

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja KLUN

**SESTAVA KOLOIDNE ORGANSKE SNOVI IN NJENA  
KOMPLEKSACIJA S KOVINAMI V OBALNEM MORJU (TRŽAŠKI  
ZALIV)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**COMPOSITION AND COMPLEXATION OF COLLOIDAL ORGANIC  
MATTER IN COASTAL SEA (GULF OF TRIESTE)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 42. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 25. 9. 2013 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) je bilo potrjeno, da kandidatka Katja Klun izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na bolonjskem Interdisciplinarnem doktorskem študiju Varstvo okolja. Doktorsko delo je bilo opravljeno na Morski biološki postaji Piran, ki je del Nacionalnega inštituta za biologijo. Delo je bilo financirano s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Jadran Faganeli, za somentorico pa doc. dr. Ingrid Farnoga.

Komisija za oceno in zagovor doktorske disertacije:

Predsednik: prof. dr. Domen Leštan

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Boris Šket

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za organsko kemijo

Član: prof. dr. Mihael Jožef Toman

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 5.2.2016

Podpisana izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katja Klun

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dd  
DK UDK 628.394:628.4.045(262.3Tržaški zaliv)(26.05) (043.3)=163.6  
KG koloidna organska snov/agregacija/<sup>1</sup>H NMR/kovine/Tržaški zaliv  
AV KLUN, Katja, univ. dipl. kemičarka  
SA FAGANELI, Jadran (mentor); FALNOGA, Ingrid (somentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Univerzitetni podiplomski študij  
Varstvo okolja  
LI 2016  
IN SESTAVA KOLOIDNE ORGANSKE SNOVI IN NJENA KOMPLEKSACIJA S  
KOVINAMI V OBALNEM MORJU (TRŽAŠKI ZALIV)  
TD Doktorska disertacija  
OP XIII, 95 str., 11 pregl., 33 sl., 90 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V Tržaškem zalivu so se v preteklosti pozno spomladi/na začetku poletja periodično pojavljali sluzasti makroagregati, ki so bili na zadnje opaženi leta 2004. Prekurzor za nastanek tovrstnih agregatov je koloidna organska snov (COM), zato smo se osredotočili na študij sezonskih sprememb vsebnosti, sestave in izvora COM. Uporabili smo spektroskopijo <sup>1</sup>H NMR in FTIR ter kromatografijo HPSEC za opazovanje sprememb v sestavi in velikosti COM. Rezultati so pokazali, da se predvsem vsebnost lipidov v COM do poletja zviša, kar lahko dodatno vpliva na nastanek mikro- in makrogelov. HPSEC nam je potrdil, da proti poletju prihaja do agregacije COM, saj VM COM predstavlja večino COM (95 %), medtem ko se NM COM od zime do poletja bistveno zniža (iz 45 % na 5 %). Avgusta se njuni razmerji skoraj izenačita, kar nakazuje tvorbo mikro- in makrogelov ali pa povišano mikrobno razgradnjo. Karakterizacija COM izolirane iz fitoplanktonskih kultur iz Tržaškega zaliva je pokazala, da fitoplankton k sestavi in strukturi COM prispeva predvsem z vsebnostjo polisaharidov. Z ICP-MS in CVAAS smo spremljali sezonske spremembe vsebnosti kovin v koloidni frakciji. Hg in Cu imata največjo afiniteto do COM, kar se je pokazalo v pozitivni korelaciji s COM. Tako kot COM se tudi Hg in Cu akumulirata do julija, v avgustu pa njuna vsebnost hitro pada, kar je lahko posledica agregacije ali mikrobne razgradnje COM. Podatki vsebnosti kovin preko slanostnega transekta reke Soče kažejo, da se nekatere kovine pojavijo v vodnem stolpcu kot posledica desorpcije delcev, ki so jih nanesle reke. Druge kovine in tudi COM se ob višanju ionske moči agregirajo in potonejo, kar se pokaže v nižji vsebnosti kovin in COM na izlivu reke Soče.

#### KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)

DN Dd  
DC UDK 628.394:628.4.045(262.3Tržaški zaliv)(26.05) (043.3)=163.6  
CX colloidal organic matter/aggregation/<sup>1</sup>H NMR/metals/Gulf of Trieste  
AU KLUN, Katja  
AA FAGANELI, Jadran (supervisor); FALNOGA, Ingrid (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, University postgraduate study programme in environmental protection  
PY 2016  
TI COMPOSITION AND COMPLEXATION OF COLLOIDAL ORGANIC MATTER IN COASTAL SEA (GULF OF TRIESTE)  
DT Doctoral Dissertation  
NO XIII, 95 p., 33 fig., 11 tab., 90 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The phenomenon of mucous macroaggregates, which periodically occur in late spring/early summer, was last seen in 2004. Colloidal organic matter (COM) acts as a precursor to such aggregates, which is why we focused on the seasonal dynamics of content, composition and molecular size of COM. We used <sup>1</sup>H NMR and FTIR spectroscopy and HPSEC chromatography to observe changes in COM composition and size. The results showed that lipid fraction in COM increased towards summer, which may have impacted micro- and macrogel formation. The HPSEC demonstrated that COM aggregated from the winter to the summer months. HMW COM was the most abundant (95%). Conversely, the LMW COM, from winter to summer, decreased from 45% to 5%. In August, the ratio between the two fractions of COM was almost equal, which indicated either the formation of micro- and macrogels or that it was consumed via microbial degradation. Characterization of COM isolated from phytoplankton cultures from the Gulf of Trieste showed that phytoplankton mostly contributes, along with polysaccharides, to the COM pool. We used ICP-MS and CVAAS to observe the seasonal dynamics of metal content in the COM. Hg and Cu showed the highest metal affinity to COM, which was reflected in a positive correlation to COM. As with the COM content, Hg and Cu also rapidly decreased from July to August, which may have been due to either sequestration of the aggregates or increased microbial degradation in August. Data of the metal content from the salinity gradient of the Isonzo River showed that some metals occurred in the water column of the Gulf by desorption from particles transported by the river. Other metals, as well as COM, aggregated in the Isonzo River mouth because of increasing ionic strength, which was reflected in the lower metal content in the river mouth compared to the river.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....	III
KEY WORD DOCUMENTATION (KWD) .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PREGLEDNIC .....	VIII
KAZALO SLIK .....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XIII
1      UVOD .....	II
1.1    OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2    CILJI IN HIPOTEZE .....	2
2      PREGLED OBJAV/DOSEDANJA RAZISKOVANJA .....	4
2.1    Kroženje ogljika v morju .....	4
2.1.1    Raztopljena organska snov (DOM) in njen koloidni del (COM) .....	6
2.1.2    Izvor in ponor raztopljene organske snovi (DOM) .....	10
2.1.3    Mikro- in makrogeli .....	14
2.2    KROŽENJE KOVIN IN POLKOVIN V MORSKEM OKOLJU .....	16
2.2.1    Kompleksacija kovin s koloidno organsko snovjo .....	18
2.2.2    Biogeokemijsko kroženje Hg v morju .....	20
2.3    PODROČJE RAZISKAV – TRŽAŠKI ZALIV .....	21
2.3.1    Osnovni podatki .....	21
2.3.1.1    Pojav sluzastih makroagregatov .....	22
3      MATERIAL IN METODE .....	24
3.1    VZORČENJE IN IZOLACIJA COM .....	24
3.1.1    Časovne spremembe COM .....	24
3.1.2    Vzorčenje v reki Soči in na izlivu reke Soče .....	26

3.2	IZOLACIJA COM IZ KULTUR FITOPLANKTONA .....	27
3.3	ANALIZNI POSTOPKI .....	29
3.3.1	<b>Elementna in izotopska analiza C in N</b> .....	29
3.3.2	<b>Analiza DOC</b> .....	29
3.3.3	<b>Spektroskopija FT-IR in NMR</b> .....	30
3.3.4	<b>Analiza HPSEC</b> .....	30
3.3.5	<b>Analiza EEM in PARAFAC</b> .....	31
3.3.6	<b>Analiza ICP-MS vsebnosti kovin in polkovin</b> .....	32
3.3.7	<b>Analize vsebnosti celokupnega Hg z metodo CV-AAS</b> .....	33
4	<b>REZULTATI</b> .....	35
4.1	SEZONSKE SPREMEMBE COM IN DOM .....	35
4.1.1	<b>Variacija koncentracij in izvora COM in DOM</b> .....	35
4.1.2	<b>Variacija kemijske sestave COM</b> .....	38
4.1.2.1	Spektroskopija FT-IR .....	38
4.1.2.2	Spektroskopija $^1\text{H}$ NMR .....	40
4.1.2.3	Analiza HPSEC .....	49
4.2	SESTAVA COM V SOČI IN NA IZLIVU REKE SOČE .....	51
4.2.1	<b>Spektroskopija <math>^1\text{H}</math> NMR</b> .....	53
4.2.2	<b>Karakterizacija kromoforne raztopljeni organske snovi</b> .....	56
4.3	KARAKTERIZACIJA SESTAVE EPS IZOLIRANE IZ FITOPLANKTONSKIH KULTUR .....	57
4.4	VSEBNOST RAZTOPLJENIH KOVIN IN POLKOVIN .....	62
4.4.1	<b>Sezonske spremembe vsebnosti raztopljenih kovin in polkovin</b> .....	62
4.4.2	<b>Vsebnost kovin in polkovin v reki Soči in na izlivu reke Soče</b> .....	67
5	<b>RAZPRAVA</b> .....	68
5.1	KARAKTERIZACIJA KOLOIDNE ORGANSKE SNOVI (COM) .....	68

<b>5.1.1 Sezonske spremembe koncentracije, vsebnosti in izvora koloidne organske snovi (COM).....</b>	68
<b>5.1.2 Sezonske spremembe sestave koloidne organske snovi (COM) .....</b>	71
<b>5.1.3 Primerjava rečne in morske koloidne organske snovi (COM).....</b>	75
<b>5.1.4 Primerjava morske in fitoplanktonske koloidne organske snovi (COM) .....</b>	80
<b>5.2 KOMPLEKSACIJA KOVIN IN POLKOVIN S KOLOIDNO ORGANSKO SNOVJO.....</b>	84
<b>5.2.1 Sezonske spremembe kompleksacije kovin in polkovin.....</b>	84
<b>5.2.2 Kompleksacija kovin in polkovin na izlivu reke Soče in v reki Soči.....</b>	87
<b>6 SKLEPI .....</b>	89
<b>7 POVZETEK (SUMMARY) .....</b>	92
<b>7.1 POVZETEK .....</b>	92
<b>7.2 SUMMARY.....</b>	94
<b>8 VIRI .....</b>	96
<b>ZAHVALA .....</b>	104

## KAZALO PREGLEDNIC

str.

Pregl. 1: Izkoristek analize kovin in polkovin v referenčnem materialu TORT-2 (National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, Kanada). Rezultati so podani kot povprečne vrednosti šestih meritev referenčnega materiala s standardno deviacijo.....	33
Pregl. 2: Porazdelitev glavnih skupin integriranih protonskih resonanc v spektru $^1\text{H}$ NMR, ki predstavljajo štiri glavne biokemijske skupine spojin v morski koloidni organski snovi (lipidi, proteini, polisaharidi in huminske kisline) .....	46
Pregl. 3: Zbrane vsebnosti organskega ogljika ( $\text{C}_{\text{org.}}$ ), totalnega dušika ( $\text{N}_{\text{tot.}}$ ) in molskega razmerja C/N (samo v reki Soči) v posamezni frakciji filtracije (0,2 $\mu\text{m}$ filtrat, 5 kDa retentat in permeat) vzorcev iz reke Soče in iz izliva reke Soče pri različnih slanostih (16, 26 in 33 psu). Poleg tega sta podana še delež koloidnega organskega ogljika (% COC) in koncentracijski faktor ultrafiltracije (KF).....	52
Pregl. 4: Porazdelitev glavnih skupin integriranih protonskih resonanc v $^1\text{H}$ NMR spektrih vzorcev iz Soče in iz izliva Soče, ki predstavljajo štiri glavne biokemijske skupine spojin v koloidni organski snovi (lipidi, proteini, polisaharidi in huminske kisline).....	55
Pregl. 5: Vsebnosti organskega ogljika ( $\text{C}_{\text{org.}}$ ) v posamezni frakciji filtracije (0,2 $\mu\text{m}$ filtrat, 5 kDa retentat in 5 kDa permeat ultrafiltracije), delež koloidnega organskega ogljika % COC in koncentracijski faktor ultrafiltracije (KF) .....	58
Pregl. 6: Porazdelitev glavnih skupin integriranih protonskih resonanc v spektrih $^1\text{H}$ NMR retentatov in permeatov izločene EPS iz treh različnih kultur fitoplanktona, ki predstavljajo štiri glavne biokemijske skupine spojin v koloidni organski snovi (lipidi, proteini, polisaharidi in huminske kisline).....	59
Pregl. 7: Vsebnosti kovin in polkovin v GF/F filtratu in koloidni frakciji raztopljeni organske snovi (5 kDaR) .....	64
Pregl. 8: Sezonske spremembe molskih razmerij $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}} \times 10^{-5}$ v koloidni frakciji DOM (>5 kDaR) .....	66
Pregl. 9: Primerjava vsebnosti kovin in polkovin ( $\text{nmol L}^{-1}$ ) v slanostnem gradientu: reka Soča – izliv reke Soče. Navedene so tudi korelacije med vsebnostjo kovin/polkovin in slanostjo (pozitivna korelacija (+), negativna korelacija (-)) .....	67
Pregl. 10: Primerjava vsebnosti kovin in polkovin v raztopljeni in koloidni frakciji s preteklo raziskavo v Tržaškem zalivu (Koron in sod., 2013). Za primerjavo so za to študijo	

podane povprečne vsebnosti kovin in polkovin v letu 2012. Podana so tudi povprečja deležev koloidno vezanih kovin in polkovin v letu 2012 .....	85
Pregl. 11: Primerjava afinitete kovin in polkovin do COM ( $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}} \times 10^{-5}$ ; molsko razmerje) z raziskavami v Tržaškem in Mehniškem zalivu ter na srednjoeatlantskem območju. Za primerjavo so za to študijo podane povprečne vrednosti razmerja $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}}$ v letu 2012 .....	87

## KAZALO SLIK

str.

Sl. 1: Prikaz globalnega kroženja ogljika. Shranjevanje ogljika v posameznih rezervoarjih je v enotah GtC, pretoki pa v GtC/leto (povzeto po NASA).....	5
Sl. 2: Velikostni razredi organske snovi v oceanu (povzeto po Azam in Malfatti, 2007 in Verdugo in sod., 2004).....	8
Sl. 3: Ponazoritev del procesov, ki vključujejo nastanek in razgradnjo DOM (povzeto po ilustraciji: Glynn Gorick, Justin Seymour and Roman Stocker; naslovница revije Science 5. 2. 2010).....	11
Sl. 4: Shematični prikaz delovanja mikrobne črpalke ogljika (povzeto po Jiao in sod., 2010).....	14
Sl. 5: Samozdruževanje polimerov DOM v mikrogele (povzeto po Verdugo in Santschi, 2010).....	15
Sl. 6: Tržaški zaliv z vzorčevalnimi postajami: oceanografska boja Vida (modra), izliv reke Soče (zelena) in reka Soča (rumena) .....	24
Sl. 7: Shema postopka izolacije in karakterizacije koloidne organske snovi .....	26
Sl. 8: Rastne krivulje fitoplanktonskih kultur: <i>Tetraselmis marina</i> , <i>Chaetoceros socialis</i> in <i>Prorocentrum minimum</i> .....	28
Sl. 9: Sezonska variacija $\text{C}_{\text{org.}}$ (kvadrat) in $\text{N}_{\text{tot.}}$ (trikotnik) koncentracije v koloidni organski snovi ( $> 5\text{kDa}$ ) od decembra 2011 do oktobra 2012 (povzeto po Klun in sod., 2015) .....	35
Sl. 10: Variacije $\text{C}_{\text{org.}}/\text{N}_{\text{tot.}}$ v nedializirani (kvadrat) in dializirani (krogci) COM od decembra 2011 do oktobra 2012 (povzeto po Klun in sod., 2015).....	36
Sl. 11: Sezonska variacija koncentracije DOC in deleža COC v celokupnem DOC (%) COC) v obdobju od decembra 2011 do oktobra 2012 (povzeto po Klun in sod., 2015).....	37

Sl. 12: Vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$ nedializirane COM v obdobju od decembra 2011 do oktobra 2012 (povzeto po Klun in sod., 2015) .....	38
Sl. 13: Primerjava FT-IR spektrov dializirane (D-COM, črtkano) in nedializirane (COM, polna črta) koloidne organske snovi iz junija meseca ter matriksa makroagregatov iz leta 2004 (pike) (Faganeli in sod. 2010).....	39
Sl. 14: Prikaz integriranih območij protonskih resonanc, ki pripadajo glavnim biokemijskim komponentam morske koloidne organske snovi .....	41
Sl. 15: $^1\text{H}$ NMR spektri dializiranih vzorcev izolirane COM iz meseca aprila 2012 (1) in julija 2012 (2) .....	42
Sl. 16: $^1\text{H}$ NMR spektri standardov pululana (1) in kazeina (2) .....	43
Sl. 17: Sezonske spremembe treh večjih komponent COM (lipidi, proteini in polisaharidi) izražene z integrali protonске resonance $^1\text{H}$ NMR spektrov v % .....	45
Sl. 18: Sezonska dinamika komponent COM normaliziranih na vrednosti DOC in izraženih v $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	47
Sl. 19: $^1\text{H}$ NMR spekter morske COM posnet v devteriranem kloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ).....	48
Sl. 20: Kromatogram dializirane COM iz decembra 2011 (D-COM Dec'11) in julija 2012 (D-COM Jul'12).....	49
Sl. 21: Prikaz deležev dveh velikostnih frakcij COM ločenih s pomočjo HP-SEC: molekule z visoko (200–4000 kDa) in nižjo molsko maso (5–50 kDa).....	50
Sl. 22: Sezonske spremembe molskih mas visokomolekularne COM .....	51
Sl. 23: Spektra $^1\text{H}$ NMR izolirane COM iz reke Soče (1) in izliva reke Soče pri slanosti 26 psu (2).....	54
Sl. 24: Ponazoritev štirih območij v spektru EEM, ki pripadajo štirim različnim fluorescenčnim skupinam spojin, določenih s pomočjo modela PARAFAC (C1, C2a, C2b in C3) .....	56
Sl. 25: Spektra EEM: COM izliva reke Soče pri slanosti 16 psu (levo) in 33 psu (desno) .	57
Sl. 26: Prikaz deležev integralov v spektrih $^1\text{H}$ NMR retentatov in permeatov izločene EPS iz treh kultur fitoplanktona .....	60
Sl. 27: Spektra $^1\text{H}$ NMR retentata (1) in permeata (2) EPS, ki jo je izločil nanoflagelat <i>Tetraselmis marina</i> .....	61
Sl. 28: Sezonske spremembe vsebnosti nekaterih kovin (levo zgoraj: Cr, Co, Ni; desno zgoraj: Mn, Cu, Zn) v koloidni frakciji. Levo spodaj so prikazane sezonske spremembe	

vsebnosti Hg v raztopljeni (GF/F filtrat) in koloidni (5 kDaR) frakciji. Desno spodaj pa vsebnosti raztopljenega in koloidnega Se.....	63
Sl. 29: Spektri $^1\text{H}$ NMR makroagregatov iz Tržaškega zaliva, vzorčenih leta 1997 in 2000 (povzeto po Kovač in sod., 2002).....	73
Sl. 30: Primerjava spektrov $^1\text{H}$ NMR rečne COM (1) in morske COM (2) .....	77
Sl. 31: Filtrirana voda iz reke Soče.....	79
Sl. 32: Primerjava spektrov $^1\text{H}$ NMR morske COM, izolirane aprila 2012 (1) in COM, izolirane iz nanoflagelata <i>Tetraselmis marina</i> (2) .....	81
Sl. 33: Primerjava spektrov $^1\text{H}$ NMR COM, izolirane iz diatomeje <i>Chaetoceros socialis</i> (1) in morske COM, izolirane julija 2012 (2) .....	83

## KAZALO PRILOG

Priloga A1:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz januarja 2012

Priloga A2:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz aprila 2012

Priloga A3:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz maja 2012

Priloga A4:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz junija 2012

Priloga A5:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz julija 2012

Priloga A6:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz avgusta 2012

Priloga A7:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz septembra 2012

Priloga A8:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz oktobra 2012

Priloga A9:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz novembra 2012

Priloga A10:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz decembra 2012

Priloga A11:  $^1\text{H}$  NMR spekter COM izliva reke Soče pri slanosti 16 psu

Priloga A12:  $^1\text{H}$  NMR spekter COM izliva reke Soče pri slanosti 26 psu

Priloga A13:  $^1\text{H}$  NMR spekter COM izliva reke Soče pri slanosti 33 psu

Priloga A14:  $^1\text{H}$  NMR spekter rečne COM reke Soče

Priloga A15:  $^1\text{H}$  NMR spekter retentata EPS (5 kDaR), ki ga je izločil nanoflagelat *Tetraselmis marina*

Priloga A16:  $^1\text{H}$  NMR spekter permeata EPS (5 kDaF), ki ga je izločil nanoflagelat *Tetraselmis marina*

Priloga A17:  $^1\text{H}$  NMR spekter retentata EPS (5 kDaR), ki ga je izločila diatomeja  
*Chaetoceros socialis*

Priloga A18:  $^1\text{H}$  NMR spekter permeata EPS (5 kDaF), ki ga je izločila diatomeja  
*Chaetoceros socialis*

Priloga A19:  $^1\text{H}$  NMR spekter retentata EPS (5 kDaR), ki ga je izločil dinoflagelat  
*Prorocentrum minimum*

Priloga A20:  $^1\text{H}$  NMR spekter permeata EPS (5 kDaF), ki ga je izločil dinoflagelat  
*Prorocentrum minimum*

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$C_{\text{org.}}/N_{\text{tot.}}$	molsko razmerje med organskim ogljikom in dušikom
$C_{\text{org.}}$	organski ogljik
$N_{\text{tot.}}$	totalni dušik
DOC	dissolved organic carbon – raztopljen organski ogljik
GF/F	stekleni filter z velikostjo por 0,7 $\mu\text{m}$ (Whatman)
MWCO	molecular weight cut off – izločitev glede na molsko maso
DOM	dissolved organic matter – raztopljena organska snov
COM	colloidal organic matter – koloidna organska snov
EEM	excitation–emission matrix – vzbujevalno emisijska matrica
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry – induktivno sklopljena plazemska masna spektrometrija
PARAFAC	parallel factor analysis – paralelna faktorska analiza
NM COM	nižjemolekularna koloidna organska snov
VM COM	visokomolekularna koloidna organska snov
HPSEC	high pressure/high performance size exclusion chromatography – visoko tlacna/visoko zmogljiva izključitvena kromatografija
CVAAS	cold vapour atomic absorbance spectrometry – atomski absorpcijski spektrometer hladnih par
$^1\text{H NMR}$	proton nuclear magnetic resonance – protonska jedrska magnetna resonanca
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy – infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
$\text{Me}/C_{\text{org.}}$	molsko razmerje med kovino ali polkovino in organskim ogljikom

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Pojav sluzastih makroagregatov v severnem Jadranu je sprožil vrsto študij na področju morske ekologije in biogeokemije. Tako imenovano sluzenje Jadranskega morja, ki občasno (epizodno) nastopi konec pomladi in v poletnem obdobju, nazadnje se je v večji razsežnosti zgodilo poleti leta 2004, je dokumentirano več kot 275 let, a podrobnejše študije so se pričele šele v osemdesetih letih preteklega stoletja (Fonda Umani in sod., 1989; Giani in sod., 2005). Do nastanka sluzastih makroagregatov prihaja zaradi povezav makromolekul preko navzkrižnih reakcij oz. aglomeracije, pri čemer raztopljeni makromolekularni (koloidna) organska snov preide v suspendirano obliko preko vmesnega nastanka mikrogelov in makrogelov (Chin in sod., 1998; Verdugo in sod., 2004). Tako morska koloidna organska snov (*angl. Colloidal organic matter – COM*) predstavlja prekursor za nastanek agregatov in makroagregatov, ki so odporni na mikrobnou razgradnjo (Faganeli in sod., 2010). Zaradi opisanih pojavov sluzastih makroagregatov smo se v sklopu doktorskega dela posvetili sezonskim spremembam velikosti, sestave, strukture in izvora koloidne organske snovi v morski vodi. Koloidna organska snov je sestavni del raztopljeni organske snovi (*angl. Dissolved organic matter – DOM*) in prestavlja približno  $\frac{1}{4}$  celotne DOM (Mopper in sod., 2007). Na molekularnem nivoju je večji del obeh danes še nekarakterizirane. Zato smo mesečno spremljali časovno porazdelitev koloidne organske snovi, njeno aglomeracijo in razgradnjo. Pestrost sestave COM, in s tem težavnost v določanju njene sestave in strukture, se od okolja do okolja spreminja, v obalnem morju tudi zaradi vnosov rečne (alohtone) organske snovi ki je po sestavi in strukturi različna glede na morsko. V Tržaškem zalivu takšne vnoise predstavljajo predvsem Soča in v manjši meri Timav, Osp, Glinščica, Rižana, Dragonja ....

