Šurci Vuk na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, ki je naredila spektroskopske FTIR analize in nam pomagala pri njihovi interpretaciji.

Največa hvala mome tati i mami.

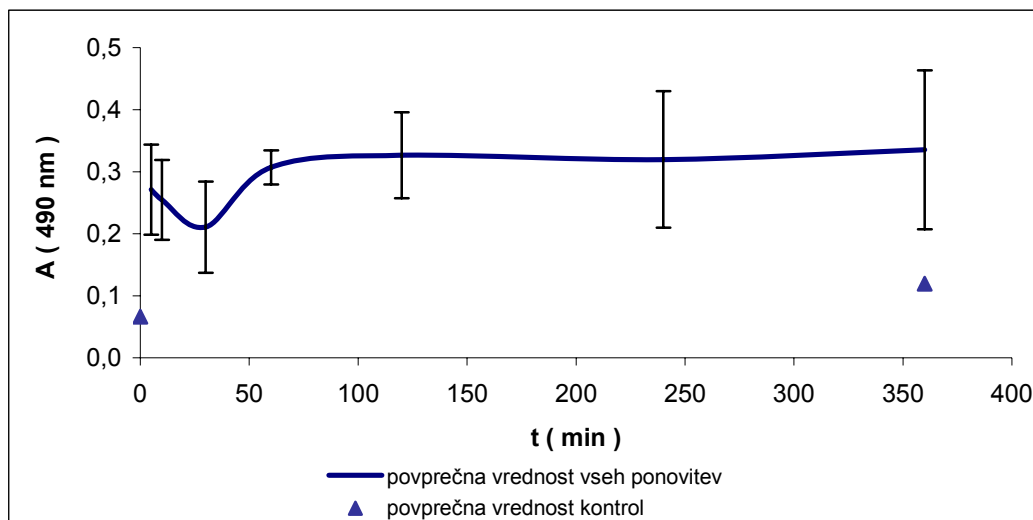
PRILOGE



Priloga A 1: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije ogljikovih hidratov