Pri strukturi in sestavi COM je pomembna tudi njena kompleksacija s kovinami (Pb, Zn, Fe, Cd, Cu, Cr, V ...). Zaradi znanega vnosa Hg z reko Sočo nas je zanimala predvsem porazdelitev in vsebnost Hg. Čeprav je bilo leta 1995 prekinjeno petstoletno rudarjenje v Idriji, predstavlja vnos Hg z reko Sočo glavni izvor onesnaženja Tržaškega zaliva (Covelli in sod., 2001; Faganeli in sod., 2003). Koordinacijsko vezano Hg na COM, ki ima vlogo

močnega liganda, ima po vsej verjetnosti ključni pomen v porazdelitvi in reaktivnosti raztopljenega Hg v obalnem morju Tržaškega zaliva (Koron in sod., 2011).

## 1.2 CILJI IN HIPOTEZE

**Hipoteza 1:** V Tržaškem zalivu so makroagregati pretežno fitoplanktonskega izvora in so sestavljeni predvsem iz polisaharidov (Turk in sod., 2010). Po teoriji polimernih gelov nastanejo iz makromolekularne (koloidne) organske snov (COM) (Verdugo in Santschi, 2010), ko ta aglomerira preko samozdrževanja, do nastanka nano- in mikrogelov. To se dogaja predvsem pozno splomladi oziroma zgodaj poleti v času koncentriranja COM. Raziskovanje časovnega razvoja sestave in strukture teh organskih koloidov bo pomemben prispevek k razumevanju reaktivnosti celotne raztopljeni organske snovi (DOM).

**Hipoteza 2:** COM je kot pretežno polisaharidni makromolekularni ligand sposoben koordinacijsko vezati vrsto kovin, med drugimi tudi okoljsko problematično Hg. Predvsem naj bi COM preprečevala obarjanje in povečala razapljanje HgS. Ker je Hg mehka kovina (lahko polarizabilna zunanja lupina elektronov), se z visokimi konstantami stabilnosti veže predvsem na tiolne funkcionalne skupine, ki sodi med mehke ligande (teorija HSAB, *angl. Hard and soft (Lewis) acids and bases*). Če so tiolne skupine vpletene v mikrobne procese, so na voljo za vezavo ostali heteroatomi (O in N), vendar z manjšimi konstantami stabilnosti. Posledično se bo Hg najprej vezal na žveplo, tudi če vsebuje COM veliko število karboksilnih skupin v primerjavi s tiolnimi (Ravichandran, 2004). Tako makromolekularna oz. koloidna organska snov (COM) imobilizira Hg in s tem lahko zavira metilacijo Hg in nastanek MeHg, ki nato vstopa v prehranjevalno verigo. Predpostavljamo lahko, da je kompleksacija Hg s COM tisti dejavnik, ki omejuje obseg metilacije Hg v vodnem stolpu v obalnem morju Tržaškega zaliva.

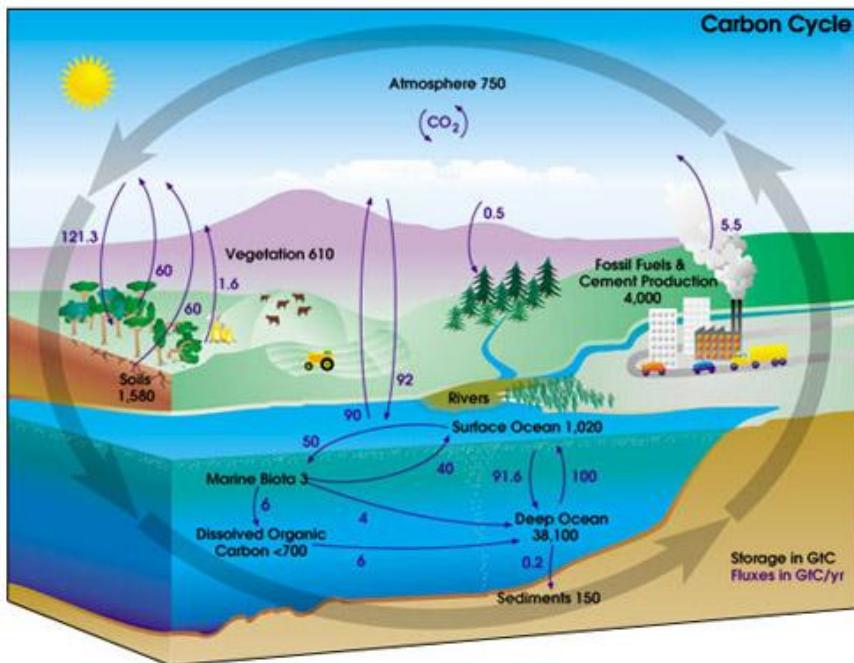
**Cilj** je čim bolj natančno določanje sestave in strukture koloidne organske snovi v vodnem stolpu v obalnem morju, na primeru Tržaškega zaliva, ki je v splošnem danes slabo (pomanjkljivo) karakterizirana (Mopper in sod., 2007). Pomembno je razvozlati kompleksnost sestave COM za boljše razumevanje procesov nastanka, agregacije in razgradnje raztopljeni organske snovi v morskem okolju. V časovno kontinuirani študiji je

bilo moč opazovati aglomeracijo in razgradnjo COM v obalnem morju na molekularnem nivoju. Poznavanje sestave in strukture COM je pomembno za študijo koordinacijske vezave (kompleksacije) Hg in ostalih kovin (Fitzgerald in sod., 2007) na COM, ker le-ta predstavlja skupek ligandov z velikim številom vezavnih mest (S, O, N in Se).

## 2 PREGLED OBJAV/DOSEDANJA RAZISKOVANJA

### 2.1 KROŽENJE OGLJIKA V MORJU

Kroženje ogljika med oceanom, atmosfero in zemljo je ena izmed temeljnih komponent iz kemijske perspektive oceanografije, saj je zaradi parcialnega tlaka ( $p_{CO_2}$ ) oz. fugativnosti ( $f_{CO_2}$ ) ogljikov dioksid eden izmed najbolj pomembnih toplogrednih plinov v atmosferi (Emerson in Hedges, 2008). Glede na to, da morje vsebuje 50-krat več anorganskega ogljika v primerjavi z vsebnostjo  $CO_2$  v atmosferi, morski karbonatni sistem močno vpliva na fugativnost  $CO_2$  v atmosferi. Trenutno so oceani podvrženi titraciji s  $CO_2$ , kajti antropogeni vnos  $CO_2$  narašča s tako hitrostjo, da se je  $f_{CO_2}$  v atmosferi od pred-industrijske dobe povečal za 30 %, od tega je le 40 %  $CO_2$  ostalo v atmosferi. Ostali del se je shranil v morski in zemeljski karbonatni sistem. Najbolj pomembne kemijske reakcije na globalni ravni so nastanek in razpad organske snovi in kalcijevega karbonata preko fotosinteze/respiracije in precipitacije/raztopljanja. Izmenjava med oceani, atmosfero in zemljo poteka primarno preko izmenjave  $CO_2$ , pretoka raztopljenega anorganskega ogljika (DIC;  $DIC = HCO_3^- + CO_3^{2-} + CO_2$ ) v rekah in odstranitve kalcijevega karbonata s precipitacijo. Slika 1 prikazuje količino ogljika v posameznih rezervoarjih (oceani, atmosfera in zemlja) ter izmenjevalne fluks. Tako dobimo kvantitativno oceno o odvisnosti med dvema rezervoarjem. Raztopljen anorganski ogljik v oceanu vsebuje največ ogljika (38 000 Pg), sledijo mu kopenske rastline in tla s približno 2000 Pg, najmanj ogljika pa vsebuje atmosfera (750 Pg). Izmenjavi med atmosfero in oceanom in atmosfero in zemljo sta približno enaki (približno 100 Pg), kar pomeni, da je pritisk  $CO_2$  v atmosferi pod velikimi pritiski procesov, ki se dogajajo v oceanu in v zemlji. Tako na pritisk  $CO_2$  vplivajo hitri fluksi (photosinteza in respiracija) in počasni tokovi (preperevanje) v različnih časovnih okvirih (Emerson in Hedges, 2008).



Slika 1: Prikaz globalnega kroženja ogljika. Shranjevanje ogljika v posameznih rezervoarjih je v enotah GtC, pretoki pa v GtC/leto (povzeto po NASA)

Figure 1: Scheme of the global carbon cycle. Carbon storage in each reservoir is in GtC unit and fluxes in GTc/year unit (from NASA)

V oceanih obstajajo širje procesi, ki kontrolirajo izmenjavo DIC med oceanom na površini in v notranjosti, tako kot tudi na vsebnost DIC oziroma njenih posameznih kemijskih zvrsti DIC na površini (Ridgwell in Arndt, 2015):

- **Črpalka raztpljanja,**
- **Črpalka organske snovi,**
- **Karbonatna črpalka,**
- **Črpalka mikrobnega ogljika.**

Koncept **črpalke raztpljanja** predstavlja boljše raztpljanje CO<sub>2</sub> v hladnejših morjih v primerjavi s toplješimi. Tako je raztpljanje CO<sub>2</sub> pospešeno v površinskih vodah v visokih geografskih širinah, kjer nastajajo globoke vodne mase. Površinska gosta voda, bogata z DIC, hitro tone, kar se kaže v učinkovitosti črpanja ogljika iz atmosfere v globoke oceane. Poleg temperature ima tudi slanost pomembno vlogo (v manjši meri) pri raztpljanju CO<sub>2</sub>. Tudi **črpalka organske snovi** povroči vertikalni gradient DIC. Primarni producenti preko

fotosinteze privzamejo DIC in ga pretvorijo v suspendirani organski ogljik (*angl. Particulate organic carbon – POC*) in raztopljeni organski ogljik (*angl. Dissolved organic carbon – DOC*). Del POC, ki ni vključen v recikliranje na površini, vertikalno tone proti globini, kjer je podvržen učinkoviti heterotrofni razgradnji, in s tem remineralizaciji v DIC. Proces ima velik vpliv na kroženje hranil v oceanih, saj se preko vertikalne heterotrofne ragradnje POC remineralizira in poleg DIC sprosti tudi druga anorganska hranila (amonijak, nitrat, fosfat ...). Formacije globokih vodnih mas, ki so bogate s hranili, preko procesa, ki hladne vode iz globine dvigne na površino (»*upwelling*« proces),) vpliva na prostorsko porazdelitev primarne produkcije v oceanih. Tretji proces, **karbonatna črpalka**, vključuje biološko obarjanje kalcija v obliki karbonata v površinskih vodah. Približno 50 % raztopljenega karbonata precipitira in potone, od tega 20 % ni podvrženega nadaljnemu razapljanju. Zadnji proces, ki vpliva na koroženje ogljika v oceanih, je bil nedavno odkrit in se imenuje **črpalka mikrobnega ogljika** (Jiao in sod., 2010). Proses opisuje, kako se DOM, ki se ne remineralizira v CO<sub>2</sub>, pretvori preko mikrobne zanke v refraktorno oz. rekalcitrantno raztopljeno organsko snov. Podrobnejši opis tega mehanizma bom opisala v poglavju 2.1.2.

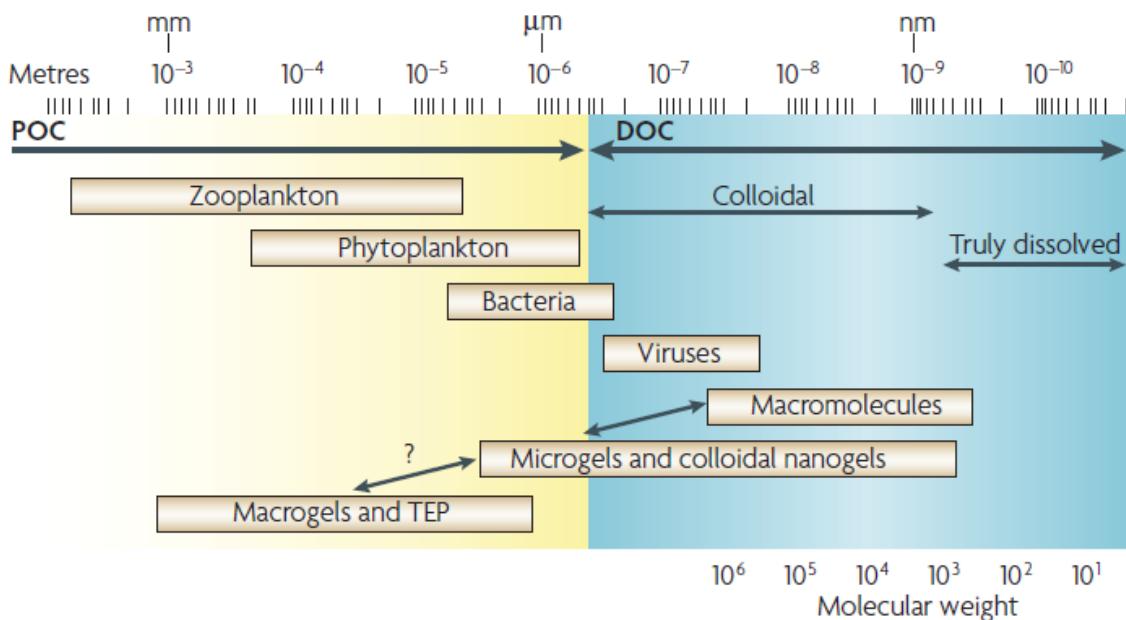
### 2.1.1 Raztopljena organska snov (DOM) in njen koloidni del (COM)

**Raztopljena organska snov** (DOM) v oceanih predstavlja enega večjih rezervoarjev organske snovi na Zemlji. Oceani vsebujejo 662 Pg ogljika v obliki DOM, kar je več kot 200-krat več v primerjavi z vsebnostjo ogljika v organski suspendirani snovi. Tako DOM predstavlja enega največjih bazenov bioaktivnega ogljika v oceanih. Količina DOM je primerljiva z vsebnostjo anorganskega C v atmosferi (750 Pg) in glede na tokove med oceani in atmosfero (Carlson in Hansell, 2015). Že manjše spremembe v procesih produkcije in odstranjevanja DOM imajo lahko velik vpliv na globalno kroženje ogljika.

Raztopljeno organsko snov delimo na koloidni del, kamor spadajo bakterije, virusi, mikrogeli, koloidni nanogeli, makromolekule in na popolnoma raztopljeno organsko snov (*angl. Truly dissolved organic matter*) (Slika 2) (Azam in Malfatti, 2007), ki jo sestavljajo heteropolisaharidi, proteini, lipidi, huminske in fulvinske kisline (Filella, 2007). Glede na potrebe pri eksperimentalnem delu je po dogovoru definirana kot frakcija, ki preide skozi

filtre velikosti por 0,7 µm, ne obstaja pa univerzalni filter, ki bi ločil DOM od suspendirane organske snovi (*angl. Particulate organic matter – POM*). POM sestavljajo bakterije, fitoplankton, zooplankton in makrogeli ter prozorni eksopolimerni delci (TEP) (Slika 2). Visokomolekularna ali koloidna organska snov (COM) je definirana v območju 5 (1) kDa–0,22 (0,45) µm in predstavlja približno 25 % DOM. Za nadaljnjo izolacijo DOM tako uporabljamo tri možne metode: ekstrakcijo na trdni fazi (*angl. Solid-phase extraction – SPE*), ultrafiltracijo ali reverzno osmozo/električno podprtou dializo (*angl. Reverse osmosis/electrically assisted dialysis – RO/ED*). Z vsako metodo se izolira drugo frakcijo DOM.

Z metoda SPE izoliramo **hidrofobni DOM**, ki ni reprezentativen za celokupni DOM. V SPE se ujame kromoformni DOM (CDOM, *angl. Chromophoric* ), ki naj bi bila reprezentativna predvsem za refraktorno raztopljeni organski snovi (RDOM). Z ultrafiltracijo izoliramo visokomolekularni DOM (HMWDOM, *angl. High molecular weight DOM*), ki ima hidrofilne lastnosti (Repeta, 2015). Imenujemo jo tudi koloidna raztopljeni organski snovi (COM). Takšni koncentrirani frakciji HMWDOM oziroma COM, ki ne gre skozi pore ultrafiltracijske membrane, pravimo tudi retentat ali ultrafiltrat. Frakciji, ki gre skozi pore, pa pravimo permeat. Da je ultrafiltracija učinkovita, mora koncentracijski faktor znašati ( $KF = V_{začetni}/V_{retentat}$ ) vsaj 10, kajti z nižjimi faktorji izoliramo tudi nizkomolekularni DOM (LMWDOM, *angl. Low molecular weight DOM*) (Guo in Santschi, 2007). Z višanjem KF je izolacija COM bolj učinkovita, kar so pokazali s permeacijskim modelom, ki je koncentriral DOM 1000-krat, pri čemer se je COM obnašal idealno (Walker in sod., 2011). V povprečju predstavlja delež izoliranega COM z ultrafiltracijo 30 % celokupnega DOM. Najnovejša metoda za izolacijo DOM je RO/ED, ki v povprečju izolira 75 % DOM in ima tako hidrofobne kot hidrofilne lastnosti (Repeta, 2015).



Slika 2: Velikostni razredi organske snovi v oceanu (povzeto po Azam in Malfatti, 2007 in Verdugo in sod., 2004)

Figure 2: Size range of organic matter in the ocean (from Azam and Malfatti, 2007 and Verdugo et al., 2004)

Raztopljena organska snov vsebuje vrsto molekul (glej zgoraj) različnih reaktivnosti, od najbolj biološko razpoložljivih v površinskem sloju do dolgo obstoječih molekul, ki cirkulirajo globoko v oceanu. Glede na življensko dobo se lahko loči pet vrst raztopljenega organskega ogljika (DOC):

- labilni (LDOC), ki se ne akumulira in ima življensko dobo od nekaj ur do nekaj dni, ker hrani mikrobeno zakno v evfotski coni;
- semi-labilni (SLDOC), ki predstavlja 6 Pg ogljika, obstoji v evfotski coni več mesecev, kar je odvisno od sestave SLDOM, razpoložljivosti hranil in strukture mikrobenne združbe;
- semi-refraktorni (SRDOC), ki ima življensko dobo približno 20 let, akumulira se ob prisotnosti konstantne piknokline, s tem, da procesi produkcije in odstranitve SRDOC še niso dobro znani;
- refraktorni (RDOC), ki obstoji približno 16.000 let v globinah pod 1000 m pri koncentracijah pod  $42 \mu\text{mol L}^{-1}$  in na globalni ravni predstavlja kar 630 Pg ogljika ter velja za del DOM, ki naj bi bila odporna na mikrobeno razgradnjo (Hansell, 2013), česar pa zadnje raziskave ne potrjujejo (Arrieta in sod., 2015);

- in ultra-refraktorni URDOC, ki je najmanj poznan in obstoji približno 40 000 let, primarno pa naj bi bil termogenega izvora.

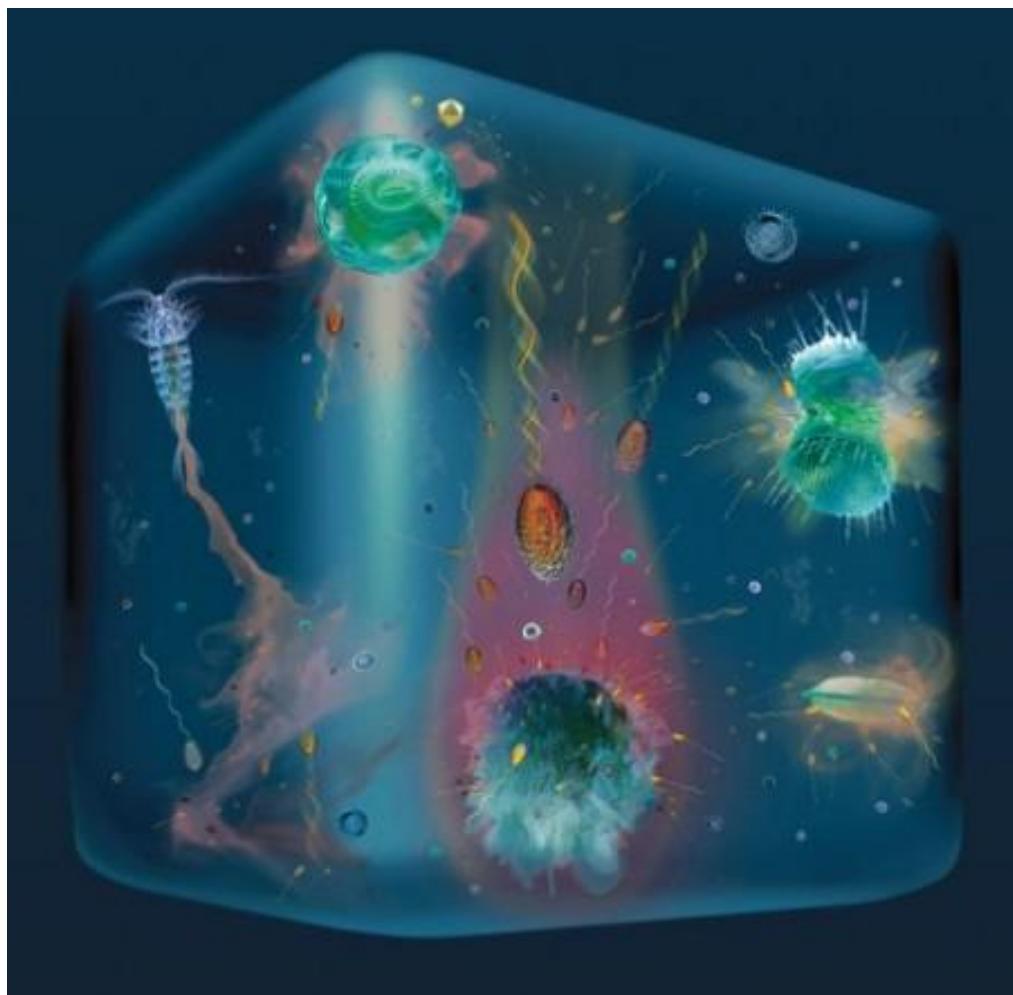
Pri identifikaciji posameznih molekul so najbolj zanimivi hetopolisaharidi, pa tudi lipidi in proteini. **Polisaharide** lahko razdelimo na vsaj dve frakciji, in sicer na acilirane polisaharide (APS) in heteropolisaharide (HPS), ki vsebujeta anomerni, *O*-alkilni, amidni in metilni ogljik ter alifatsko snov bogato s karboksilnimi skupinami (*angl. – carboxyl rich aliphatic matter – CRAM*). S kislinsko hidrolizo je možno podrobnejše analizirati sestavo enostavnih sladkorjev, ki sestavljajo polisaharide. S to metodo so določili sedem nevtralnih (arabinoza, ksiloza, glukoza, galaktoza, manoza, fukoza in ramnoza) in dva amino sladkorja (glukozamin in galaktozamin), vsi skupaj pa predstavljajo le 20 % celokupnih sladkorjev v verigi polisaharidov. S kislinsko hidrolizo lahko določimo aminokislinsko sestavo **proteinov**. Takim aminokislinskim pravimo »celokupne hidrolizabilne« aminokisline (*angl. – »Total hydrolysable« amino acids – THAA*), katere večinoma (> 90 %) sestavljajo glicin, alanin, glutaminska kislina, serin, asparaginska kislina, arginin in treonin. Za **lipidno** frakcijo DOM se uporablja tudi druga terminologija, in sicer CRAM (alifatska snov bogata s karboksilnimi skupinami) ali tudi morske huminske snovi. V primerjavi s kopensko huminsko snovjo ima morska nižjo vsebnost aromatskih in olefinskih delov, nižje molsko razmerje C/N in nižje razmerje stabilnih izotopov ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (Repeta, 2015).

V zadnjih letih so se močno izboljšale kemijske analizne tehnike s katerimi lahko bolj uspešno karakteriziramo kompleksen in heterogen DOM in spremljamo njegovo biogeokemisjko kroženje. Med moderne analizne metode sodi masna spektrometrija visoke resolucije in spektroskopija NMR visokih magnetnih polj. Na področju masne spektrometrije je trenutno najbolj uporabljena FTICR (*angl. Fourier transform ion cyclotron resonance – ionska ciklotronska resonanca s Fourierjevo transformacijo*) sklopljena z ESI (*angl. Electrospray ionization – elektrosprej ionizacija*), ki lahko loči na tisoče ionov različnih mas (200 – 2000 Da) znotraj DOM (Repeta, 2015). Spektroskopija NMR velja za najbolj uporabno in vsestransko analizno metodo, ki omogoča določanje sestave kompleksnih kemijskih vzorcev in interakcij. Z 1D NMR dobimo informacije o vrsti in količini jedra ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ , ...), med tem ko pri 2D in multidimenzionalnih

NMR spektrih dobimo informacije o povezavi med dvema jedroma (Simpson in sod., 2012).

### **2.1.2 Izvor in ponor raztopljeni organski snovi (DOM)**

Več raziskovalnih skupin skuša razumeti mehanizme produkcije, odstranjevanja in akumulacije DOM. Sliko 3 so ponazorili v skupini prof. R. Stockerja (naslovna revije Science 5. 2. 2010) in prikazuje del procesov, ki vključujejo transformacije DOM. Obarvane zasenčene poti na sliki predstavljajo DOM, medtem ko je v zgornjem levem kotu prikazan zooplankton, ki izloča DOM. V srednjem zgornjem kotu in desnem spodnjem kotu je prikazano izločanje DOM iz fitoplantkonskih celic, ki ustvarijo mikrookolje, bogato s hrани, kamor se naselijo bakterije. V zgornjem desnem kotu pa je prikazana celična liza (možno tudi zaradi virusne okužbe). Vertikalno po sredini pa je prikazan DOM, ki se sprošča iz delca morskega snega, ki tone, za njim pa plavajo bakterije s pomočjo spiralnih mitigalk.



Slika 3: Ponazoritev del procesov, ki vključujejo nastanek in razgradnjo DOM (povzeto po ilustraciji: Glynn Gorick, Justin Seymour and Roman Stocker; naslovnica revije Science 5. 2. 2010)

Figure 3: Demonstration of a part of processes involved in production and degradation of DOM (from illustration: Glynn Gorick, Justin Seymour and Roman Stocker; cover of Science journal on 5th February 2010)

V vodnem stolpcu obstaja pet načinov produkcije oz. nastanka raztopljenih organskih snovi:

- ekstracelularna produkcija fitoplantkona (fotoavtotrof),
- produkcija DOM, ki jo povzročijo organizmi na paši (npr. zooplankton),
- produkcija DOM preko celične lize mikroorganizmov,
- raztopljanje suspendiranih delcev,
- DOM, ki jo prodirajo prokarionti.

Ekstracelularno produkcijo fotoavtotrofov opisujeta dva modela: pretok (*angl. Overflow*) in model pasivne difuzije (*angl. Passive diffusive mode*). Model pretoka predvideva, da izločanje DOM korelira s stopnjo fotosinteze. Celična rast je odvisna predvsem od razpoložljivosti anorganskih hranil, medtem ko je fotosinteza odvisna od sevanja. Svetloba in razpoložljivost hranil ne sovpadata vedno, kar naj bi privedlo do tega, da spojine, producirane med fotosintezo za celično rast, preidejo v ekstracelularno fazo, če vzporedno zaradi pomankanja hranil ne poteka tudi celična rast. Model pasivne difuzije pa izpodbija model pretoka. Če aktivna produkcija DOM fitoplanktona poveča kompeticijo za hranila s heterotrofnimi bakterijami in s tem povzroči limitacijo hranil, potem mora biti ekstracelularna produkcija pasiven proces. Mehanizmi, ki vplivajo na produkcijo ekstracelularne DOM, še niso povsem jasni. Lahko sta pravilna oba predlagana modela in včasih en prevlada, kar je lahko odvisno od okoljskih pogojev, kot so svetloba in razpoložljivost hranil ter struktura združbe (celična velikost in filogenetska sestava) (Carlson in Hansell, 2015).

Del DOM, ki izvira iz paše zooplanktona, lahko nastaja na štiri načine: direktno sproščanje izločkov, izločanje in raztpljanje neprevzete snovi, površno hranjenje (*angl. »Slippery feeding«*) (razpad večjih plenov med pašo) in izluževanje iz fecesa. Morski virusi veljajo za najbolj številčne predatorje v morskem ekosistemu, ki prizadanejo tako evkariontske kot prokariontske celice. Tako virusi vplivajo na produkcijo in številčnost bakterij ter tudi na cvetenje fitoplankotna. Morski agregati so obogateni z ogljikom in hranili, kar za bakterije predstavlja pomemben vir hrane, zato takim organskim agregatom pravijo »encimski reaktor«. Bakterije, ki so pritrjene na delce, sproščajo ekstracelularne encime, ki s hidrolizo sproščajo nizkomolekularno DOM. Kemoavtotrofi, kot so bakterije in arheje, lahko v globokih oceanih, kjer ni svetlobe, fiksirajo CO<sub>2</sub> in posledično sproščajo DOM (Carlson in Hansell, 2015).

Ponor ali izločanje DOM iz raztopljene faze lahko poteka tako biotsko kot abiotsko. V biotskih procesih sodelujejo predvsem heterotrofni prokarionti bakterije in arheje, ki veljajo za najbolj številčne organizme v vodnem stolpcu (Whitman in sod., 1998). Ti organizmi imajo visoko razmerje površina : volumen, zato imajo večjo afiniteto in so bolj konkurečni za substrate pri nizkih koncentracijah (Carlson in Hansell, 2015). Skozi celično

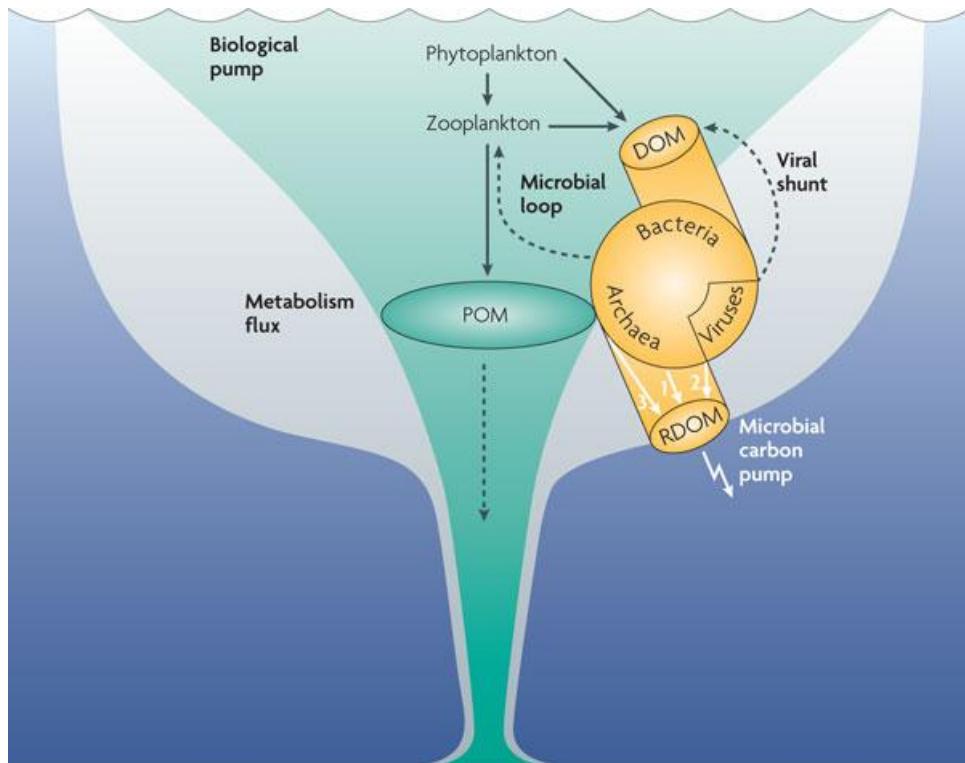
steno bakteriplanktona lahko preidejo molekule velikosti ~600 Da, zato morajo pred privzemom z ekstracelularnimi encimi hidrolizirati visokomolekularno raztopljeno organsko snov (HMW DOM) v nizkomolekularno raztopljeno organsko snov (LMW DOM) (Arnosti, 2011). Med abiotiske procese, ki povzročijo ponor DOM, so fototransformacija, sorpcija na delce, kondenzacija v morske mikrogele in hidrotermalne cirkulacije (Carlson in Hansell, 2015).

Medtem ko velik del DOM porabijo heterotrofne bakterije, se preostanek DOM ne razgradi, ampak se akumulira. Tako DOM, ki ni podvržena hitri mikrobnii razgradnji in se posledično akumulira v morju, imenujemo **rekalcitrantna raztopljena organska snov** (*angl. Recalcitrant dissolved organic matter – RDOM*) (Carlson in Hansell, 2015). RDOM lahko nastane abitosko in biotsko in predstavlja 95 % celokupne raztopljene organske snovi (Jiao in sod., 2010).

Abiotiski procesi lahko nizkomolekularni DOM preko navzkrižnega povezovanja pretvorijo v težje razgradljive makromolekule. Tvorbo makromolekul katalizira svetloba in kompleksacija z molekulami. Poleg tega se lahko DOM pri visokih temperaturah in nižjem pH spontano združi v mikrogele. Poleg nastanka gelov, lahko tudi UV žarki pretvorijo DOM v RDOM ali pa povzročijo poškodbo DNK, kar lahko zavira privzem DOM. Reaktivne kisikove spojine so še en dejavnik, ki lahko oksidira DOM in s tem vpliva na njeno biološko razpoložljivost (Carlson in Hansell, 2015).

Proces produkcije RDOM preko razgradnje heterotrofnih bakterij imenujemo **črpalka mikrobnega ogljika** (*angl. Microbial carbon pump – MCP*). Črpalka mikrobnega ogljika pretvarja DOM v RDOM tako na površini kot v globokih oceanih, kar predstavlja drugačen koncept od biološke črpalke, ki preko vertikalnih tokov shranjuje organsko snov globoko v oceanih (Jiao in sod., 2010). V črpalki mikrobnega ogljika potekajo trije različni procesi nastanka RDOM (Slika 4):

- direktno izločanje iz mikrobnih celic med produkcijo,
- virusna liza celične stene mikrobov in makromolekul na celični površini,
- razgradnja suspendirane organske snovi (POM) v nizkomolekularno refraktorno DOM.



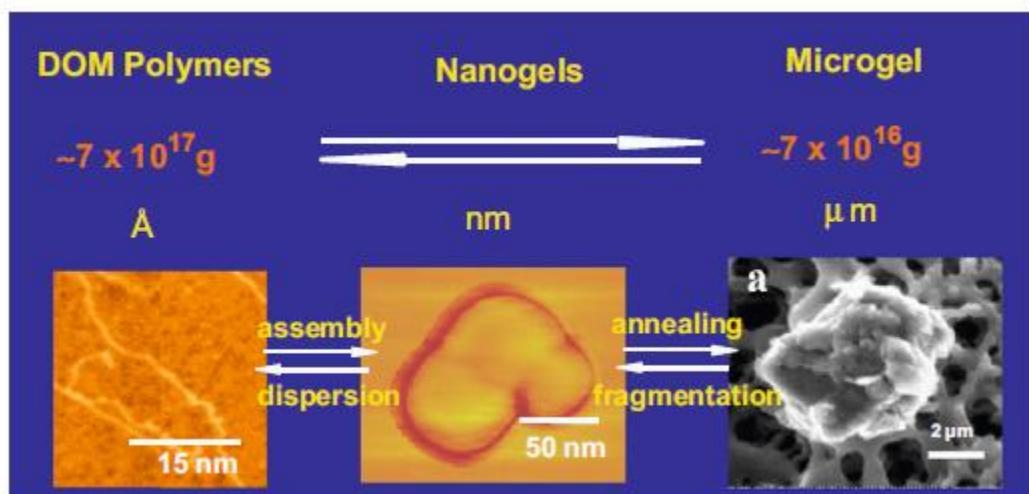
Slika 4: Shematični prikaz delovanja mikrobne črpalke ogljika (povzeto po Jiao in sod., 2010)

Figure 4: Scheme showing functioning of the microbial carbon pump (from Jiao et al., 2010)

### 2.1.3 Mikro- in makrogeli

Morski mikro- in makrogeli so tridimenzionalni polimeri, ki nastajajo iz raztopljene organske snovi (DOM) in igrajo pomembno vlogo v biogeokemijskih procesih v oceanih. Nastajajo s samozdruževanjem preko navzkrižnega povezovanja koloidne organske snovi (COM) (Slika 5). Samozdruževanje je dvostopenjski reverzibilen proces, pri čemer se polimeri DOM (dolžine nekaj nm) združijo v nanogele (premera ~ 50 nm) in posledično tudi v mikrogele (velikosti > 1  $\mu\text{m}$ ) (Slika 5). Ker je to reverzibilen proces, se lahko mikrogeli fragmentirajo do nanogelov, ki se preko disperzije razdružijo v polimere DOM (Chin in sod., 1998; Verdugo in Santschi, 2010). V gelih prevladujejo ionske vezi, Van der Waalsove vezi, hidrofobne interakcije in tudi vodikove vezi. Nastali morski geli ali tudi tako imenovani morski sneg (*angl. marine snow*), ki so prisotni v vodnem stolpcu, tvorijo bogato mikrookolje za mikrobno razgradnjo in remineralizacijo. Na globalni ravni morski

polimerni geli predstavljajo vsaj 70 Pg ogljika, kar pomeni, da je to daleč najbolj obilen vir biološko razgradljivega ogljika, ki je na razpolago črpalki mikrobnega ogljika (Orellana in Leck, 2015).



Slika 5: Samozdruževanje polimerov DOM v mikrogele (povzeto po Verdugo in Santschi, 2010)

Figure 5: Self-assembling DOM polymers into microgels (from Verdugo and Santschi, 2010)

Velikost polimernih gelov je v območju od 1-1000 nm (koloidi) do nekaj mikrometrov, v Jadranskem morju pa celo do nekaj metrov (Verdugo in sod., 2004; Svetličić in sod., 2005). Gele sestavlja polianionski polisaharidi, proteini, nukleinske kisline, ampifilni (npr. fosfolipidi) in hidrofobni skupki. V gelih prevladujejo ionske interakcije, ki preko  $\text{Ca}^{2+}$  ionov navzkrižno povezuje molekule v supramolekularne mreže.  $\text{Ca}^{2+}$  se ionsko veže na različne dele polimerov kot so: karboksilne, hidroksilne, fosfatne, sulfatne, amino in sulfhidrilne skupine. Spontano tvorbo gelskih polimerov so opazili tudi pri pogojih, kjer ni bilo prisotnih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov. V takem primeru gre za povezvanje preko hidrofobnih interakcij ampifilnih spojin, ki ji izločajo tako bakterije kot fitoplankton. Pri hidrofobnih interakcijah imajo pomembno vlogo hidrofobni aminokislinski »rep« polimerov, za katere je značilno nižje molsko razmerje C/N (Orellana in Leck, 2015).

## 2.2 KROŽENJE KOVIN IN POLKOVIN V MORSKEM OKOLJU

Že štirideset let znanstveniki raziskujejo kemijo kovin v sledovih v morju, saj so se šele po letu 1980 razvile čistejše in natančnejše metode in analizne tehnike. Večina kovin je v morju prisotna v raztopljeni obliki v nizkih koncentracijah, kar pa ne velja za železo in aluminij, ki skupaj s kisikom in silicijem tvorita zemeljsko skorjo. Nekatere kovine sodijo med mikrohranila, saj so esencialne za organizme v morju in med drugim vplivajo na sestavo in produkcijo planktona. Večina kovin je del biogeokemijskega kroženja v morju in v sedimentu zaradi bioloških procesov, ki povzročijo redoks reakcije. Tako je moč povezati globalno kroženje ogljika in globalno klimo s celotnim zemeljskim sistemom, ki vključuje skorjo, morje in atmosfero (Libes, 2009).

Številne kovine imajo toksične lastnosti že pri zelo nizkih koncentracijah. Na toksičnost vplivajo njihova kemijska oblika (kemijska zvrst), koncentracija, okoljski pogoji (temperatura, slanost, pH, raztopljen kisik, intenziteta svetlobe...), ki vplivajo na pretvorbe kemijske zvrsti), poleg tega pa tudi v katerem stanju je organizem (starost, velikost, spol, stradanje, aktivnost, stopnja v življenjskem razvoju, dodatna zaščita – lupina, itd.) in prisotnost posameznih ligandov v tkivih. Predvsem poznavanje kemijskih oblik kovin in jihovih pretvorb omogoča poznavanje njihovega biološkega učinka. Tak primer so metilirane oblike nekaterih kovin, ki so lahko biološko zelo aktivne in imajo značilno bioakumulacijo in biomagnifikacijo v prehranjevalni verigi, predvidoma zaradi lipofilnih lastnosti (Libes, 2009), lahko pa tudi zaradi mimikrije.

Na kemijska stanja posameznih kovin, spremembe porazdelitev kovin, koncentracijo prostih ionov, nastanek kompleksov (hidrokso, karbonato), sposobnost absorpcije in stopnjo celičnega prevzema torej vplivajo pH sistema in razpoložljivi ligandi (organski in anorganski). Gostota organizmov lahko vpliva na zmanjšanje koncentracije raztopljenih (spojin) kovin z adsorpcijo na celično površino in koordinacijsko vezavo na ekstracellularne izločke. Razni kovinski oksidi (Fe in Mn) lahko ujamejo kovine, organski koloidni delci pa učinkovito kompleksirajo kovine preko številnih funkcionalnih skupin. Poleg tega lahko na kemijske pretvorbe kovin močno vpliva tudi redoks potencial, ki

vpliva na oksidacijska stanja kovin in na metilacijo, ki po navadi poteče pri nizkih redoks potencialih (Libes, 2009).

Esencialne kovine so biološko pomembne le v določenem, običajno relativno nizkem in ozkem, koncentracijskem območju, v primeru povišanja pa se lahko hitro izrazijo toksični učinki. Neesencialne kovine, kot sta Hg in Pb, že pri relativno nizkih koncentracijah negativno vplivajo na organizme. Za določanje in primerjavo akumulacije kovin v trdih (lupine, kosti) in mehkih predelih (organi) morskih organizmov obstaja t. i. bioakumulacijski faktor, ki kvantitativno opredeli prevzem kovin iz morske vode. Biomagnifikacijski faktor opredeljuje prevzem kovin preko hrane, pri čemer imajo najvišje faktorje organizmi visoko v prehranjevalni verigi (ribe, galebi, morski sesalci – kit in delfini) (Libes, 2009). Z biomagnifikacijo v prehranjevalni verigi se toksične kovine akumulirajo tudi v ljudeh, in imajo lahko prav tako negativne vplive.

Za rast fitoplanktona morajo biti na razpolago poleg makro-hranil (silikat, ogljik, dušik in fosfat) tudi mikrohranila v koncentracijskem območju pod  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ . V raziskavah o funkcijah mikrohranil Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn in Cd v fitoplanktonu so ugotovili, da igrajo pomembno vlogo kot kofaktorji ali del kofaktorja v encimu ter kot strurni elementi v proteinih (Morel in Price, 2003).

Bakterije, ki prav tako potrebujejo mikrohranila, so razvile poseben način vnosa esencialnih kovin v dovolj visokih količinah. Pomagajo si z izločanjem nizkomolekularnih ligandov s številnimi funkcionalnimi skupinami, ki omogočajo vezavo kovin in s tem njihovo koncentriranje. Tako je v primeru pomanjkanja Fe. Ligandi, ki jih bakterije sintetizirajo in izločajo na svojo površino, so znani pod skupnim imenom siderofori. Ti vsebujejo hidroksamate, 1,2-dihidroksibenzen in tudi dolge verige maščobnih kislin (Braun in Hantke, 2007).

### 2.2.1 Kompleksacija kovin s koloidno organsko snovjo

Številne raziskave so se sprožile na področju kompleksacije kovin s COM. COM kvantitativno veže kovine in lahko pomembno vpliva na porazdelitev kovin v vodi. Pomembnost COM pri kompleksaciji je razvidna že iz koncentracije koloidnih delcev, ki je kar  $10^6$ -krat višja od suspendiranih delcev, poleg tega pa ima COM (velikost 0,01  $\mu\text{m}$ ) večjo specifično površino z večjim številom funkcionalnih skupin sposobnih koordinacijsko vezati vrsto kovin v sledovih kot suspendirani delci (velikosti 1  $\mu\text{m}$ ) (Doucet in sod., 2007).

Večina funkcionalnih skupin v COM je zasedenih z glavnimi morskimi kationi Ca, Mg, Na... in ne s kovinami v sledovih. Funkcionalne skupine, aktivne za vezavo, pa so karboksilne, hidroksilne, fosfatne, sulfatne, amino in sulfidrilne skupine. Po teoriji trdih in mehkih kislin in baz (Pearson, 1963) je možno s pomočjo lastnosti polarizabilnosti kovin in ligandov napovedati oz. predvideti vezavo posameznih kovin na določene funkcionalne skupine. Tako se težko polarizabilni kovinski kationi  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$  preferenčno vežejo na kisik vsebujoče funkcionalne skupine, medtem ko se lahko polarizabilni kovinski kationi  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^+$  vežejo na žveplo, selen oziroma dušik vsebujoče skupine. Ostali kationi imajo vmesno trdoto  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  in se lahko vežejo tako na trde kot na mehke ligande oziroma na ligande srednje trdote.

V obalnih morjih je delež esencialnih kovin v sledovih, ki so vezane na koloide, zelo različen. Glede na koncentracije v vodi, vsebujejo koloidi do 90% Fe in Cu, do 78% Ni in Cd, do 32 % Co in 30–60 % Se. Nasprotno sta Zn in Mn (z redkimi izjemami) popolnoma raztopljena v morski vodi. Tudi neesencialna Pb in Hg imata močno afiniteto do vezave na COM, glede na to, da so nekatere študije pokazale do 100 % vezavo na COM (Wells, 2002).

Guo in sodelavci (2000) so bolj celovito opredelili kovine v koloidni fazi glede na njihovo koncentracijo in na organski ogljik ( $\mu\text{g}$  kovine/g C). Pokazali so, da imajo najvišje koncentracije bioaktivne kovine Cu, Zn, Ni, Fe ( $> 10 \mu\text{g}/\text{g}$ ), sledijo kovine Pb, Al, Mn, V,

Ba in Ti s koncentracijami med 1 in 10  $\mu\text{g/g}$ . Najnižje vrednosti pa so določili pri Cd, Co in Be. Opazili so tudi, da so višje vsebnosti kovin prisotne v srednjearalanskem območju, kar naj bi povzročil višji kopenski in atmosferski vnos kovin v sledovih. V zalivu Galveston so opazili sledeč naraščajoč trend koncentracij (g kovine/g C): Cd, Pb < Co < Mn < Zn, Cr, Ni < Cu, ki je podoben seriji Irving-Williams (serija stabilnosti kompleksov). Iz tega so lahko sklepali, da interakcijo med COM in kovinami pogojuje afiniteta kovine do določenega liganda (Guo in sod., 2000).

Porazdelitvena konstanta stabilnosti ( $K_D$ ) za kovine v sledovih med suspendiranimi delci in vodo sledi trendu, ki gre ravno obratno kot Irving-Williamsova serija (Irving in Williams, 1953). Vzrok naj bi bil v razliki v sestavi med suspendiranimi in koloidnimi delci. Interakcije med kovinami in COM se lahko opredeli v povezavi s koncentracijo organskega ogljika ali s karakterizacijo funkcionalnih skupin znotraj COM. Tako Cu, Ni, Co in Zn močno korelirajo z organskim C, kar je v skladu z njihovimi koordinacijskimi sposobnostmi v morskem okolju. Opazili so tudi, da kovine ne korelirajo enako v vseh okoljih, in sicer se lahko močno razlikujejo v estuarijih in priobalnih morjih. To naj bi bila najverjetnejša posledica razlik v sestavi COM (spremenljiv delež polisaharidov, proteinov, lipidov in huminskih snovi) in posledično v kvalitativni spremembi razpoložljivih funkcionalnih skupin (Guo in sod., 2000). Še vedno pa ni jasno ali COM poveča privzem oz. odvzem kovin iz morske vode preko agregacije, ali samo poveča topnost kovin preko koordinacijske vezave (Honeyman in Santschi, 1989; Wells in sod., 1998).