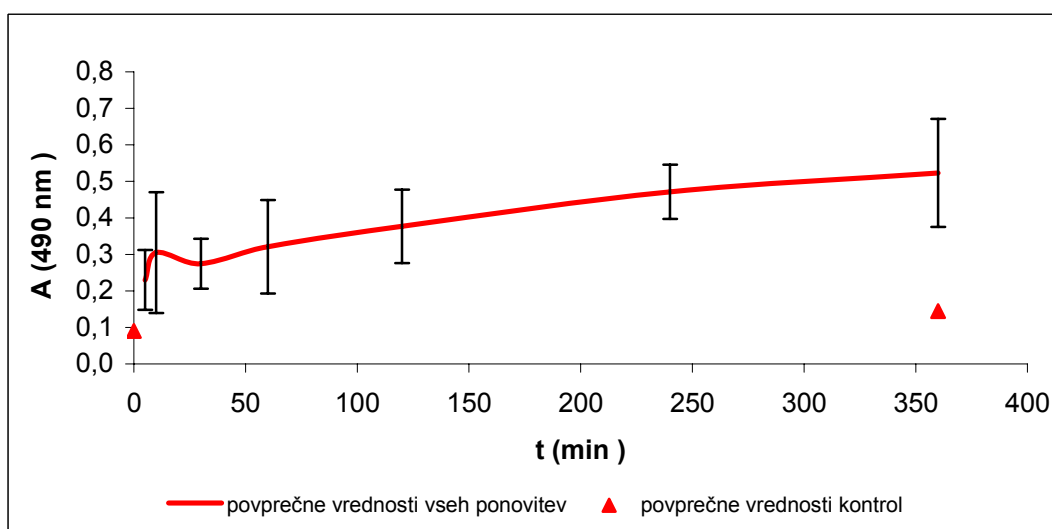


Priloga A 2: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov



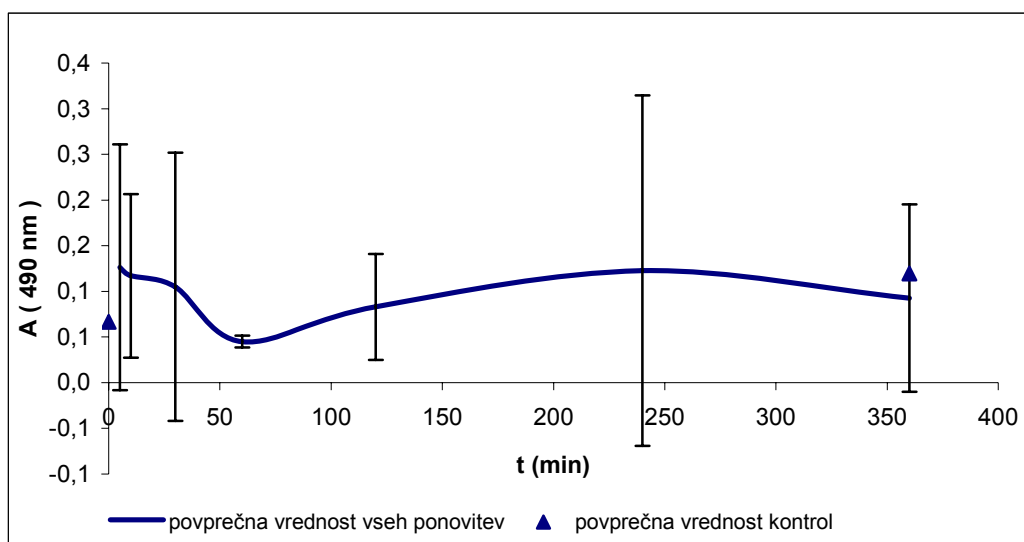
* navpične črte prikazujejo standardni odklon vrednosti

Priloga B 1: Spreminjanje vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov β -glukozidaze in α -amilaze za usedlino vzorca "vodni stolpec"



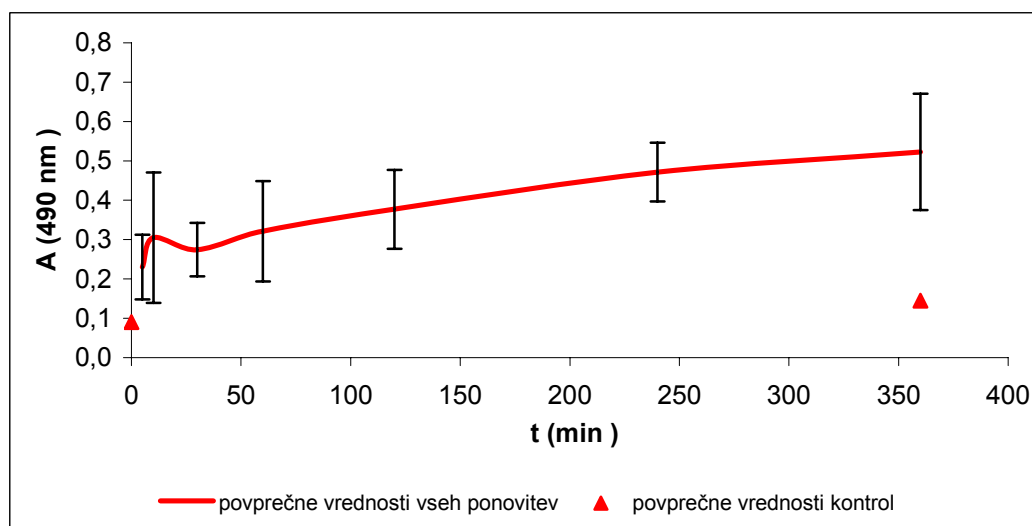
* navpične črte prikazujejo standardni odklon vrednosti

Priloga B 2: Spreminjanje vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov β -glukozidaze in α -amilaze za usedlino vzorca "površina"