Morski koloidi vsebujejo le manjši delež anorganskih koloidov v primerjavi z rečnimi koloidi. Njihov delež se znatno zmanjša od estuarijev do odprtih morij, kjer so prisotni samo organski koloidni delci. Nekatere študije so pokazale, da se določene kovine vežejo na različno velike koloidne frakcije, in sicer se tu močno razlikujeta Cu in Pb. Cu se preferenčno veže na frakcije COM v 1–8 kDa, medtem ko se Pb večinoma veže na delce v razponu med 8 kDa in 0,22  $\mu\text{m}$ . To nakazuje na hipotezo, da reakcije, specifične za kovine, kontrolirajo bioaktivne komplekse in ne gre le za sorpcijo kovine na neko aktivno površino, kar potrjujejo tudi variacije v konstantah stabilnosti za različno velike ligande (Wells, 2002).

## 2.2.2 Biogeokemijsko kroženje Hg v morju

Oksidacija, abiotske in biotske reakcije ter izmenjava Hg<sup>0</sup> med morjem in atmosfero so vzrok za transport in akumulacijo Hg na lokalnem in globalnem nivoju. Hg se v morskem okolju lahko pojavlja v treh oblikah, in sicer kot elementni Hg<sup>0</sup>, dvovalentni Hg<sup>2+</sup> (v raznoraznih anorganskih in organskih kompleksih) in kot metilirani Hg (metil živo srebro – MeHg in dimetil živo srebro – DMHg). Vse oblike Hg so vedno v povezavi z dvovalentnim Hg. V kopenskim vodah je Hg za razliko od morskih predvsem v elementnem stanju Hg<sup>0</sup> (Fitzgerald in sod., 2007).

Nedvomno je biogeokemija Hg zelo kompleksna. Hg večinoma izhaja preko vulkanskih izbruhoov v obliki HgS, ki se na zraku oksidira v HgSO<sub>4</sub> ter se tako poseda v prst in posledično v podtalnico. Dvovalentno Hg<sup>2+</sup> reducirajo bakterije in glive do Hg<sup>0</sup>, katerega hlapi se adsorbirajo na prst, sedimente, huminske snovi in se porazgubijo v atmosferi. Do metilacije Hg<sup>2+</sup> pride preko mikrobnih procesov bakterij in gliv. Pri tem procesu se Hg<sup>2+</sup> veže na negativno nabite dele površine bakterij in gliv. Pri metilaciji v obalnih morjih in estuarijih igrajo glavno vlogo sulfat reducirajoče bakterije, celoten proces metilacije pa poteka v površinski plasti sedimenta. MeHg se po metilaciji sprošča v vodni stolpec, kjer poteka demetilacija in redukcija do hlapnega Hg, nekaj MeHg se vseeno lahko naprej metilira v dimetil Hg (DMHG), ki je tudi hlapen in se sprošča v atmosfero (Fitzgerald in sod., 2007).

Koordinacijsko vezano Hg na COM, ki ima vlogo močnega liganda, je ključnega pomena v porazdelitvi in reaktivnosti raztopljenega Hg. Najverjetnejša mesta vezave so funkcionalne skupine, ki vsebujejo heteroatome žvepla (S), kisika (O) in dušika (N). Tako del COM, ki vsebuje funkcionalne skupine, ki so močno naklonjene vezavi Hg, vpliva na porazdelitev, topnost in mobilnost Hg v morskem okolju. Vezava Hg na COM torej zmanjša količino anorganskega Hg<sup>2+</sup>, ki ga bakterije uporabijo za metilacijo. Med drugim so dolge linearne in razvezjene molekule COM prevelike za prodon skozi celično membrano bakterij. Z vezavo Hg na COM se omeji njegova biološka reaktivnost in s tem bioakumulacija nastalega metilnega Hg (Ravichandran, 2004).

## 2.3 PODROČJE RAZISKAV – TRŽAŠKI ZALIV

### 2.3.1 Osnovni podatki

Tržaški zaliv je plitev zaliv v skrajnjem SV Jadranskega morja. Zaliv, ki si ga delijo Italija, Slovenija in Hrvaška, obsega  $550 \text{ m}^2$  površin, njegova povprečna globina znaša 16 m. Kar 40 % površine zaliva ima globino med 20 in 25 m (Geografski inštitut Antona Melika, 1998), najgloblja točka pa dosega 37 m. Slanost morja se med letom spreminja in znaša na površini 33–38,5 ‰, v globini pa 36–38,5 ‰. Značilen je tudi velik razpon v temperaturah, ki znašajo na površini 7–24 °C in na globini 8–20 °C (Olivotti in sod., 1986). Kroženje morske vode v zalivu je pod močnim vplivom raznih vetrov, plimovanja, predvsem pa morskih tokov, ki se gibajo večinoma v nasprotni smeri urinega kazalca. Površinski sloj je pod konstantnim vplivom vetrov, in sicer se ob zahodnem vetru tok giba v smeri urinega kazalca, ob vzhodnem vetru pa ravno obratno, vodne mase pod globino 10 m pa se gibljejo v nasprotni smeri urinega kazalca (Stravisi, 1983a; 1983b).

Enkrat na leto (od maja do septembra) pride do stratifikacije vodnega stolpca, in sicer pride do vertikalne temperaturne in gostotne razslojenosti, ki se lahko ob močnejših nevihtah tudi poruši oz. premeša (Malej in sod., 1997). Zaradi segrevanja površinskega sloja (nižanje gostote glede na vodo na dnu) je pozno poleti stratifikacija vodnega stolpca izrazitejša, kar privede do pojava hipoksije (možna tudi anoksija) v pridnenem sloju. Do pojava hipoksije pride zaradi omejenega prehoda hranil in omejene difuzije plinov preko piknokline ter tudi zaradi intenzivne razgradnje organske snovi (Faganeli in sod., 1985). Tako je poleti povišana koncentracija hranil pod termoklino, spomladi in jeseni pa na površini zaradi rečnih vnosov (spomladi) in večjih količin padavin (jeseni) (Malej in sod., 1997).

Glavni vnos rečne vode predstavlja reka Soča in Timav s povprečnim letnim pretokom  $80\text{--}110 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (Soča) in  $16\text{--}20 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (Timav) (Olivotti in sod., 1986). Poleg Soče in Timava se v Tržaški zaliv izlivajo ostale manjše reke (Rižana, Dragonja in na italijanski strani Glinščica in Osp), katerih vpliv je manjšega pomena.

### 2.3.1. Pojav sluzastih makroagregatov

Tako imenovano »sluzenje Jadranskega morja«, ki se je v preteklosti sporadično pojavljalo konec pomlad in v poletnem obdobju (nazadnje se je v večji razsežnosti zgodilo poleti leta 2004), je dokumentirano več kot 275 let, podrobnejše študije pa so se pričele šele v osemdesetih letih preteklega stoletja (Fonda Umani in sod., 1989). Med masovnim pojavljanjem je rumeno-rjava sluz prekrivala do nekaj sto kvadratnih kilometrov morske površine (Rinaldi in sod., 1995). Makroagregati so se pojavljali horizontalno in vertikalno v vodnem stolpcu v različnih oblikah in različnih teksturah (Stachowitsch in sod., 1990). Najverjetnejša hipoteza o nastanku makroagregatov sloni na sestavi populacije alg in neravnovesju hranil, saj naj bi diatomeje in dinoflagelati, ki prevladujejo med cvetenjem spomladi, pri višjem razmerju anorganskih hranil (N/P) izločale ekstracellularne polimerne spojine (EPS), ki posledično preko samozdruževanja makromolekul tvori aggregate (Penna in sod., 2009; Verdugo in Santschi, 2010). V makroaggregate so se ujeli fitoplantkon, mikrozooplankton, bakterije, odmrle celice in anorganski delci (minerali) (Stachowitsch in sod., 1990). Sestava makroagregatov je bila zelo heterogena in časovno odvisna od stanja vodnega stolpca, oblike in kemijske ter biološke sestave agregatov (Stachowitsch in sod., 1990; Herndl, 1992; Degobbis in sod. 1995; Rinaldi in sod., 1995). Najvišji delež so predstavljali heteropolisaharidi, medtem ko so lipidi in proteini predstavljali nižji delež (Kovač in sod., 2002; 2004). Polisaharide so sestavljali monosaharidi glukoza, fruktoza, manoza, galaktoza, fukoza, arabinoza, riboza in ksiloza (Faganeli in sod., 1995), med tem ko je bila aminokislinska sestava proteinov primerljiva s suspendirano organsko snovjo (POM) (Faganeli in sod., 1989). Veliko študij se je posvetilo raziskavam vloge fitoplanktona pri nastanku agregatov, in sicer so spremljali kako vplivajo določeni okoljski faktorji na sestavo združbe (Degobbis in sod., 1999), na nastanek limitacije hranil (Fajon in sod., 1999) in kako vpliva zmanjšana paša zooplanktona (Malej in Harris, 1993). Izkazalo se je, da se raztopljeni organski snovi z visokim deležem polisaharidov akumulira v stacionarni fazi fitoplanktonske rasti. Ena od razlag, zakaj prihaja do akumulacije DOC pozno spomladi/začetek poletja, je, da bakterije v oligotrofnem zalivu, kjer je P limitirajoč faktor, ne uspejo porabiti DOC tako hitro kot nastaja (Thingstad in sod., 1997). Večletna študija v Tržaškem zalivu je pokazala akumulacijo DOC po spomladanskem cvetenju fitoplanktona, ker povišana bakterijska produkcija nastopi šele v avgustu (Fonda-Umani in

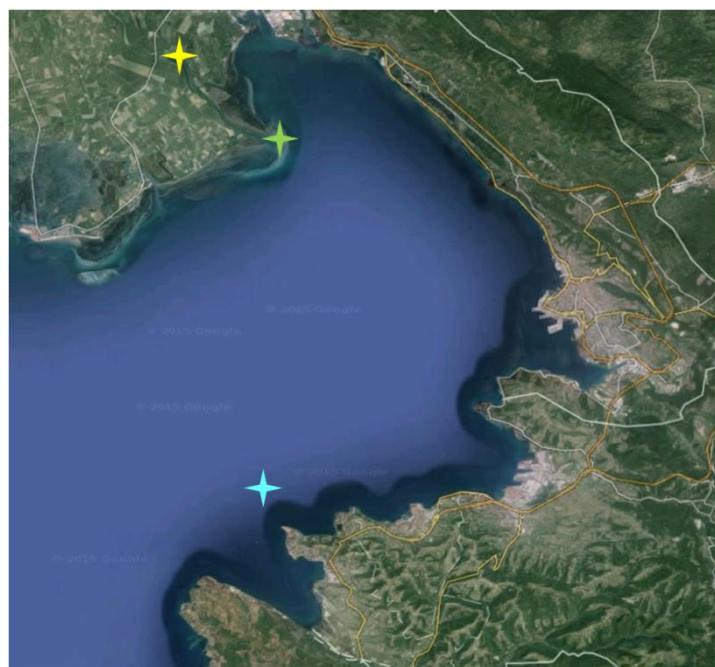
sod., 2007). Agregati so bili podvrženi razgradnji, in sicer mikrobeni, kemijski in fotokemijski (Kovač in sod., 2008), tako kot mikro- in makrogeli, ki so lahko vir ali ponor DOM (glej poglavje 2.1.2.). Aggregate kolonizira prokariotska združba, pri čemer je najbolj učinkovita bakterijska razgradnja, ki iz agregirane snovi sprošča molekule v raztopljeno fazo (Müller-Niklas in sod., 1994; Turk in sod., 2010). Pred kratkim so pokazali, da se tudi struktura prokariotske združbe na morskem snegu med sezonomi spreminja, ker je odvisna od sprememb združbe v okoljski vodi (Vojvoda in sod., 2014). Bakterijski ekstracelularni encimi imajo pomembno vlogo pri katalizi razgradnje makroagreagatov (Turk in sod., 2010). Pri encimski hidrolizi se v aggregatih simultano razgradijo polisaharidi in proteini, medtem ko so lipidi težje razgradljivi. V visokomolekularni frakciji se koloidni polisaharidi najhitreje razgradijo, med tem ko se polisaharidi, ki vsebujejo dušik, težje razgradijo (Faganeli in sod., 2010).

Predvidevalo se je, da se z aglomeracijo koloidne organske snovi v makroaggregatih koncentrirajo tudi kovine in polkovine. Kasneje pa se je izkazalo, da čeprav imajo makroagreagati visoke vsebnosti  $C_{org}$ , je njihova afiniteta do kovin in polkovin nižja v primerjavi s koloidi v intersticijski vodi aggregatov. Predlagana je bila hipoteza, da so funkcionalne skupine, ki bi lahko vezale kovine, že zasedene, saj se makromolekule v aggregatih navzkrižno povezujejo s kationi (npr.  $Ca^{2+}$ ) (Koron in sod., 2013). Izmed vseh kovin in polkovin, sta imela Hg in Cu najvišjo afiniteto do koloidne organske snovi v vodnem stolpcu (Koron in sod., 2013).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 VZORČENJE IN IZOLACIJA COM

##### 3.1.1 Časovne spremembe COM

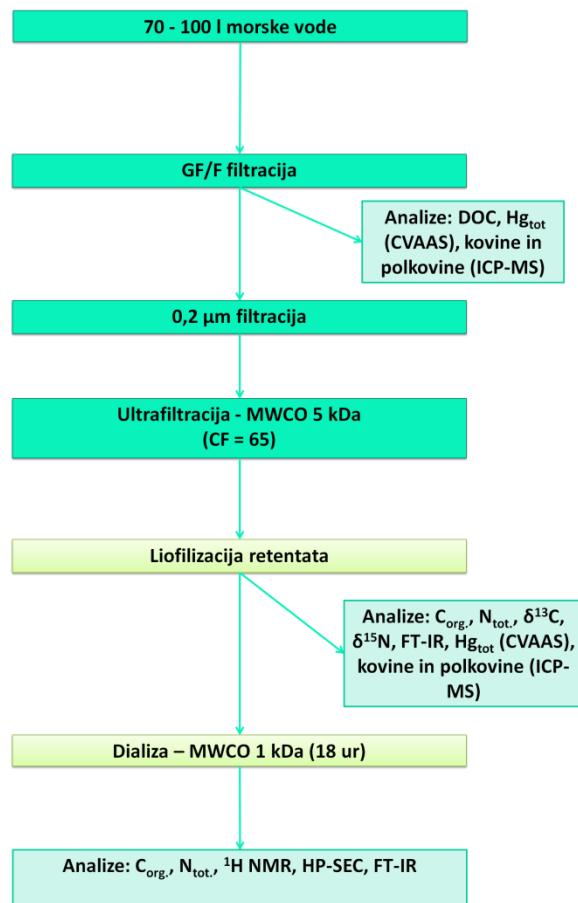


Slika 6: Tržaški zaliv z vzorčevalnimi postajami: oceanografska boja Vida (modra), izliv reke Soče (zelena) in reka Soča (rumena)

Figure 6: Map of the Gulf of Trieste with signed sampling sites: Oceanographic Buoy Vida (blue), Isonzo river mouth (green) and Isonzo river (yellow)

Za spremljanje časovne dinamike sestave koloidne organske snovi smo tekom enega leta enkrat mesečno (13.12.2011–19.12.2012) vzorčili morsko vodo iz vodnega stolpca ob oceanografski boji Vida ( $45^{\circ} 32' 55,68''$  S,  $13^{\circ} 33' 1,89''$  V; 1nM od Pirana) (Slika 6). Vzorčili smo od 70 do 100 litrov morske vode na različnih globinah s pomočjo Niskinovih posod. S sondom CTD smo izmerili globinske profile fizikalnih (slanost in temperatura) in kemijskih (pH, koncentracija kisika in klorofila *a*, itd.) parametrov in s tem določili globino vzorčenja pri najvišji vrednosti klorofila *a*, ki je indikator za biomaso fitoplanktona.

Velike količine morske vode smo filtrirali najprej skozi steklene filtre z velikostjo por 0,8 µm (GF/F, Whatman, 142 mm premer), ki smo jih predhodno prežgali v sežigni peči na 480 °C za 4 ure. Nato smo filtrirali še skozi filtre z velikostjo por 0,2 µm (MCE, Millipore, 142 mm premer). S pomočjo ultrafiltracije smo iz filtratov izolirali COM z MWCO membranami (*angl. molecular weight cut off*), ki so nam zmanjšale volumen in s tem omogočile nadaljnje raziskave sezonskega spremnjanja strukture in sestave COM. Pri ultrafiltraciji smo uporabili sistem šestih membran z MWCO 5kDa (Sartorius; Vivascience Vivaflow 200 unit) in tremi peristaltičnimi črpalkami (Cole-Palmer, Masterflex S/L), ki so delovale s pretokom 300 ml min<sup>-1</sup> pri tlaku 2,5 bar in temperaturi 20 °C. Povprečen koncentracijski faktor je bil 65. Retentate in permeate smo takoj shranili na -30 °C in jih naknadno liofilizirali za nadaljnje analize. Pri nekaterih analizah moti prisotnost soli, zato smo morali vzorce razsoliti s pomočjo dialize. Liofilizirane retentate smo dializirali v vodi milliQ 18 ur v termostatirani komori pri 4 °C. Za dializo smo uporabili membrane RC (regenerirana celuloza) z MWCO 1kDa (Spectrapor 7, Spectrum LAB, RC-regenerirana celuloza). Okoljsko vodo smo menjali najprej na 2 uri in nato na 4 ure. Zadnjo okoljsko vodo smo pustili 12 ur. Tako smo zmanjšali slanost iz 37 psu na manj kot 0,2 psu. Shema postopka izolacije COM je prikazana na Sliki 7.



Slika 7: Shema postopka izolacije in karakterizacije koloidne organske snovi

Figure 7: Shematic presentation of isolation and characterisation of the colloidal organic matter

### 3.1.2 Vzorčenje v reki Soči in na izlivu reke Soče

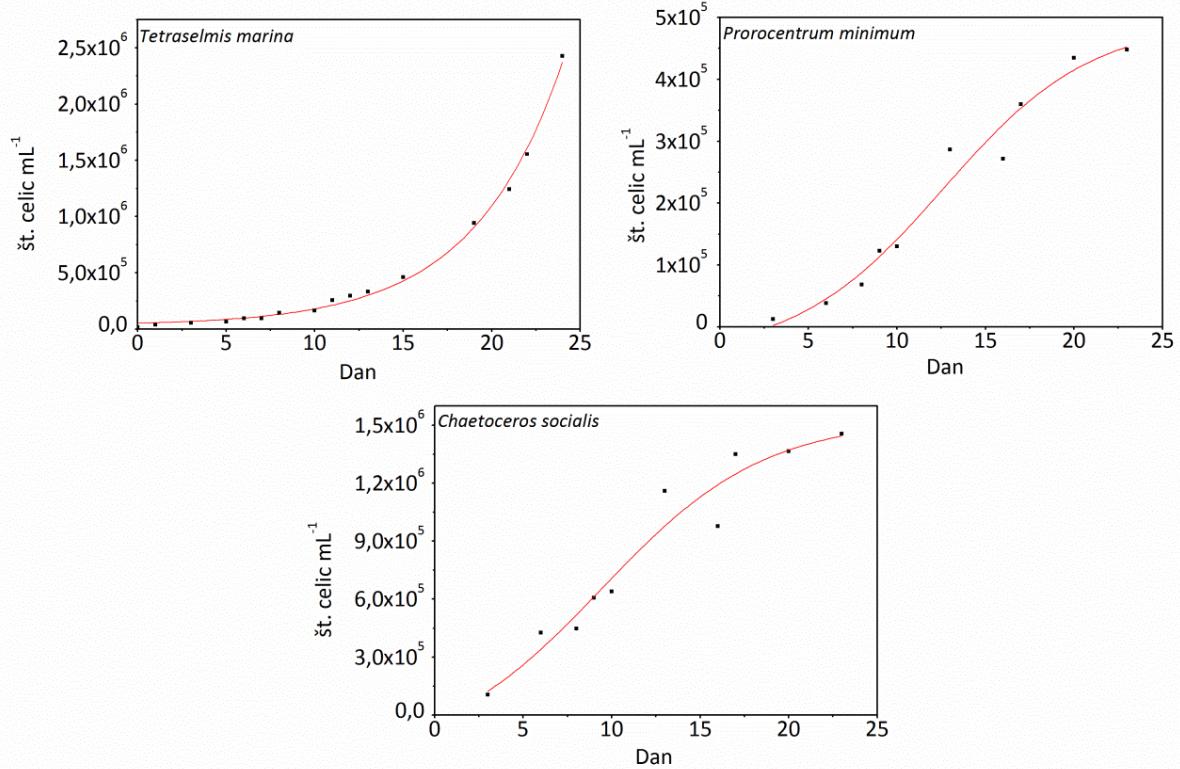
Enkratno smo v istem letu vzorčili tudi reko Sočo in njen izliv v morje.

1.7.2013 smo vzorčili 75 litrov morske vode v izlivu reke Soče (Slika 6) v globini 1 m. Vodo smo zajeli v tri 25 litrske posode Nalgene PC. V vsaki posodi je bila drugačna slanost, in sicer: 16, 26 in 33 psu. Za izolacijo COM smo uporabili iste separacijske metode kot so opisane v 3.1.1.. Pretok reke (merilna postaja Solkan) je znašal  $51 \text{ m}^3/\text{s}$ .

12.11.2014 smo v Soči (Slika 6) vzorčili 30 litrov rečne vode in izolirali rečno COM z uporabo separacijskih metod opisanih v 3.1.1.. Pretok reke (merilna postaja Solkan) je tisti dan znašal  $540 \text{ m}^3/\text{s}$ .

### 3.2 IZOLACIJA COM IZ KULTUR FITOPLANKTONA

Glede na to, da sta DOM in posledično tudi COM predvsem fitoplanktonskega izvora, smo se odločili gojiti več monokultur fitoplanktona, z namenom, da primerjamo sestavo morske in fitoplanktonske COM. Kulture fitoplanktonskih mikroalg je iz Tržaškega zaliva izoliral in priskrbel dr. Alfred Beran iz Inštituta za oceanografijo in eksperimentalno geofiziko v Trstu. Gojili smo tri vrste fitoplanktonskih mikroalg: nanoflagelata *Tetraselmis marina* (pogosta vrsta fitoplanktona tudi drugod po oceanih), diatomejo *Chaetoceros socialis* (julija 2012 je bila v času cvetenja prevladujoča vrsta fitoplanktona) in dinoflagelata *Prorocentrum minimum* (med najpogostejšimi vrstami fitoplantkona v Tržaškem zalivu), ki niso bile aksenične. Vse tri smo vzgajali pri istih pogojih v termostatirani komori pri temperaturi 16 °C, s ciklom dan noč 12 h/12 h in pri svetlobi 75 µEinstein/m<sup>2</sup>/s. Gojili smo jih v mediju ESAW (Harrison in sod., 1980), ki je s hranili obogatena sintetična morska voda. Kulture smo najprej prekondicionirali v 100 ml mediju ESAW in jih po 14 dneh inokulirali v 1 L medij ESAW. Štetje smo opravili pod svetlobnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi. Hitrosti rasti fitoplanktonskih kultur so bile zelo različne (Slika 8), in sicer je kultura *Tetraselmis marina* najhitreje rasla, *Prorocentrum minimum* pa najpočasneje. Ko so kulture dosegle visoko gostoto celic (*Tetraselmis marina* pri  $1,5 \times 10^6$  celic ml<sup>-1</sup>, *Chaetoceros socialis* pri  $9,0 \times 10^5$  celic ml<sup>-1</sup> in *Prorocentrum minimum* pri  $3,5 \times 10^5$  celic ml<sup>-1</sup>), smo izolirali COM, ki ga izloča fitoplankton. Najprej smo kulture filtrirali preko filtrov Whatman GF/F pri tlaku 5 mbar, nato preko 0,2 µm filtrov in nato filtrat ultrafiltrirali z membranami MWCO velikosti por 5000 Da. Z analizatorjem TOC (angl. *total organic carbon analyzer*) smo izmerili vsebnost DOC v 0,2 µm filtratu, retentatu in permeatu. Vzorce smo kasneje dializirali in posneli spektre <sup>1</sup>H NMR.



Slika 8: Rastne krivulje fitoplanktonskih kultur: *Tetraselmis marina*, *Chaetoceros socialis* in *Prorocentrum minimum*

Figure 8: Phytoplankton growth curves of *Tetraselmis marina*, *Chaetoceros socialis* and *Prorocentrum minimum*

### 3.3 ANALIZNI POSTOPKI

#### 3.3.1 Elementna in izotopska analiza C in N

Vsebnost  $C_{org}$  and  $N_{tot}$  smo določili v retentatih (dializirani in nedializirani) z elementnim analizatorjem (Elementar Vario Micro Cube) pri temperaturi sežiga 1150 °C. Vzorce smo zatehtali v srebrne kapsule in jih nakisali z 1M HCl za odstranitev anorganskega ogljika (Hedges and Stern, 1984). Natančnost metode je bila 3 %.

Razmerje stabilnih izotopov ogljika in dušika v vzorcih COM so izmerili na Inštitutu Jožef Stefan (Odsek za znanosti v okolju v Ljubljani) z analizatorjem Europa Scientific ANCA SL system s sežigom in-line pri 1800 °C. Razmerja stabilnih izotopov ogljika in dušika ( $R$ ) so izrazili kot  $\delta^{13}\text{C}$  in  $\delta^{15}\text{N}$  vrednosti po formuli (1)

$$\delta R = \left( \frac{R_{vzorec} - R_{standard}}{R_{standard}} \right) * 1000 (\text{‰}) \dots (1)$$

proti standardu Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) za ogljik in atmosferski  $\text{N}_2$  za dušik. Natančnost metode je bila  $\pm 0.2 \text{ ‰}$  za  $\delta^{13}\text{C}$  in  $\pm 0.3 \text{ ‰}$  za  $\delta^{15}\text{N}$ .

#### 3.3.2 Analiza DOC

Vsebnost DOC so izmerili na inštitutu OGS (Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale) v Trstu. Analize so opravili v GF/F filtratih (filtri z velikostjo por 0,7 µm, premer 47 mm, ki smo jih predhodno žgali v sežigni peči na 480 °C 4 ure). Vzorcem smo dodali 50 µL 50 % nasičene raztopine  $\text{HgCl}_2$  in jih hranili pri 4 °C, da bi preprečili mikrobnou aktivnost. Analize so opravili po metodi HTCO (*angl. High-temperature catalytic oxidation* – visokotemperaturno katalizirana oksidacija) z analizatorjem Shimadzu TOC 5000A po nakisanju vzorca z 1 mol  $\text{L}^{-1}$  HCl za odstranitev  $\text{CO}_2$  (Sugimura and Suzuki 1988). Ponovljivost je bila med 1,5 in 3,0 %.

### 3.3.3 Spektroskopija FT-IR in NMR

Analize FT-IR smo opravili s spektrometrom Perkin-Elmer Spectrum One z nastavkom DRIFT (Diffuse Reflectance), ki ima ločljivost  $4\text{ cm}^{-1}$ . Pred snemanjem spektrov smo vzorce homogenizirali v terilnici in pripravili 50 % (m/m) zmes z brezvodnim KBr, pri tem smo uporabili KBr za snemanje ozadja. Vzorce je spektrometer posnel 10-krat v območju  $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ .

Za spektroskopijo  $^1\text{H-NMR}$  smo se odločili, ker nam nudi več informacij o strukturi in sestavi COM kot spektroskopija FT-IR. Spektre so posneti na Kemijskem inštitutu (Nacionalni center za NMR spektroskopijo visoke ločljivosti v Ljubljani). Zaradi visoke vsebnosti natrija v vzorcih, ki je magnetno aktiven, so posneti  $^1\text{H}$  NMR spektre samo v dializiranih vzorcih COM z NMR spektrometrom Agilent Technologies VNMRS 800 MHz v  $\text{D}_2\text{O}$  pri temperaturi 298 K in uporabo hladne probe. Standardni 1D  $^1\text{H-NMR}$  spektri so bili posneti z uporabo DPFGSE supresije topila. Eksperimentalni pogoji so bili: število posnetkov 256, širina pulza 7,7 ms, spektralna širina 16000 Hz, čas pridobivanja 1 s in zakasnitev impulza 1,5 s.

### 3.3.4 Analiza HPSEC

Za določevanje velikostne sestave COM smo uporabili modificirano metodo HPSEC (Gómez-Ordóñez in sod., 2012) na sistemu HPLC opremljenim z gradientno črpalko (Varian 9010), ki je povezana z UV-VIS detektorjem (Spectra Physics model UV2000) pri valovni dolžini 210 nm. Za ločevanje molekul po velikosti smo uporabili kolono TSK-Gel G4000 PW (300 x 7,5 mm id) in pred-kolono TSK-GEL PWH (75 x 7,5 mm id) (Tosoh Bioscience, Japonska). Za mobilno fazo smo uporabili filtrirano ( $0,2\text{ }\mu\text{m}$ , premer 47 mm, MF-Millipore membrane) in v ultrazvočni kopeli razplinjeno vodo miliQ s pretokom  $0,7\text{ ml min}^{-1}$ . Dializirane liofilizirane vzorce smo raztopili v vodi miliQ in filtrirali skozi  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  filtre na siringi (Millipore, mešani celulozni estri, premer 25 mm) ter jih še isti dan injicirali v HPLC, ki je deloval pri sobni temperaturi. Linearnost analize smo preverili z uporabo standardnega seta pululanov (Sigma Aldrich) s povprečno molsko maso 800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 in 5 kDa, ki so bili analizirani pod enakimi pogoji kot vzorci. Molsko

maso vzorcev smo preračunali iz linearne regresije vrednosti logaritmov molskih mas pululanskih standardov in njihovih retenzijskih volumnov ( $R^2 = 0,987$ ).

### 3.3.5 Analiza EEM in PARAFAC

Med izobraževanjem in usposabljanjem v sklopu evropskega projekta PERSEUS (*1<sup>st</sup> Perseus Training Course*) na Inštitutu za Biofiziko CNR v Pisi (Italija) je bila ena izmed tematik tudi vpogled v fluorescenčne lastnosti raztopljene organske snovi v reki in morju. S pomočjo posnetih spektrov EEM smo lahko naredili analizo PARAFAC morskih in rečnih vzorcev, ki nam omogoča informacije o sestavi in izvoru DOM. Za vsak vzorec smo posneli tridimenzionalne vzbujevalno emisijske matrice z Aqualog fluorimetrom (Horiba), pri čemer smo uporabili 1x1 cm kiveto. Valovna dolžina vzbujanja je bila od 250 do 450 nm z naraščanjem za 5 nm, medtem ko je bilo območje detekcije emisije od 210 do 620 nm z naraščanjem za 3 nm. Vsakemu EEM smo popravili efekt notranjega filtra po enačbi (2) in odšteli EEM vode MilliQ. EEM smo normalizirali z Ramanovim signalom vode MilliQ tako, da smo delili vrednosti fluorescence z integralom Ramanovega signala MilliQ vode ( $\lambda_{eks.} = 350$  nm,  $\lambda_{em.} = 371\text{--}428$  nm). Jakost fluorescence je podana v Ramanovih enotah (*angl. raman units – R. U.*)).

$$F_{popr} = F_{abs} 10^{\frac{A_{280}}{I}} \dots (2)$$

S pomočjo modela PARAFAC smo obdelali 60 tridimenzionalnih EEM v programu MATLAB po formuli (3):

$$X_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + \varepsilon_{ijk}, i = 1..I; j = 1..J; k = 1..K \dots (3)$$

pri čemer smo modelu podali ukaz, da opredeli in validira model s štirimi različnimi tipi fluorescenčnih spojin:

- C1: spojine podobne morski huminski kislini ( $\lambda_{eks.} = 285$  nm,  $\lambda_{em.} = 400$  nm);
- C2a: spojine podobne proteinom ( $\lambda_{eks.} = 265$  nm,  $\lambda_{em.} = 331$  nm);
- C2b: spojine podobne fulvinski kislini ( $\lambda_{eks.} = 250$  nm,  $\lambda_{em.} = 450$  nm);

- C4: spojine podobne huminski kislini ( $\lambda_{\text{eks.}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 459 \text{ nm}$ ).

### 3.3.6 Analiza vsebnosti kovin in polkovin z ICP-MS

Za določevanje vsebnosti kovin in polkovin v liofiliziranih filtratih GF/F in COM smo uporabili induktivno sklopljeno plazmo z masno spektrometrijo (ICP-MS). Analize smo opravili na Institutu Jožef Stefan (Odsek za znanosti v okolju) v Ljubljani. Pred analizo smo za razkroj organske snovi uporabili mikrovalovni sistem. 0,1 g vzorca smo zatehtali v kvarčne epruvete in dodali 1 mL HNO<sub>3</sub> (65%, Suprapur, Merck) in 1 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, Suprapur, Merck). Kvarčne epruvete smo tesno zaprli in jih vstavili v mikrovalovni sistem (Microwave system ETHOS 1, MILESTONE SN 130471), ki ima maksimalno moč 1500 W. Program razkroja smo nastavili tako, da se je pečica 10 min postopno segrevala do 130 °C, 10 min do 200 °C in držala pri tej temperaturi 20 min, nato se je ohlajala 20 min. Razkrojene vzorce smo razredčili do 10 mL. Enak postopek smo uporabili tudi pri referenčnem materialu in slepem vzorcu. Za kontrolo kvalitete smo uporabili referenčni material TORT-2 (hepatopankreas jastoga) (National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, Kanada). Primerjava certificiranih vrednosti vsebnosti kovin in polkovin v referenčnem materialu z izmerjenimi je prikazana v Preglednici 1. Na dan merjenja smo pripravili standardne raztopine za kalibracijo z ICP Multi Element Standard solution XXI (CertiPUR, Merck). Meritve smo opravili z induktivno sklopljeno plazmo z masnim spektrometrom (7500ce, Agilent) in oktapol reakcijskim sistemom (ORS), ki je opremljen z avtomatskim vzorčevalnikom ASX-510 Autosampler (Cetac). Natančnost metode je od 3 do 20 %, odvisno od koncentracijskega območja. Mejo detekcije smo preračunali iz vrednosti slepih vzorcev in treh standardnih deviacij. Vrednosti meje detekcije razkrojenih vzorcev so bile: 7,4 nmol g<sup>-1</sup> za Al, 0,01 nmol g<sup>-1</sup> za V, 0,46 nmol g<sup>-1</sup> za Cr, 0,14 nmol g<sup>-1</sup> za Mn, 14,2 nmol g<sup>-1</sup> za Fe, 0,01 nmol g<sup>-1</sup> za Co, 0,58 nmol g<sup>-1</sup> za Ni, 0,35 nmol g<sup>-1</sup> za Cu, 1,2 nmol g<sup>-1</sup> za Zn, 0,01 nmol g<sup>-1</sup> za Ga, 0,004 nmol g<sup>-1</sup> za As, 1,0 nmol g<sup>-1</sup> za Se, 0,007 nmol g<sup>-1</sup> za Rb, 0,04 nmol g<sup>-1</sup> za Sr, 0,09 nmol g<sup>-1</sup> za Ag, 0,003 nmol g<sup>-1</sup> za Cd, 0,001 nmol g<sup>-1</sup> za Cs, 0,03 nmol g<sup>-1</sup> za Ba, 0,002 nmol g<sup>-1</sup> za Tl, 0,14 nmol g<sup>-1</sup> za Pb, 0,001 nmol g<sup>-1</sup> za Bi in 0,0003 nmol g<sup>-1</sup> za Cs.

Preglednica 1: Izkoristek analize kovin in polkovin v referenčnem materialu TORT-2 (National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, Kanada). Rezultati so podani kot povprečne vrednosti šestih meritev referenčnega materiala s standardno deviacijo.

Table 1: Metal and metalloid yealds in certified reference material TORT-2 (National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, Canada). Results are shown as arithmetical means of six determinations and standard deviation.

$\mu\text{g g}^{-1}$	Certificirana vrednost	Izmerjena vrednost	Izkoristek (%)
<b>Zn</b>	$180 \pm 6$	$141 \pm 5$	78,3
<b>Se</b>	$5,63 \pm 0,67$	$6,38 \pm 0,35$	113,3
<b>Ni</b>	$2,50 \pm 0,19$	$1,91 \pm 0,06$	76,4
<b>Cr</b>	$0,77 \pm 0,15$	$0,59 \pm 0,06$	76,6
<b>Sr</b>	$45,2 \pm 1,9$	$36,1 \pm 1,0$	79,8
<b>Cd</b>	$26,7 \pm 0,6$	$23,8 \pm 0,7$	89,1
<b>As</b>	$21,6 \pm 1,8$	$18,3 \pm 0,8$	84,8
<b>Mn</b>	$13,6 \pm 1,2$	$11,6 \pm 0,4$	85,3
<b>Co</b>	$0,51 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,02$	90,2
<b>V</b>	$1,64 \pm 0,19$	$1,89 \pm 0,06$	115,2
<b>Fe</b>	$105 \pm 13$	$98 \pm 19$	93,3
<b>Cu</b>	$106 \pm 10$	$83,5 \pm 2,3$	78,8
<b>Pb</b>	$0,35 \pm 0,13$	$0,24 \pm 0,02$	68,6

### 3.3.7 Analize vsebnosti celokupnega Hg z metodo CV–AAS

Za določevanje vsebnosti celokupnega Hg v liofiliziranih GF/F filtratih in COM smo uporabili polavtomatski atomski absorpcijski spektrometer hladnih par (CV–AAS, Sanso Seisakusho Co., LTD). Analize smo opravili na Institutu Jožef Stefan (Odsek za znanosti v okolju). Pred analizo smo opravili razkroj vzorcev z močno kislino. V 50 mL bučke smo zatehtali 0,5 g vzorca in dodali 1 mL vode MilliQ, 1 mL  $\text{HNO}_3$  (65 %, p. a., Merck) 1 mL  $\text{HClO}_4$  (70 %, suprapur, Merck) in 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96 %, suprapur, Merck). Nato smo bučke segreli v vodni kopeli za 20 min pri 240 °C. Ko so se bučke ohladile, smo vanje dolili vodo MilliQ do 50 mL. V redukcijsko celico aparature smo dodali 5 mL vzorca in nato dodali raztopino  $\text{SnCl}_2$ , ki reducira  $\text{Hg}^{2+}$  v  $\text{Hg}^0$ . Na redukcijsko celico smo priklopili zračno črpalko, da je iz celice izpihalo  $\text{Hg}^0$ , ki se nato ujame v nevtralizacijsko celico (da nevtralizira kislinske pare), za tem pa v kondenzacijsko past, kjer se vodne pare kondenzirajo. Ko se vzpostavi ravnotežje med plinskim in tekočim  $\text{Hg}^0$ , štiripotni ventil

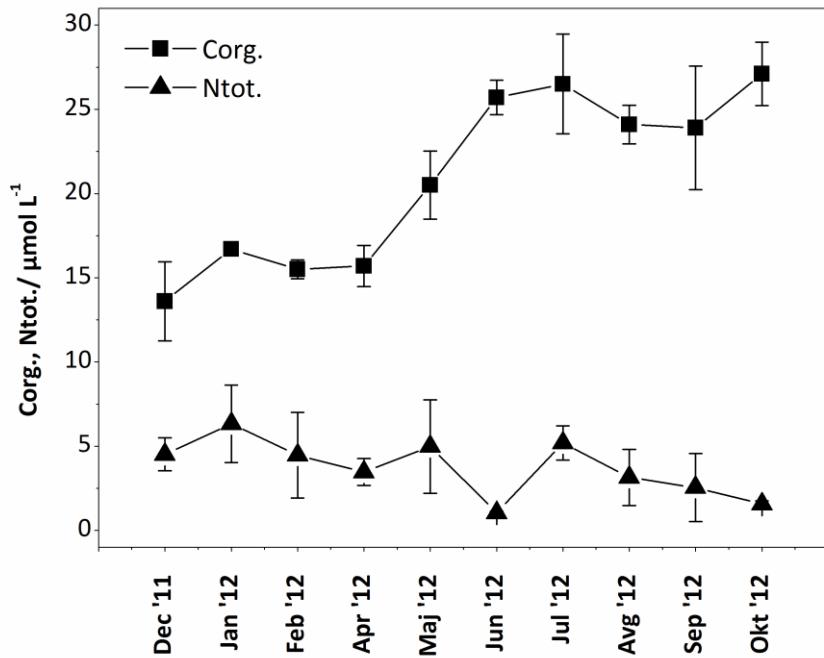
preusmeri hlapo v absorpcijsko celico. Koncentracijo celokupnega Hg smo preračunali iz višine vrhov v mm iz zapisovalnika in iz standardnih raztopin Hg s koncentracijo 0,02 ng/mL in 0,04 ng/mL. Za referenčni material smo uporabili certificiran referenčni material morske trave IAEA-140/TM (International Atomic Energy Agency, Dunaj, Avstrija). Certificirana vsebnost Hg v referenčnem materialu je  $0,038 \pm 0,006 \mu\text{g g}^{-1}$ , izmerjena pa  $0,035 \pm 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$  (štiri paralelke).

## 4 REZULTATI

### 4.1 SEZONSKE SPREMEMBE COM IN DOM

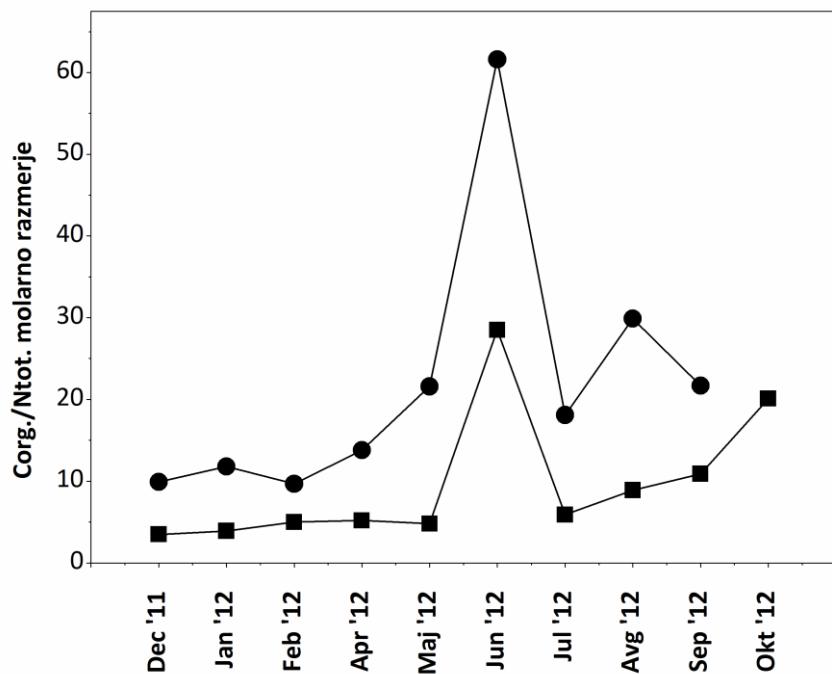
#### 4.1.1 Variacija koncentracij in izvora COM in DOM

Vsebnost organskega ogljika ( $C_{org.}$ ) v COM se je med letom spremajala, in sicer je bila poleti skoraj dvakrat višja kot v zimskih mesecih. Najvišji  $C_{org.}$  smo izmerili julija 2012 ( $26,5 \pm 2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), najnižji pa decembra 2011 ( $13,6 \pm 2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Slika 9). Vsebnost totalnega dušika ( $N_{tot.}$ ) v COM je bila skozi leto v povprečju  $3,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$ , najnižjo vrednost smo izmerili junija 2012 ( $1,1 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Molsko razmerje  $C_{org.}/N_{tot.}$  je bilo skozi leto v povprečju 7,5 v nedializiranih in 17,1 v dializiranih vzorcih (Slika 10), najvišje molsko razmerje  $C_{org.}/N_{tot.}$  (28,5, nedializirani) pa je bilo junija 2012. Korelacija  $C_{org.}/N_{tot.}$  med dializiranimi in nedializiranimi vzorci je visoka ( $R^2 = 0,91$ ,  $n = 9$ ).



Slika 9: Sezonska variacija  $C_{org.}$  (kvadrat) in  $N_{tot.}$  (trikotnik) koncentracije v koloidni organski snovi ( $> 5 \text{ kDa}$ ) od decembra 2011 do oktobra 2012 (povzeto po Klun in sod., 2015)

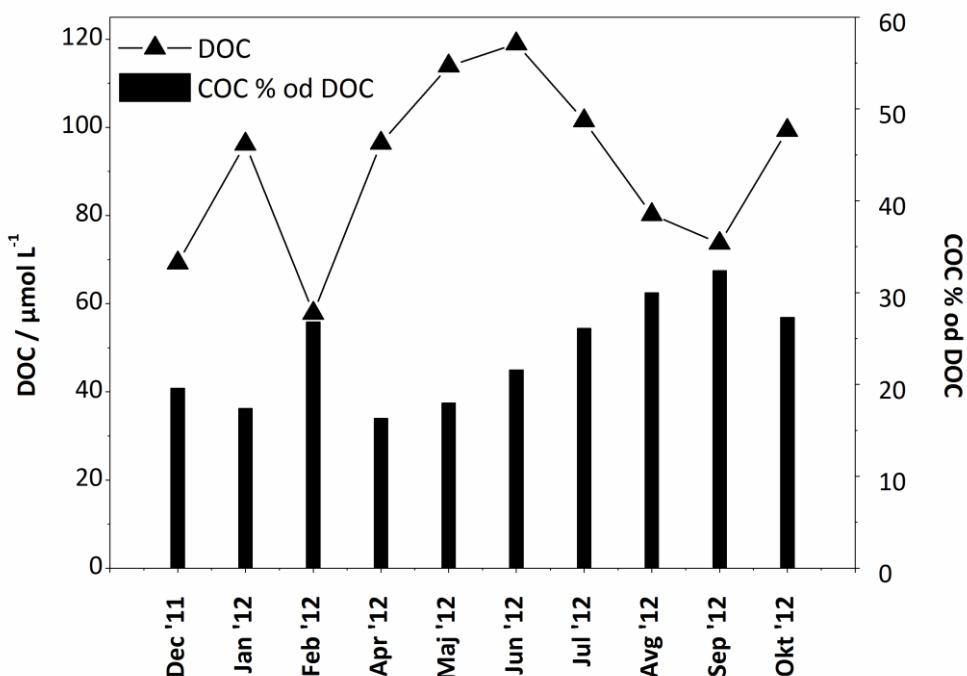
Figure 9: Seasonal variation of  $C_{org.}$  (square) and  $N_{tot.}$  (triangle) concentrations in colloidal organic matter ( $> 5 \text{ kDa}$ ) from December 2011 to October 2012 (from Klun et al., 2015)



Slika 10: Variacije  $C_{org.}/N_{tot.}$  v nedializirani (kvadrat) in dializirani (krogci) COM od decembra 2011 do oktobra 2012 (povzeto po Klun in sod., 2015)

Figure 10:  $C_{org.}/N_{tot.}$  variations in nondialyzed (square) and dialyzed (dots) COM from December 2011 to October 2012 (from Klun et al., 2015)

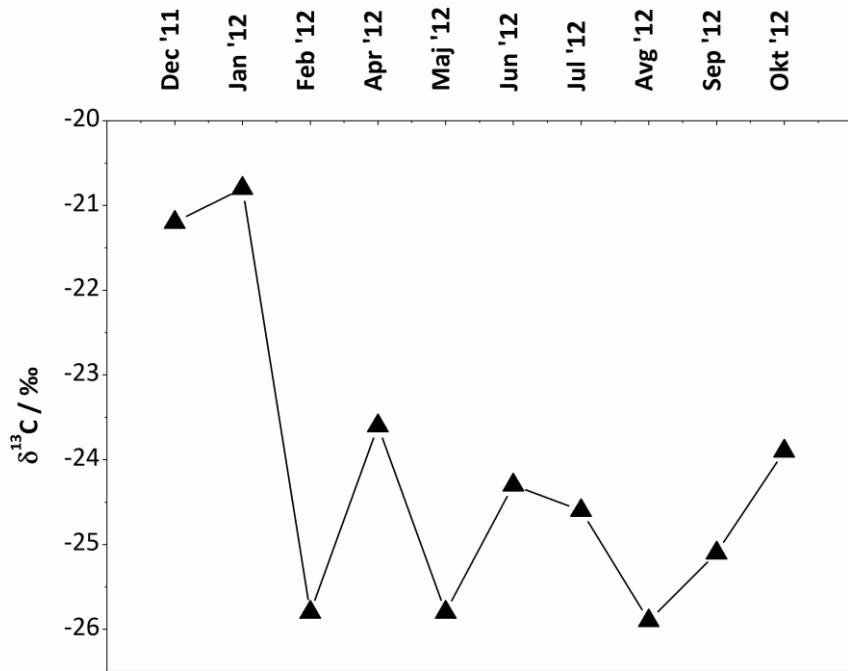
Delež koloidnega organskega ogljika (% COC) v celokupnem DOC je v povprečju znašal  $23,5 \pm 5,7\%$  (Slika 11). Aprila 2012 se je delež COC začel višati oz. akumulirati vse do Septembra 2012, ko je delež COC narasel za dvakrat od 16,3 na 32,4 %. Tako kot COC, je tudi vsebnost DOC varirala med letom, in sicer so bile najvišje vrednosti v poletnih mesecih ( $118,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , junij 2012) in najnižje v zimskih mesecih ( $57,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , februar 2012) (Slika 11).