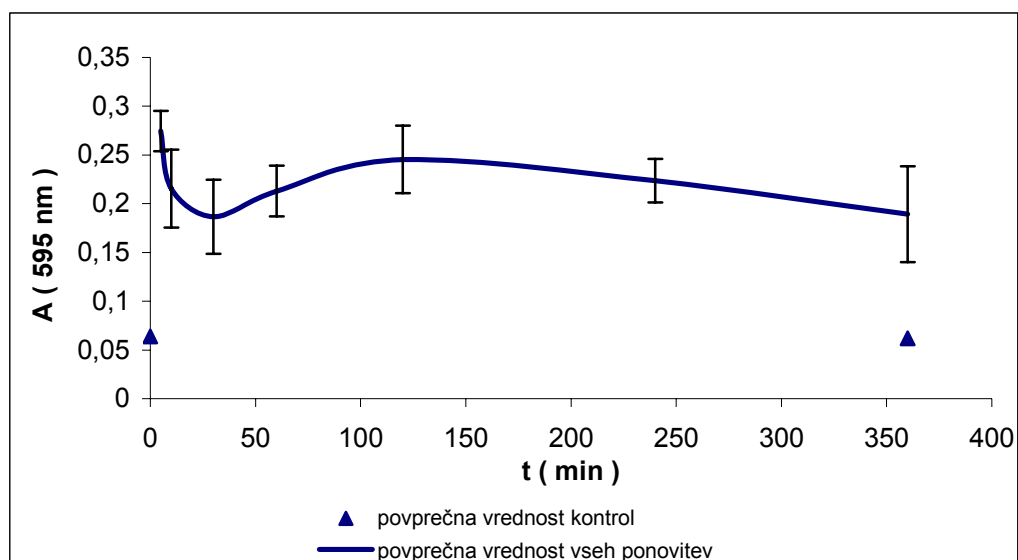
* navpične črte prikazujejo standardni odklon vrednosti

Priloga C 1: Spreminjanje vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa delovanja pankreatina za usedlino vzorca "vodni stolpec"



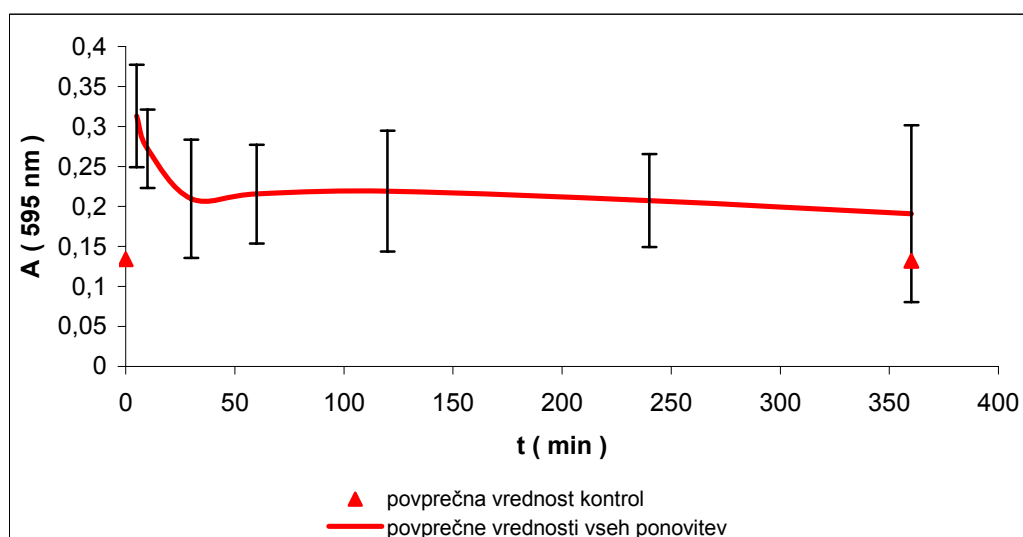
* navpične črte prikazujejo standardni odklon vrednosti