Slika 11: Sezonska variacija koncentracije DOC in deleža COC v celokupnem DOC (% COC) v obdobju od decembra 2011 do oktobra 2012 (povzeto po Klun in sod., 2015)

Figure 11: Seasonal variation of DOC concentration and percentage of COC in bulk DOC (%COC) from December 2011 to October 2012 (from Klun et al., 2015)

Stabilni izotop ogljika (vrednost  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$ ) v COM je skozi leto 2012 nihal med  $-21\text{\textperthousand}$  pozimi in od  $-24\text{\textperthousand}$  do  $-26\text{\textperthousand}$  spomladi in poleti (Slika 12). Vrednosti stabilnega izotopa dušika ( $\delta^{15}\text{N}$ ) so med zimo in poletjem nihale od  $-3,5\text{\textperthousand}$  do  $+0,7\text{\textperthousand}$ , pri nekaterih vzorcih pa so bile vrednosti  $\delta^{15}\text{N}$  pod mejo detekcije.



Slika 12: Vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$  nedializirane COM v obdobju od decembra 2011 do oktobra 2012 (povzeto po Klun in sod., 2015)

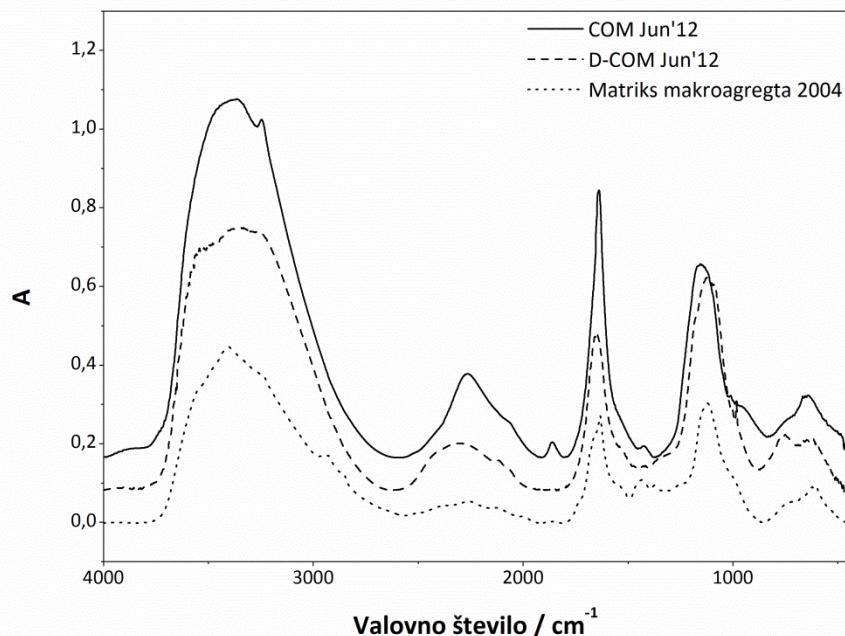
Figure 12:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$  values of nondialyzed COM from December 2011 to October 2012 (from Klun et al., 2015)

#### 4.1.2 Variacija kemijske sestave COM

##### 4.1.2.1 Spektroskopija FT-IR

S spektroskopijo FT-IR, ki služi predvsem kvalitativni analizi vzorca, smo potrdili prisotnost pomembnih biokemijskih spojin tako v nedializiranih kot dializiranih vzorcih. Za primerjavo smo vzeli spekter makroagregatov iz leta 2004 (Slika 13). Pri vseh vzorcih (nedializirani in dializirani) je viden širok vrh med  $2800$  in  $3800 \text{ cm}^{-1}$ , ki pripada absorpciji zaradi vzdolžnega nihanja vezi N–H, C–H in predvsem O–H. Poleg prisotnosti nihanj O–H zaradi proste vode v higroskopičnih vzorcih, v tem območju absorbirajo tudi karboksilne in hidroksilne skupine polisaharidov, primarni in sekundarni amini proteinov in aminopolisaharidov ter alifatske in olefinske spojine (predvsem lipidi). Naslednji

absorpcijski vrh je pri  $2250\text{ cm}^{-1}$ , ki pripada absorpciji nihanja nitrilnih spojin, kot so cianogeni glikozidi in druge nitrilirane organske spojine (Faganeli in sod., 2010). Absorpcijski vrh pri  $1634\text{ cm}^{-1}$  pripada striženju vezi N-H (Meng in sod., 2014) in tudi vzdolžnemu nihanju vezi C=O v amidih, pri  $1170\text{ cm}^{-1}$  pa nihanju C-O v polisaharidih (Guggenberger in sod., 1994) in vezi Si-O v silikatih in organo-silicijevih spojinah. V spektru je manj vidna lipidna frakcija v območju nihanja C-H metilne in metilenske vezi  $2900\text{ cm}^{-1}$ – $3000\text{ cm}^{-1}$ , medtem ko v spektru makroagregatov pride do izraza (Slika 13), ker je absorpcijski vrh zaradi higroskopičnosti vzorcev slabo viden oz. prekrit. Slabo viden je tudi šibek absorpcijski vrh pri  $1437\text{ cm}^{-1}$ , ki je znan za asimetrično prečno nihanje metilne in metilenske vezi C-H.



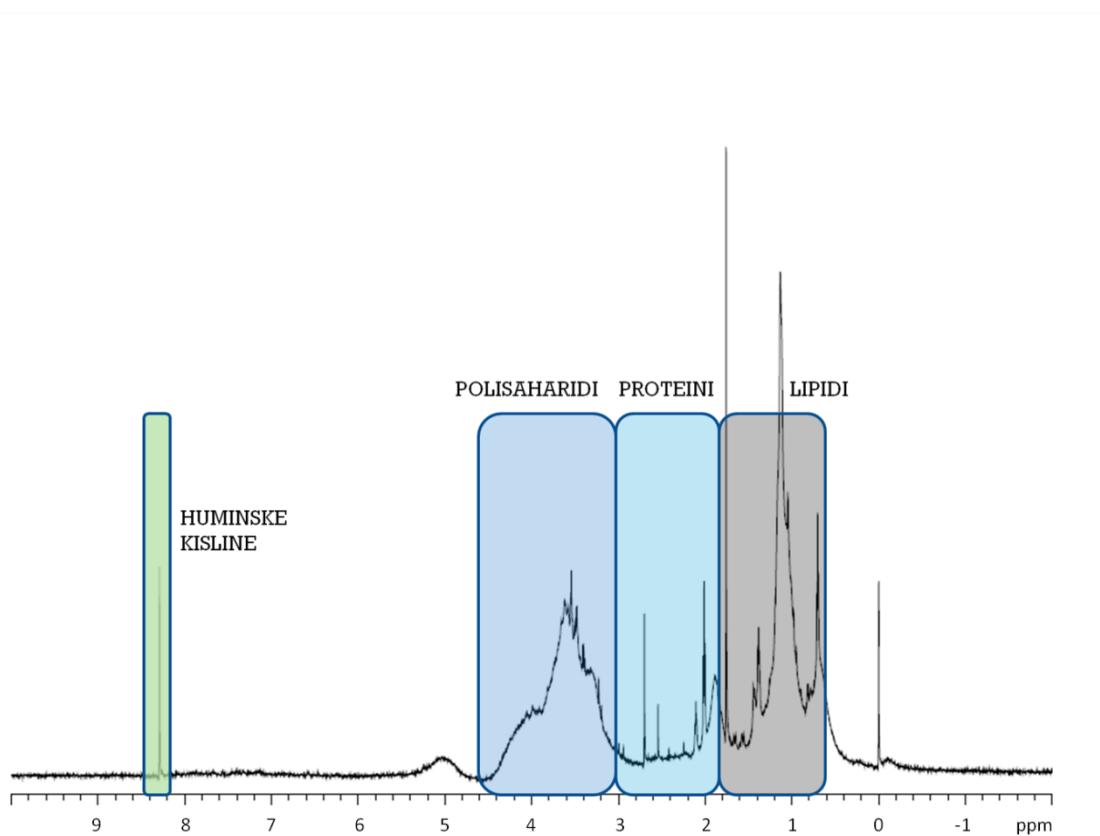
Slika 13: Primerjava FT-IR spektrov dializirane (D-COM, črtkano) in nedializirane (COM, polna črta) koloidne organske snovi iz junija meseca ter matriksa makroagregatov iz leta 2004 (pike) (Faganeli in sod. 2010)

Figure 13: Comparison between FT-IR spectra of dialyzed (D-COM, dash) and nondialyzed colloidal organic matter (COM, solid) in June 2012 and macroaggregate matrix from summer 2004 (dot) (Faganeli et al. 2010)

#### 4.1.2.2 Spektroskopija $^1\text{H}$ NMR

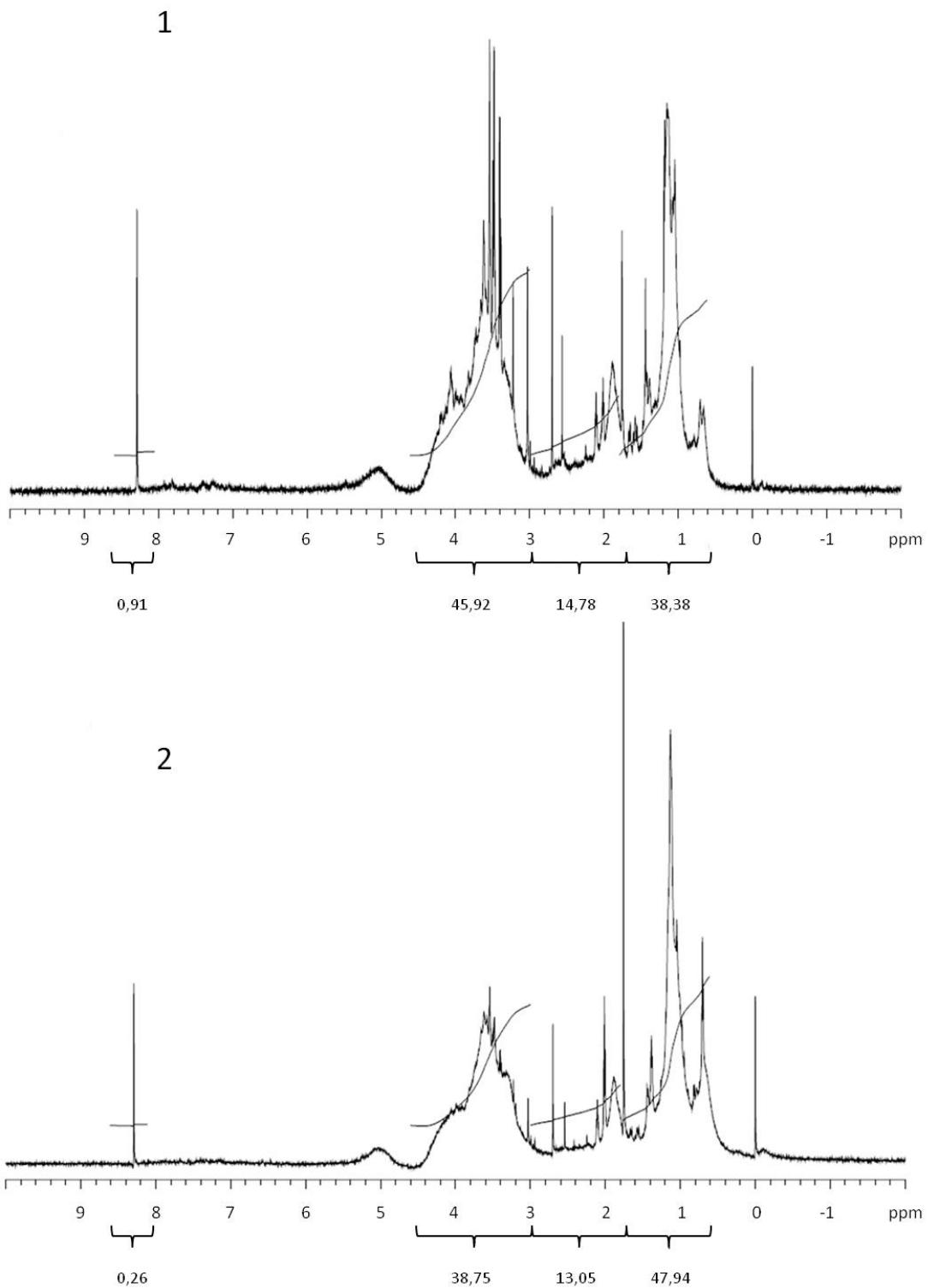
$^1\text{H}$  NMR spektre smo zaradi visoke vsebnosti natrija v nedializiranih vzorcih, ki je magnetno aktiven, posneli samo v dializiranih vzorcih. Za analizo sezonske dinamike COM smo opravili semi-kvantitativno analizo s pomočjo  $^1\text{H}$  NMR spektroskopije. Spektre  $^1\text{H}$  NMR smo razdelili na štiri dele (Slika 14), ki pripadajo pomembnim biokemijskim spojinam v morskem okolju (Hertkorn in sod., 2013) in jih integrirali v določenem območju protonske resonance:

- lipidi (alifatski protoni;  $\text{HCH}_2-\text{CH}_2-$ ):  $\delta=0-1,8$  ppm,
- proteini (protoni ob amidni, ketonski in karboksilni funkcionalni skupini;  $\text{HC}-\text{HCOR}$ ):  $\delta=1,8-3,0$  ppm,
- polisaharidi (protoni vezani na ali blizu ogljika hidroksilne in eterne funkcionalne skupine;  $\text{HC}-\text{OH}$ ,  $\text{HC}-\text{O}-\text{C}-$ ):  $\delta=3,0-4,6$  ppm,
- huminske kisline (aromatski protoni;  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ):  $\delta=8,0-9,0$  ppm.



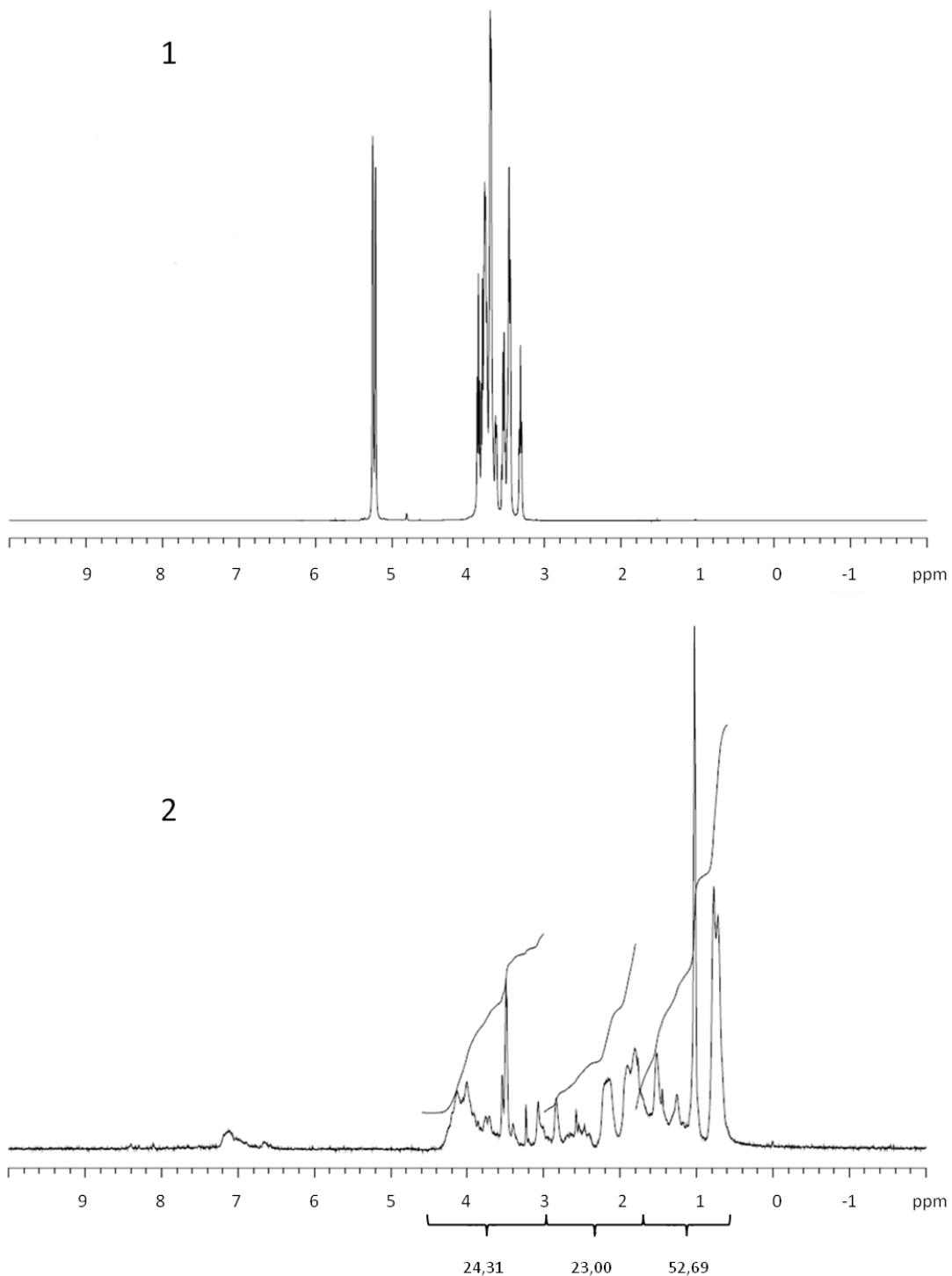
Slika 14: Prikaz integriranih območij protonskih resonanc, ki pripadajo glavnim biokemijskim komponentam morske koloidne organske snovi

Figure 14: Integrated areas of proton resonance assigned to main biochemical components in the marine colloidal organic matter



Slika 15:  $^1\text{H}$  NMR spektri dializiranih vzorcev izolirane COM iz meseca aprila 2012 (1) in julija 2012 (2)

Figure 15:  $^1\text{H}$  NMR spectra of dialyzed samples of isolated COM from April 2012 (1) and July 2012 (2)

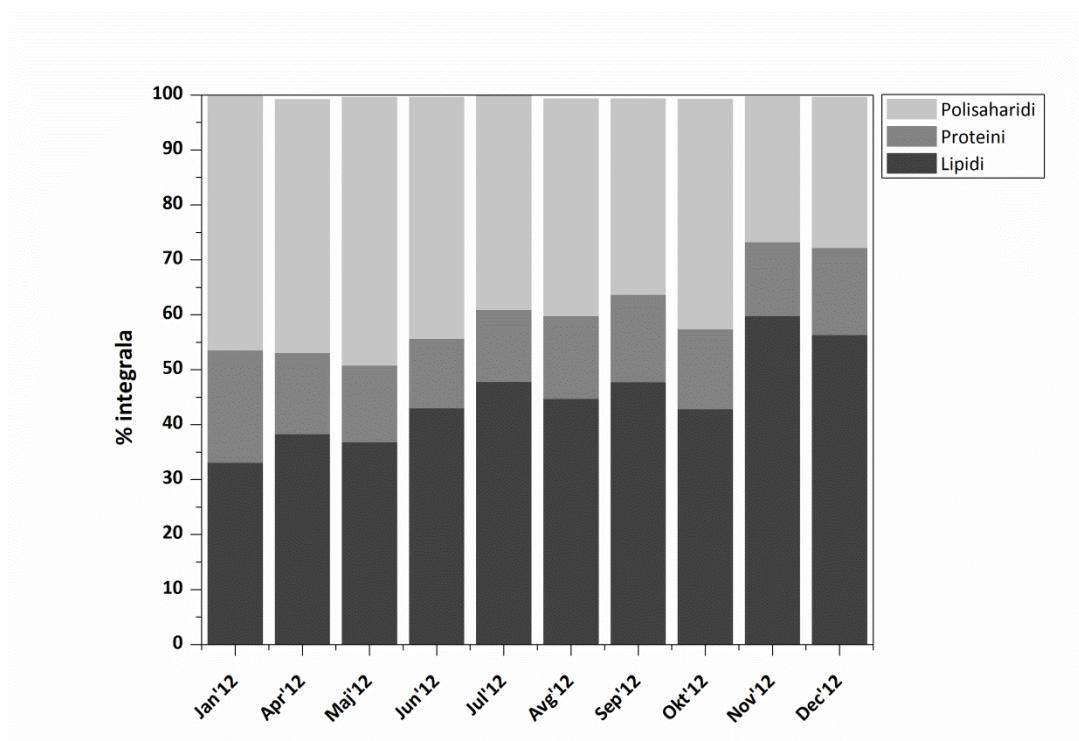


Slika 16:  $^1\text{H}$  NMR spektri standardov pululana (1) in kazeina (2)

Figure 16:  $^1\text{H}$  NMR spectra of standards pullulan (1) and casein (2)

Spektre  $^1\text{H}$  NMR izoliranih COM smo primerjali s spektri standarda pullulana (polisaharid) in kazeina (protein) (Sliki 15 in 16). Kemijski premiki protonov pullulana so v ozkem območju 3–4 ppm in pri 5,2 ppm, ki pripada anomernemu protonu. Drugače je pri kazeinu, kjer so kemijski premiki protonov razpršeni od 1,6 do 4,4 ppm, kar pomeni, da se pri semi-kvantitativni analizi ne vidi večje sezonske spremembe proteinske frakcije COM, ker je protonska resonanca razpršena po širšem območju spektra.

Slika 17 in Preglednica 2 prikazujeta sezonsko spremembo sestave COM, ki je izražena v deležih. Seštevek vseh štirih območij integralov je 100 %. Lipidna frakcija se od januarja do julija zviša za skoraj polovico (relativno za 44 % iz 33,2 na 47,9 %) in se nato postopoma znižuje ter ponovno novembra naraste na 59,9 %. Proteinska frakcija je pozimi višja kot v poletnih mesecih (januarja 20,4 %, junija 12,6 %), vendar zaradi širokega območja kemijskih premikov proteinov ni razvidna večja dinamika. Polisaharidni delež COM je tudi višji v zimskih mesecih (46,1 %) in se postopoma niža proti poletju (julij 38,8 %), najnižje vrednosti pa doseže novembra (26,3 %). Najnižji delež prispevajo k spektru huminske kislino, pri čemer so najvišje vrednosti spomladti (0,9 %) in jeseni (0,8 %), medtem ko so pozimi in poleti precej nižje (0,3 %).



Slika 17: Sezonske spremembe treh večjih komponent COM (lipidi, proteini in polisaharidi) izražene z integrali protonске rezonanse  $^1\text{H}$  NMR spektrov v %

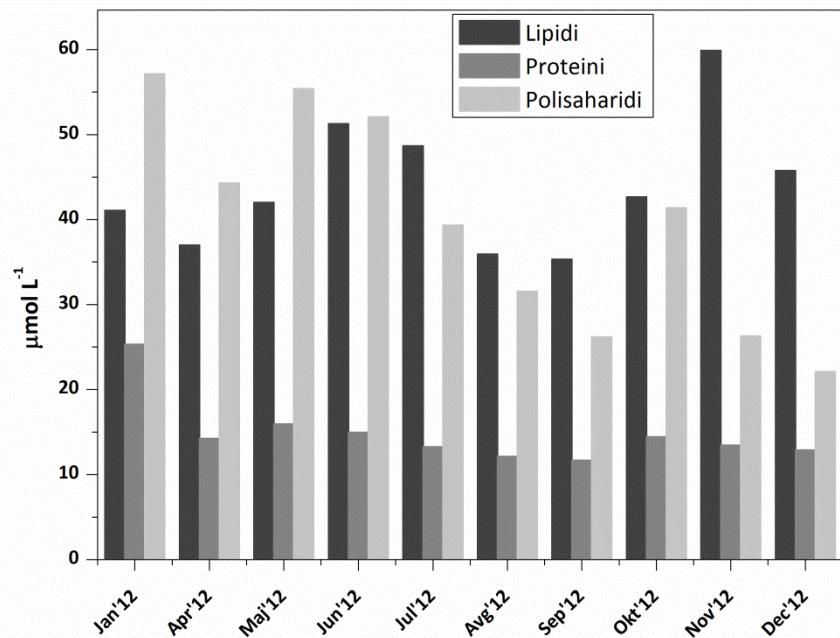
Figure 17: Seasonal dynamic of three main components of COM (lipids, proteins and polysaccharides) shown as integrated proton resonance in  $^1\text{H}$  NMR as %

Preglednica 2: Porazdedlitev glavnih skupin integriranih protonskih resonanc v spektru  $^1\text{H}$  NMR, ki predstavljajo štiri glavne biokemijske skupine spojin v morski koloidni organski snovi (lipidi, proteini, polisaharidi in huminske kisline)

Table 2: Distribution of the integrated main groups of proton resonance in  $^1\text{H}$  NMR spectra assigned to four major constituents present in marine colloidal organic matter (lipids, proteins, polysaccharides and humics)

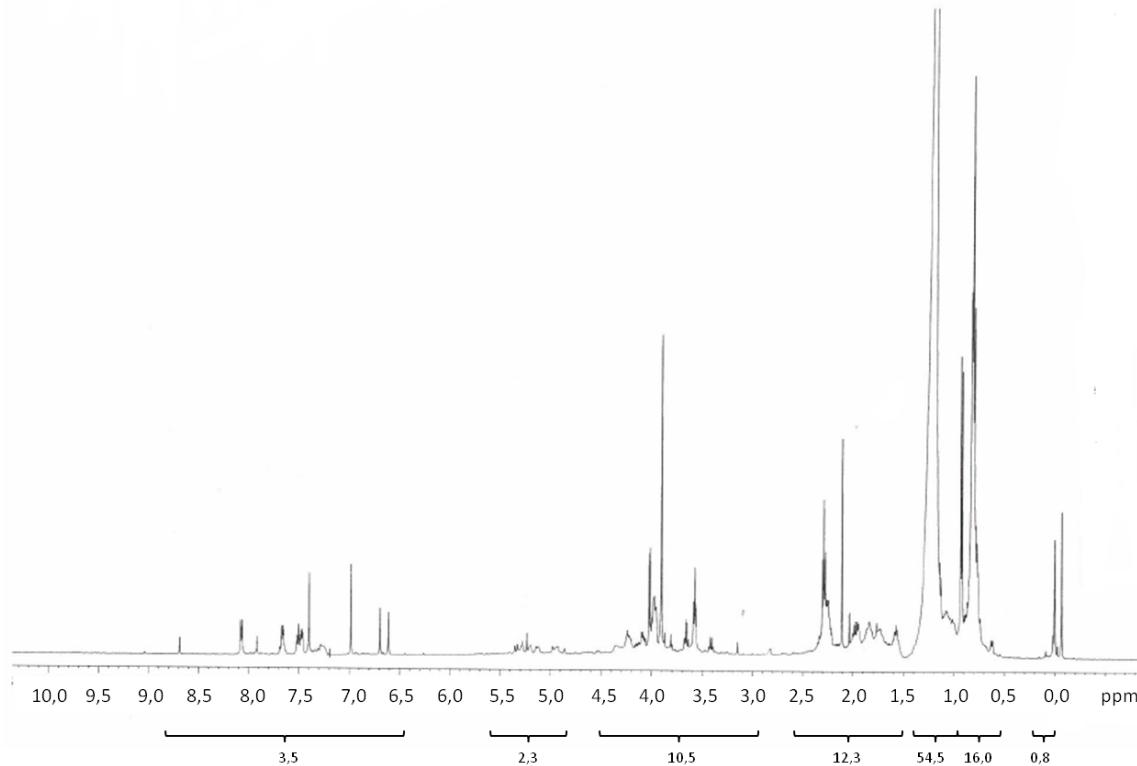
<b>δ/ppm</b>	<b>Lipidi</b>	<b>Proteini</b>	<b>Polisaharidi</b>	<b>Huminske kisline</b>
	<b>HCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-</b>	<b>HC-HCOR</b>	<b>HC-OH HC-O-C</b>	<b>H<sub>Arom.</sub></b>
<b>Jan'12</b>	33,2	20,4	46,1	0,3
<b>Apr'12</b>	38,4	14,8	45,9	0,9
<b>Maj'12</b>	36,9	14,0	48,6	0,5
<b>Jun'12</b>	43,1	12,6	43,8	0,5
<b>Jul'12</b>	47,9	13,1	38,8	0,3
<b>Avg'12</b>	44,8	15,1	39,3	0,8
<b>Sep'12</b>	47,9	15,8	35,5	0,8
<b>Okt'12</b>	42,9	14,5	41,7	0,8
<b>Nov'12</b>	59,9	13,4	26,3	0,4
<b>Dec'12</b>	46,4	15,9	27,2	0,4

Poleg dinamike sestave znotraj COM smo semi-kvantitativno opravili tudi analizo spremenjanja koncentracije posameznih komponent COM v letu 2012, in sicer tako, da smo deleže integriranih delov  $^1\text{H}$  NMR spektra pomnožili z vrednostmi DOC (Slika 18). Tako je videti, da lipidna in polisaharidna frakcija naraščata od januarja do junija in se z julijem pričneta postopoma nižati, s tem da lipidni del ponovno naraste jeseni. Kljub upoštevanju vrednosti DOC, je najvišja vrednost proteinskega deleža januarja, najnižja pa avgusta.



Slika 18: Sezonska dinamika komponent COM normaliziranih z vrednostmi DOC izraženih v  $\mu\text{mol L}^{-1}$

Figure 18: Seasonal dynamic of COM components normalized with DOC values in  $\mu\text{mol L}^{-1}$



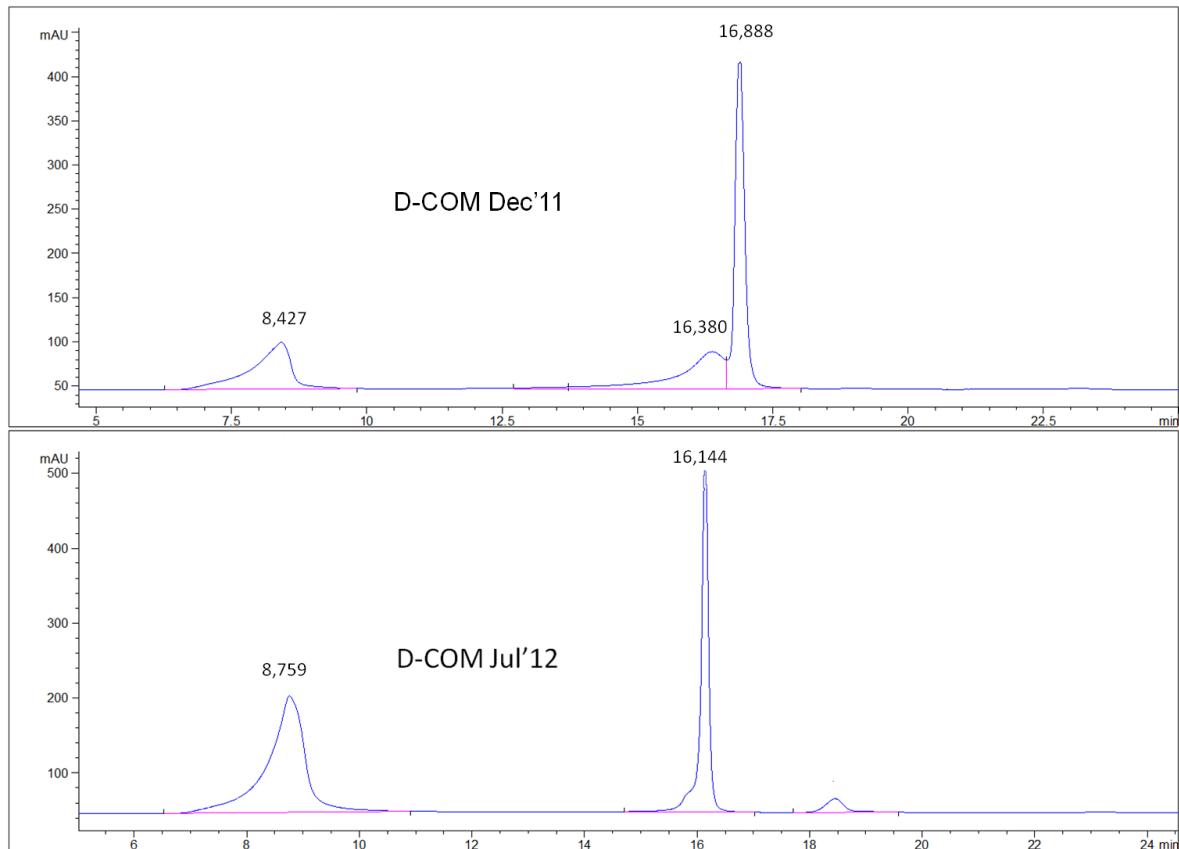
Slika 19: <sup>1</sup>H NMR spekter morske COM posnet v devteriranem kloroformu ( $\text{CDCl}_3$ )

Figure 19: <sup>1</sup>H NMR spectra of marine COM scanned in deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ )

Posneli smo tudi spekter morske COM v devteriranem kloroformu (Slika 19), ki pokaže selektivno izolacijo lipidov (0,5 – 1,5 ppm ~ 70,5 %), v manjši meri pa se izolirajo tudi proteini (1,5 – 2,5 ppm, 12,3 %) in polisaharidi (3 – 4,5 ppm, 10,5 %). Izolirajo se tudi spojine z aromatskimi protoni (6,5 – 8,2 ppm), ki v spektrih posnetih v  $\text{D}_2\text{O}$  niso vidni.

#### 4.1.2.3 Analiza HPSEC

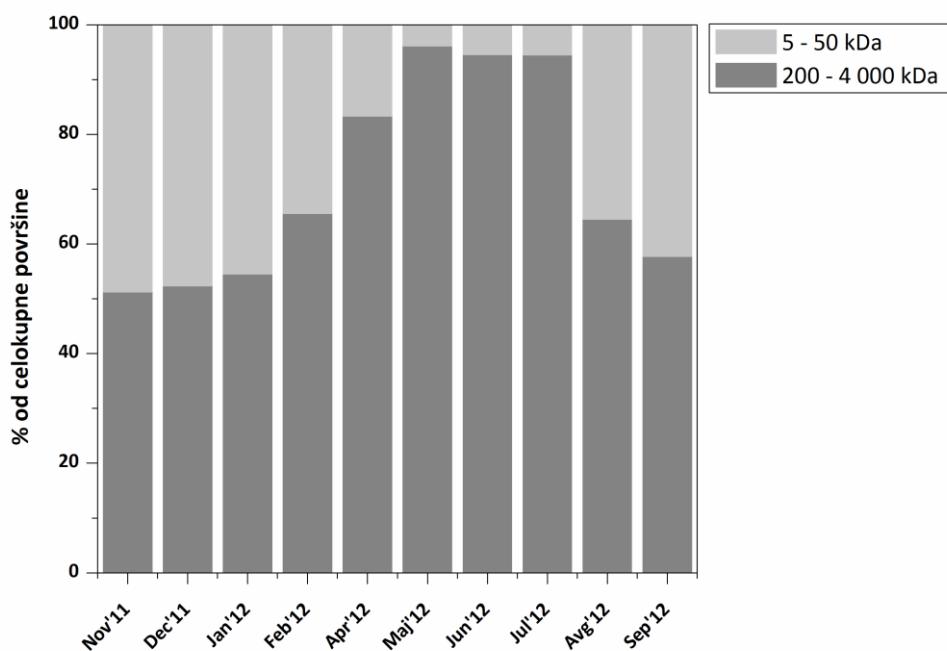
S pomočjo analize HPSEC smo imeli vpogled v sezonsko dinamiko velikostne sestave COM. Kromatogram je prikazal tri ločene vrhove: molekule z visoko molsko maso (200–4000 kDa; prvi vrh v kromatogramu), molekule z nižjo molsko maso (5–50 kDa, drugi vrh), zadnji vrh pa predstavljajo soli (Slika 20). Seštevek površin vrhov visokomolekularnih in nižjemolekularnih spojin pozitivno korelira z vsebnostjo DOC ( $R^2 = 0,65$ ), kar potrjuje, da tretji vrh pripada solem, ki se niso izločile med dializo.



Slika 20: Kromatogram dializirane COM iz decembra 2011 (D-COM Dec'11) in julija 2012 (D-COM Jul'12)

Figure 20: Chromatogram of dialyzed COM from December 2011 (D-COM Dec'11) and from July 2012 (D-COM Jul'12)

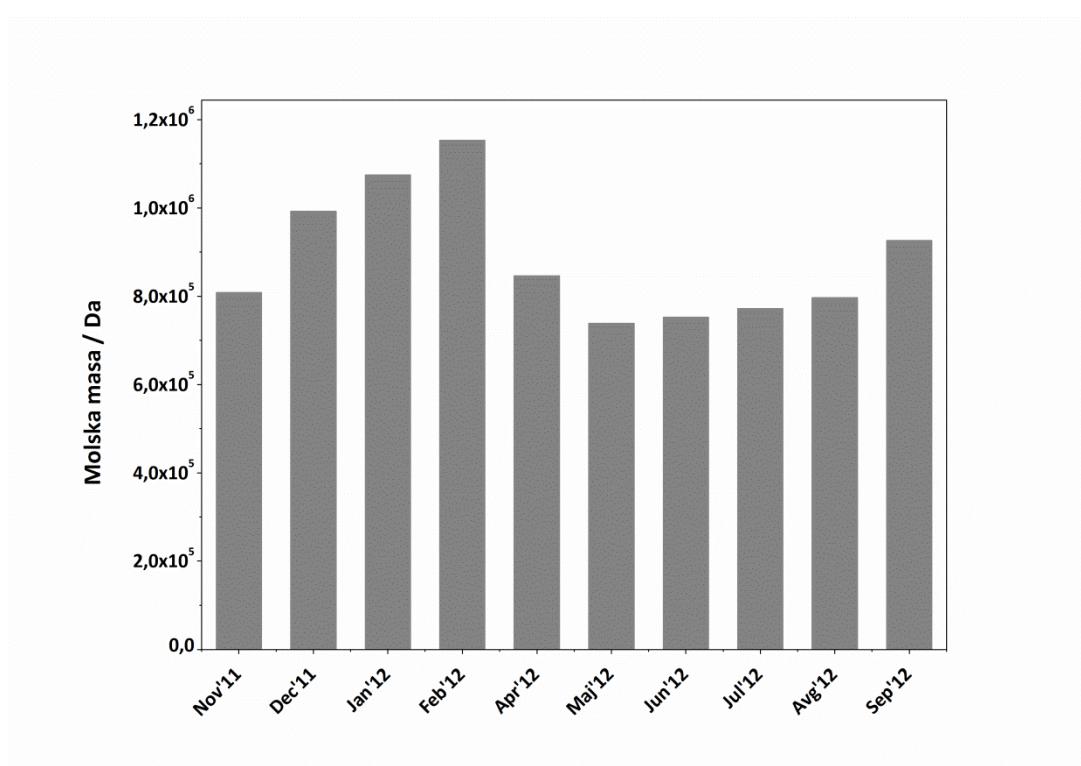
V zimskih mesecih je delež visokomolekularnih spojin 51 % in nižjemolekularnih 49 % (Slika 21). Spomladi prične visokomolekularni del COM počasi naraščati do poletja, ko julija doseže 95 %, nižjemolekularni del COM pa pade na 5 %. Avgusta delež visokomolekularnih spojin hitro pada in se septembra že zniža na 58 %, nižjemolekularni COM pa na 42 %.



Slika 21: Prikaz deležev dveh velikostnih frakcij COM ločenih s pomočjo HP-SEC: molekule z visoko (200 – 4000 kDa) in nižjo molsko maso (5 – 50 kDa)

Figure 21: Proportion of two COM fraction area separated with HP-SEC: molecules with large (200 – 4000 kDa) and lower molecular weights (5 – 50 kDa)

Podrobneje smo spremljali prvi vrh, ki se eluira, in pripada visokomolekularnemu COM. Elucijski čas oz. elucijski volumen vrha se med vzorci spreminja, in sicer se od decembridske COM do julisce COM elucijski čas podaljša (Slika 20) iz 8,427 min na 8,759 min. Molska masa VM COM, ki smo jo izračunali iz kalibracije s pullulani, je pozimi višja ( $\sim 1,0 \times 10^6$  Da) v primerjavi s poletnimi vzorci ( $\sim 7,7 \times 10^5$  Da) (Slika 22).



Slika 22: Sezonske spremembe molskih mas visokomolekularne COM

Figure 22: Seasonal dynamic of molecular weight in high molecular weight COM

#### 4.2 SESTAVA COM V SOČI IN NA IZLIVU REKE SOČE

Na izlivu reke Soče smo vzorčili morsko vodo pri treh različnih slanostih (16, 26 in 33 psu) in v vsaki stopnji filtracije izmerili vsebnost organskega ogljika ( $C_{org}$ ) (Preglednica 3). Vsebnost DOC ( $C_{org}$  v 0,2 µm filtratu) so se višale z višanjem slanosti, in sicer je bil najnižji DOC pri 16 psu ( $66,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) in najvišji pri 33 psu ( $100,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Podobne analogije ni bilo videti pri vsebnosti  $C_{org}$  koloidne organske snovi (5 kDa retentat) in njenem deležu znotraj celokupnega DOC (% COC). % COC je na izlivu reke Soče nihal od 12,8 % in 16,1 %. Vsebnost DOC je v reki Soči nekoliko višja ( $113,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) v primerjavi z DOC na izlivu, delež koloidne organske snovi pa nižji (% COC = 9,2 %). V vzorcu reke Soče smo izmerili tudi  $N_{tot}$  v posameznih frakcijah filtrata. Izkaže se, da je v koloidnem delu raztopljene organske snovi (5 kDa retentat) najnižja vsebnost  $N_{tot}$  ( $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) v primerjavi z 0,2 µm filtratom ( $26,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), s tem je tudi molsko razmerje C/N više v koloidni frakciji (11,3) v primerjavi s celokupno raztopljeno frakcijo (4,3).

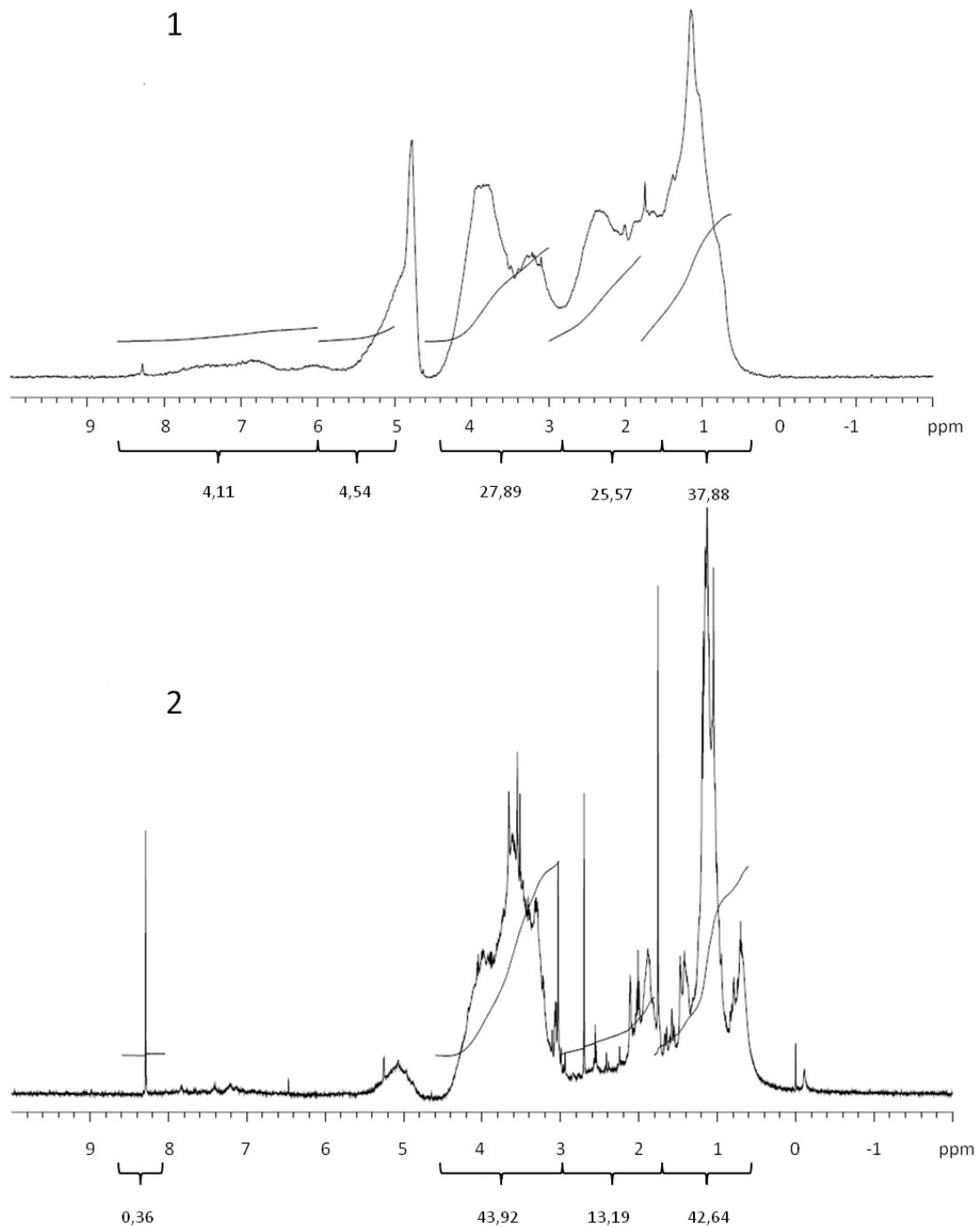
Preglednica 3: Zbrane vsebnosti organskega ogljika ( $C_{org.}$ ), totalnega dušika ( $N_{tot.}$ ) in molskega razmerja C/N (samo v reki Soči) v posamezni frakciji filtracije (0,2 µm filtrat, 5 kDa retentat in permeat) vzorcev iz reke Soče in iz izliva reke Soče pri različnih slanostih (16, 26 in 33 psu). Poleg tega sta podana še delež koloidnega organskega ogljika (% COC) in koncentracijski faktor ultrafiltracije (KF)

Table 3: Concentration values of organic carbon ( $C_{org.}$ ), total nitrogen ( $N_{tot.}$ ) and molar C/N ratio (only in Isonzo river) from different filtration fractions (0,2 µm filtrate, 5 kDa retentate and permeate) of samples from river Isonzo and from river Isonzo mouth at different salinity (16, 26 and 33 psu). The percentage of colloidal organic matter (% COC) and the concentration factor of ultrafiltration (KF) are also shown

Lokacija slanost	Frakcija	$C_{org.}$	$N_{tot.}$	C/N	% COC	KF
		µmol L <sup>-1</sup>	µmol L <sup>-1</sup>	molsko razmerje	%	koncentracijski faktor
Reka Soča	0,2 µm filtrat	113,6	26,2	4,3		
	5 kDa retentat	10,5	0,9	11,3	9,2	69
	5 kDa permeat	130,3	27,3	4,8		
Izliv Soče 16 psu	0,2 µm filtrat	66,3	/	/		
	5 kDa retentat	9,0	/	/	13,6	64
	5 kDa permeat	106,9	/	/		
Izliv Soče 26 psu	0,2 µm filtrat	90,6	/	/		
	5 kDa retentat	14,6	/	/	16,1	60
	5 kDa permeat	83,9	/	/		
Izliv Soče 33 psu	0,2 µm filtrat	100,7	/	/		
	5 kDa retentat	12,9	/	/	12,8	66
	5 kDa permeat	91,4	/	/		

#### 4.2.1 Spektroskopija $^1\text{H}$ NMR

Kot pri sezonski spremembi sestave koloidne organske snovi smo tudi pri karakterizaciji koloidov izoliranih iz izliva reke Soče in iz reke Soče uporabili semi – kvantitativno analizo s pomočjo spektroskopije  $^1\text{H}$  NMR. Integrirana območja  $^1\text{H}$  NMR spektrov so definirana tako kot je opisano v 4.1.2.2, in sicer na štiri dele, ki predstavljajo pomembne biokemijske spojine: lipide, proteine, polisaharide in huminske kisline. Ker so v spektru rečne koloidne organske snovi iz reke Soče (Slika 23) vidne resonance aromatskih protonov v območju 6,0 – 8,5 ppm, smo za huminske kisline upoštevali to območje integracije. Vrednosti integralov posameznih komponent COM so navedeni v Preglednici 4. Sestava COM izliva reke Soče je pri vseh treh slanostih podobna, kar je že razvidno iz primerjave  $^1\text{H}$  NMR spektrov. Drugačno razmerje integralov pa se pokaže v spektru COM iz reke Soče, saj ima v primerjavi z morskim COM nižji delež polisaharidov (32,4 %) in enkrat višji proteinski delež (25,6 %). Najvišji delež rečne COM pa predstavljajo lipidi (37,9 %). Različna sestava rečne v primerjavi z morsko COM se pokaže tudi v primerjavi samih  $^1\text{H}$  NMR spektrov (Slika 20). V spektru rečne COM ni vidnih ostrih vrhov tako kot v spektru morskih koloidov, poleg tega so vidne protonske resonance v predelu, značilnem za resonance aromatskih protonov (6,0 – 8,0 ppm), ki jih v spektrih morskih COM ni opaziti. Integracija tega območja pokaže precej višji delež resonanc aromatskih protonov (4,1 %) v rečni COM v primerjavi s COM izliva reke Soče.