Priloga C 2: Spreminjanje vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa delovanja pankreatina za usedlino vzorca "površina"



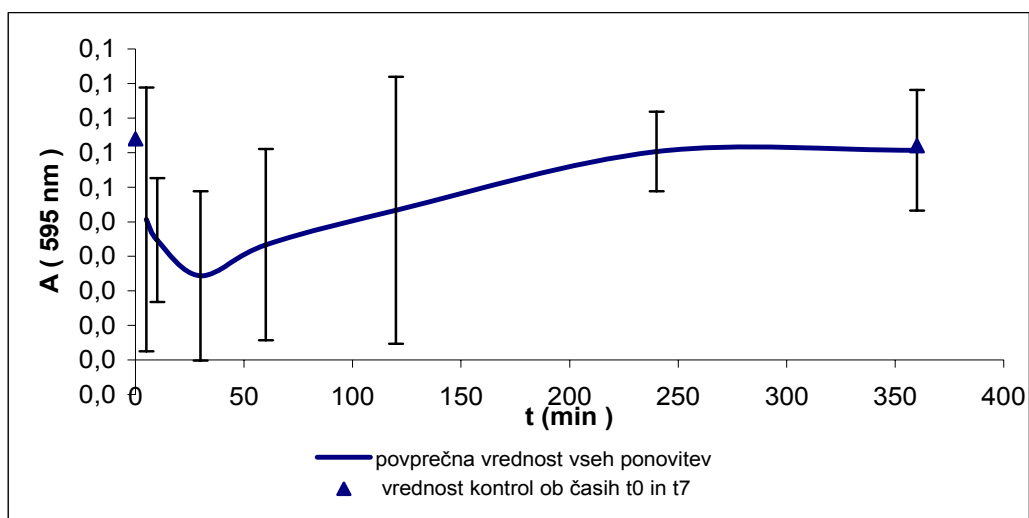
* navpične črte prikazujejo standardni odklon vrednosti

Priloga D 1: Spremembe vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov proteaze in proteinaze K za usedlino vzorca "vodni stolpec"



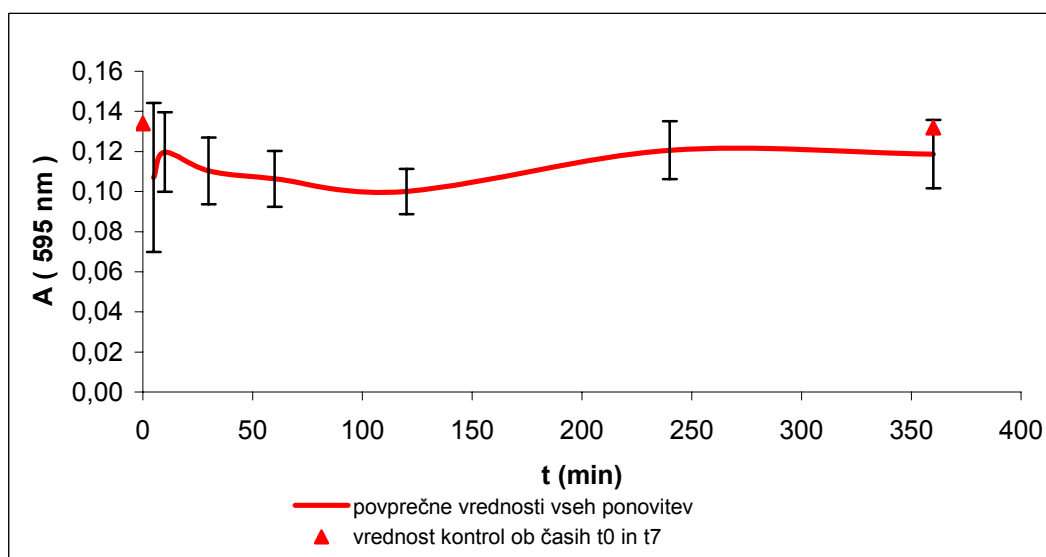
* navpične črte prikazujejo standardni odklon vrednosti

Priloga D 2: Spremembe vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa skupnega delovanja encimov proteaze in proteinaze K za usedlino vzorca "površina"



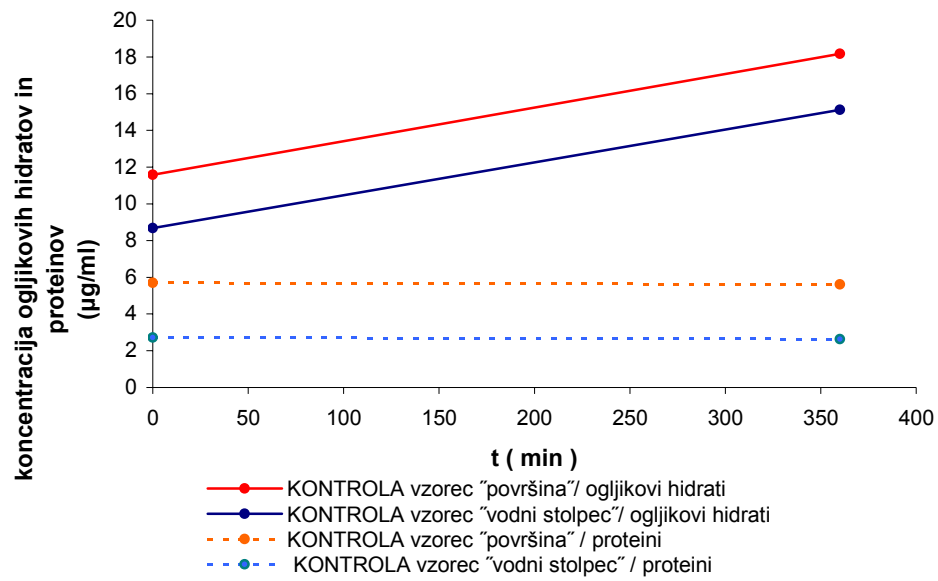
* navpične črte prikazujejo standardni odklon vrednosti

Priloga E 1: Spremembe vrednosti absorbanc (pri meritvi proteinov) v odvisnosti od časa delovanja pankreatina za usedlino vzorca "vodni stolpec"



* navpične črte prikazujejo standardni odklon vrednosti

Priloga E 2: Spremembe vrednosti absorbanc (pri meritvi proteinov) v odvisnosti od časa delovanja pankreatina za usedlino vzorca "površina"



Priloga F: Spremembe koncentracij ogljikovih hidratov in proteinov pri kontrolnih vzorcih - brez dodanih encimov (obeh vzorcev "površina" in "vodni stolpec")

Priloga G: Preglednica glavnih signalov/absorpcijskih trakov določenih v FTIR spektrih makroagregatov severnega Jadrana (Kovač in sod., 2004; Kovač in sod., 2006)

Lega absorpcijskih trakov (valovno št./cm ⁻¹)	Pripadajoče skupine/spojine
500-3000	– OH in NH skupine
3000-2800	– <i>alkilne skupine</i> (–CH ₃ , –CH ₂)
1700-1740	– C=O karbonilne skupine (karboksilnih kislin, estrov, ketonov)
1630-1656	– C=O nihanja (amid I, proteini) – C=C vezi (aromati, alkeni) – signali vode
1520-1545	– N-C=O nihanja (amid II, proteini)
≈ 1430	– prečno nihanje -CH ₃ in -CH ₂ skupin – signali karbonata
≈ 1240-1250	– C-O signali etrov in karboksilnih kislin
900-1200	– polisaharidi, – silikati
≈ 1080, ≈ 1030, 800, 777, 472	– silikati
≈ 2520, 1796, 1430, 876, 713	– karbonati
778, 799 (780, 800)	– SiO ₂ (absorpcijski vrhi tudi pri ≈ 1162, 1072 – 1080, 462 and 512 cm ⁻¹)
< 700cm ⁻¹	– signali vode – signali soli