Slika 23: Spektra  $^1\text{H}$  NMR izolirane COM iz reke Soče (1) in izliva reke Soče pri slanosti 26 psu (2)

Figure 23:  $^1\text{H}$  NMR spectra of COM isolated from Isonzo river (1) and from the Isonzo river mouth at salinity 26 psu (2)

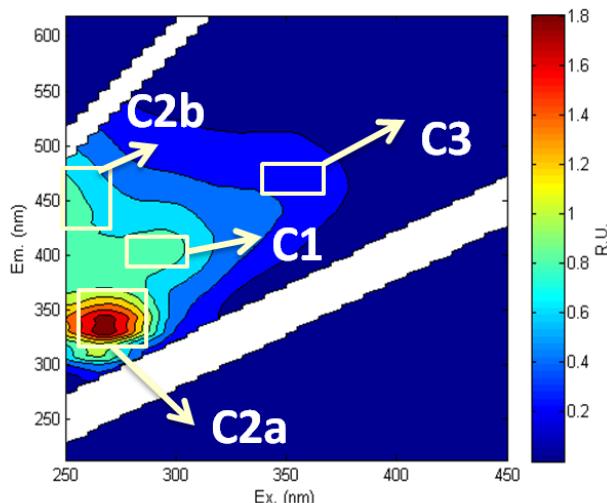
Preglednica 4: Porazdelitev glavnih skupin integriranih protonskih resonanc v  $^1\text{H}$  NMR spektrih vzorcev iz Soče in iz izliva Soče, ki predstavljajo štiri glavne biokemijske skupine spojin v koloidni organski snovi (lipidi, proteini, polisaharidi in huminske kisline)

Table 4: Distribution of the integrated main groups of proton resonance in  $^1\text{H}$  NMR spectra of samples from Isonzo and Isonzo river mouth assigned to four major constituents present in marine colloidal organic matter (lipids, proteins, polysaccharides and humics)

	<b>Lipidi</b>	<b>Proteini</b>	<b>Polisaharidi</b>	<b>Huminske kisline</b>
	<b>HCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-</b>	<b>HC-HCOR</b>	<b>HC-OH HC-O-C</b>	<b>H<sub>Arom.</sub></b>
<b>δ/ppm</b>	<b>0 – 1,8</b>	<b>1,8 – 3,0</b>	<b>3,0 – 5,5</b>	<b>6,0 – 8,5</b>
<b>Reka Soča</b>	37,9	25,6	32,4	4,1
<b>δ/ppm</b>	<b>0 – 1,8</b>	<b>1,8 – 3,0</b>	<b>3,0 – 5,5</b>	<b>8,0 – 9,0</b>
<b>Izliv Soče 16 psu</b>	39,3	13,2	46,9	0,5
<b>Izliv Soče 26 psu</b>	42,6	13,2	43,8	0,4
<b>Izliv Soče 33 psu</b>	41,3	13,8	44,3	0,6

#### 4.2.2 Karakterizacija kromoforne raztopljeni organske snovi

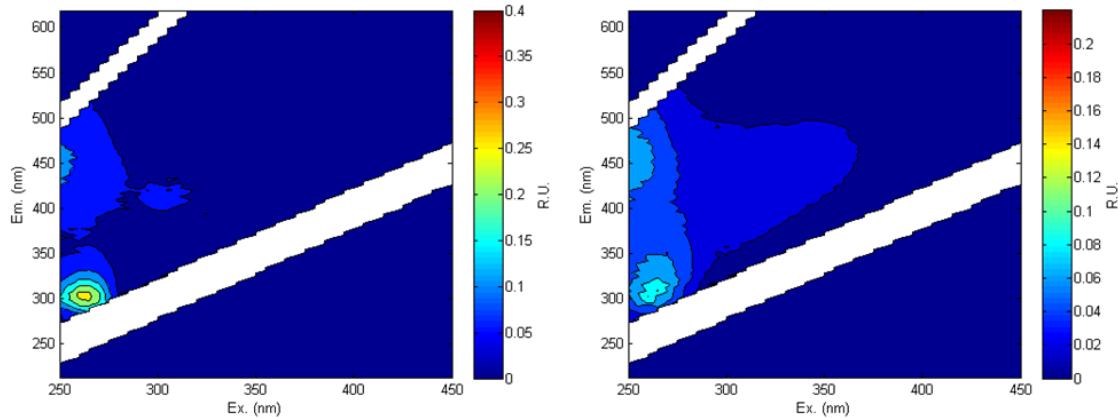
S pomočjo fluorescenčnih lastnosti kromoforne raztopljeni organske snovi (CDOM; *angl. chromophoric dissolved organic matter*) smo lahko podrobnejše karakterizirali sestavo COM na izlivu reke Soče. Z modelom PARAFAC smo določili štiri skupine fluorescenčnih spojin: C1 (spojine podobne morski huminski kislini), C2a (spojine podobne proteinom), C2b (spojine podobne fulvinski kislini) in C3 (spojine podobne rečni huminski kislini) (Slika 24).



Slika 24: Ponazoritev štirih območij v spektru EEM, ki pripadajo štirim različnim fluorescenčnim skupinam spojin, določenih s pomočjo modela PARAFAC (C1, C2a, C2b in C3)

Figure 24: Four areas in EEM spectra which are representing four different fluorescence compounds defined by PARAFAC model (C1, C2a, C2b and C3)

Spektra EEM izolirane COM na izlivu reke Soče pri slanosti 16 in 33 psu sta prikazana na Sliki 25. V spektru EEM s slanostjo 16 psu so jakosti fluorescence, ki so vidne v območju spojin podobnim proteinom (C2a) in spojinam podobnim fulvinski kislini (C2b), višje v primerjavi s spektrom pri višji slanosti. Intenziteta fluorescence pri spektru slanosti 16 psu je v območju C2a kar 3-krat višja v primerjavi s spektrom slanosti 33 psu, v območju C2b pa 2-krat višje. Intenzitete fluorescenc območij C1 in C3 so pri obeh spektrih EEM zelo nizke.



Slika 25: Spektra EEM: COM izliva reke Soče pri slanosti 16 psu (levo) in 33 psu (desno)

Figure 25: EEM spectra: COM from the Isonzo river mouth at salinity 16 psu (left) and 33 psu (right)

#### 4.3 KARAKTERIZACIJA SESTAVE EPS IZOLIRANE IZ FITOPLANKTONSKIH KULTUR

Količina izločenih ekstracelularnih polimernih substanc (EPS) treh fitoplanktonskih kultur, *Tetraselmis marina*, *Chaetoceros socialis* in *Prorocentrum minimum*, se je pri le teh razlikovala. Največ EPS, izmerjene kot vsebnost organskega ogljika ( $C_{org.}$ ), je izločila diatomeja *Chaetoceros socialis* ( $2285 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Preglednica 5), sledi ji nanoflagelat *Tetraselmis marina* ( $915,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), najmanj EPS pa je izločil dinoflagelat *Prorocentrum minimum* ( $439,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Po enakem vrstnem redu si sledijo tudi vsebnosti koloidne frakcije EPS (retentat 5 kDa) in nizkomolekularni frakciji EPS (permeat 5 kDa). Nasprotno se izkaže pri deležu koloidnega organskega ogljika (% COC), pri čemer vsebuje najvišji delež koloidov nanoflagelat (39,8 %), sledi mu dinoflagelat (35,1 %), najnižji delež izločenih koloidov pa vsebuje diatomeja (23,0 %).

Preglednica 5: Vsebnosti organskega ogljika ( $C_{org}$ ) v posamezni frakciji filtracije (0,2  $\mu\text{m}$  filtrat, 5 kDa retentat in 5 kDa permeat ultrafiltracije), delež koloidnega organskega ogljika % COC in koncentracijski faktor ultrafiltracije (KF)

Table 5: Organic carbon contents ( $C_{org}$ ) in each filtration fraction (0,2  $\mu\text{m}$  filtrate, 5 kDa retentate in 5 kDa permeate of ultrafiltration), percentage of colloidal organic carbon (% COC) and the concentration factor of ultrafiltration (KF)

Vrsta fitoplanktona	vzorec	$C_{org}$	% COC	KF
		$\mu\text{mol L}^{-1}$	%	konzentracijski faktor
<i>Tetraselmis marina</i>	0,2 $\mu\text{m}$ filtrat	915,1		
	5 kDa retentat	364,4	39,8	6,6
	5 kDa permeat	506,9		
<i>Chaetoceros socialis</i>	0,2 $\mu\text{m}$ filtrat	2285		
	5 kDa retentat	526,2	23,0	5,3
	5 kDa permeat	1765		
<i>Prorocentrum minimum</i>	0,2 $\mu\text{m}$ filtrat	439,3		
	5 kDa retentat	154,4	35,1	5,0
	5 kDa permeat	418,3		

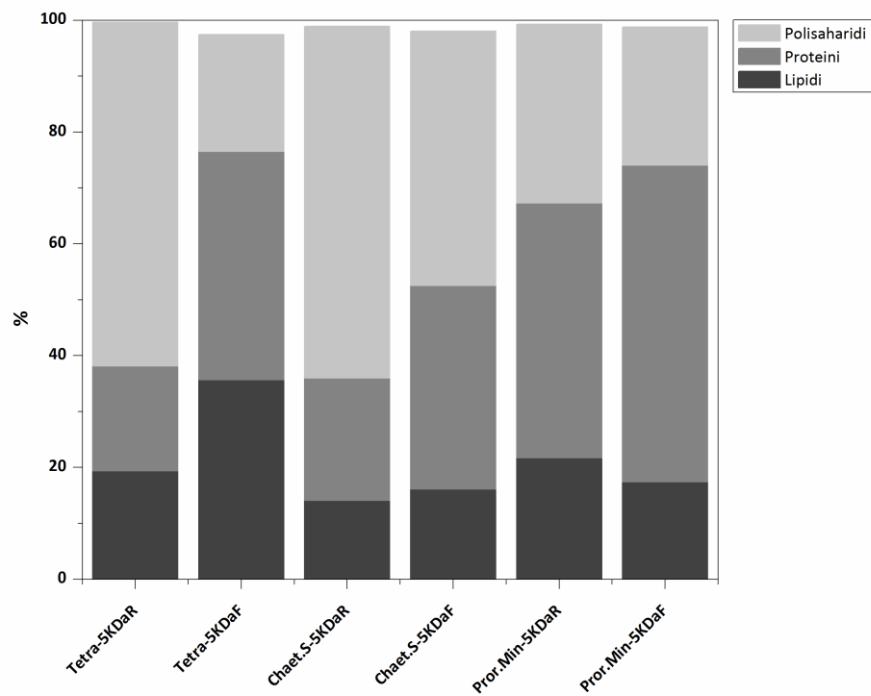
Tudi sestavo koloidne (retentat 5 kDa) in nizkomolekularne (permeat 5 kDa) frakcije EPS, ki so ga izločile tri kulture fitoplanktona, smo karakterizirali s pomočjo spektroskopije  $^1\text{H}$  NMR. Uporabili smo isto metodo kot za karakterizacijo koloidne organske snovi izolirane iz vodnega stolpca, in sicer smo spektre razdelili na štiri dele in jih integrirali. Vrednosti integralov so podane v Preglednici 6 in prikazane na Sliki 26. Deleži treh večjih komponent EPS (lipidi, proteini in polisaharidi) se med retentatom (koloidi) in permeatom (nizkomolekularne spojine) izločenega EPS pri vseh treh kulturah fitoplanktona zelo razlikujejo, kar je razvidno že iz samih spektrov (Slika 27). Največje razlike so opazne pri deležu proteinov in polisaharidov. Pri nanoflagelatu *Tetraselmis marina* predstavljajo v retentatu najvišji delež polisaharidi (61,38 %), sledijo mu lipidi (19,39 %) in proteini (18,82 %). V permeatu EPS nanoflagelata pa je polisaharidni del najnižji (20,79 %),

najvišji delež pa predstavlja proteinski del (40,85 %). Diatomeja *Chaetoceros socialis* ima v retentatu tudi najvišji delež polisaharidov (62,85 %), najnižji pa je delež lipidov (14,14 %). V permeatu EPS diatomeje je delež polisaharidov nižji v primerjavi z retentatom, vendar še vedno najvišji (45,49 %). Sledi delež proteinov (36,41 %) in lipidov (16,14 %). Dinoflagelat *Prorocentrum minimum* se od ostalih dveh razlikuje v sestavi retentata in permeata EPS, kajti v obeh frakcijah prevladuje delež proteinov (45,57 % – retentat, 56,71 % – permeat), najnižji delež pa predstavlja lipidi (21,76 % – retentat, 17,42 % – permeat). V spektrih obeh frakcij EPS je viden vrh tudi v območju resonance aromatskih protonov. Pri vseh treh kulturah fitoplanktona je višji delež aromatskih protonov (huminske kisline) v permeatu EPS (Preglednica 6).

Preglednica 6: Porazdelitev glavnih skupin integriranih protonskih resonanc v spektrih  $^1\text{H}$  NMR retentatov in permeatov izločene EPS iz treh različnih kultur fitoplanktona, ki predstavljajo štiri glavne biokemijske skupine spojin v koloidni organski snovi (lipidi, proteini, polisaharidi in huminske kisline)

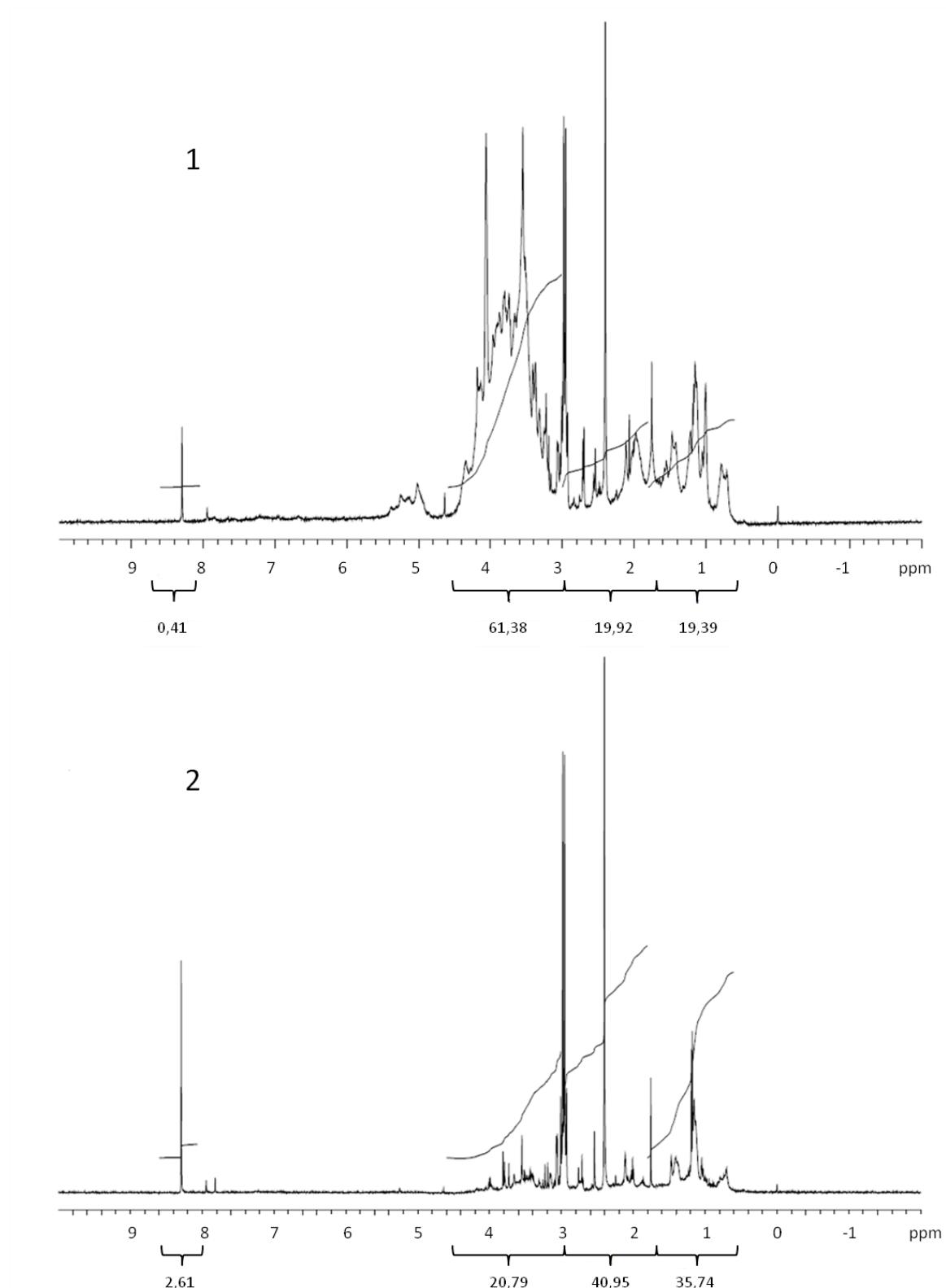
Table 6: Distribution of the integrated main groups of proton resonance in  $^1\text{H}$  NMR spectra of retentates and permeates of EPS produced by three different phytoplankton cultures, assigned to four major constituents present in marine colloidal organic matter (lipids, proteins, polysaccharides and humics)

<b><math>\delta/\text{ppm}</math></b>	<b>Lipidi</b>	<b>Proteini</b>	<b>Polisaharidi</b>	<b>Huminske kisline</b>
	<b>HCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-</b>	<b>HC-HCOR</b>	<b>HC-OH</b> <b>HC-O-C</b>	<b>H<sub>Arom.</sub></b>
<b>0 – 1,8</b>		<b>1,8 – 3,0</b>	<b>3,0 – 5,5</b>	<b>8,0 – 9,0</b>
<i>Tetraselmis marina</i> – <b>5 kDa retentat</b>	19,39	18,82	61,38	0,41
<i>Tetraselmis marina</i> – <b>5 kDa permeat</b>	35,74	40,85	20,79	2,61
<i>Chaetoceros socialis</i> – <b>5 kDa retentat</b>	14,14	21,89	62,85	1,12
<i>Chaetoceros socialis</i> – <b>5 kDa permeat</b>	16,14	36,41	45,49	1,69
<i>Prorocentrum minimum</i> – <b>5 kDa retentat</b>	21,76	45,57	31,91	0,75
<i>Prorocentrum minimum</i> – <b>5 kDa permeat</b>	17,42	56,71	24,64	1,23



Slika 26: Prikaz deležev integralov v spektrih <sup>1</sup>H NMR retentatov in permeatov izločene EPS iz treh kultur fitoplanktona

Figure 26: Integral percentage of <sup>1</sup>H NMR spectra of retentates and permeates of EPS produced by three phytoplankton cultures



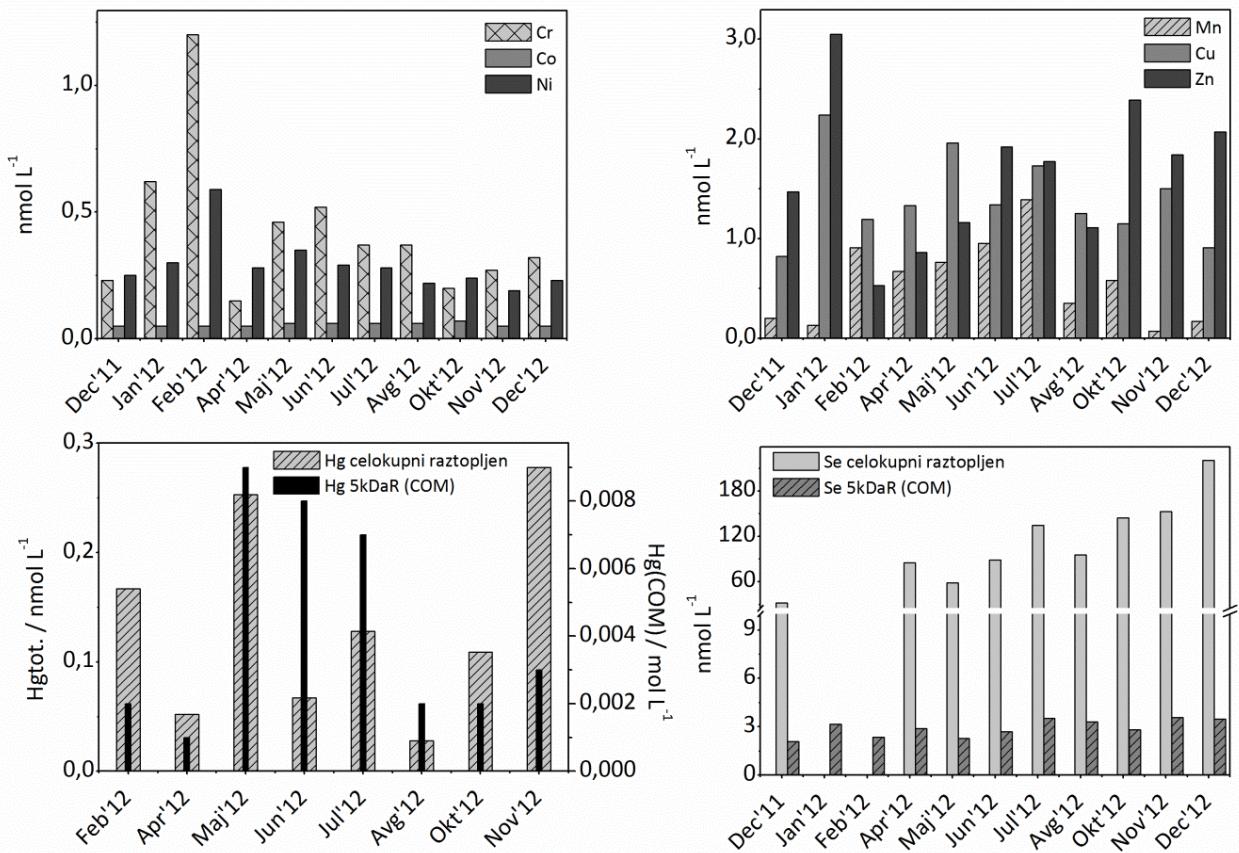
Slika 27: Spektra  $^1\text{H}$  NMR retentata (1) in permeata (2) EPS, ki ga je izločil nanoflagelat *Tetraselmis marina*  
Figure 27:  $^1\text{H}$  NMR spectra of retentate (1) and permeate (2) of EPS produced by nanoflagellate *Tetraselmis marina*

#### 4.4 VSEBNOST RAZTOPLJENIH KOVIN IN POLKOVIN

##### 4.4.1 Sezonske spremembe vsebnosti raztopljenih kovin in polkovin

Izmerili smo vsebnost kovin in polkovin v raztopljeni frakciji, in sicer v filtratu GF/F in v retentatu ultrafiltracije (v koloidni frakciji  $> 5 \text{ kDa}$ ). Za večino kovin in polkovin, V, Co, Ni, Ga, As, Rb, Sr, Cd, Cs, Ba in U, je vsebnost skoraj nespremenjena skozi celo leto (Preglednica 7). Pri ostalih kovinah in polkovinah, Al, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Se in Hg, se njihova vsebnost med letom spreminja tako v raztopljeni kot v koloidni frakciji (Slika 28). Pri nekaterih kovinah, Cr, Mn, Cu in Hg, se med poletjem vsebnosti močno povišajo v primerjavi z zimskimi meseci. Vsebnosti Pb, Ag in Bi so bile pod mejo detekcije.

Najvišjo afiniteto do raztopljenega organskega ogljika sta pokazala Hg (Slika 28) in Cu v koloidni frakciji ( $R^2_{\text{Cu-DOC}} = 0,68$  in  $R^2_{\text{Hg-DOC}} = 0,56$ ). Ravno tako kot DOC, se tudi obe kovini akumulirata do poletja, avgusta pa njuna vsebnost postopoma upada do decembra. Decembra je bila vsebnost koloidnega Hg  $0,001 \text{ nmol L}^{-1}$  in Cu  $0,82 \text{ nmol L}^{-1}$ , meseca junija pa je vsebnost Hg znašala  $0,008 \text{ nmol L}^{-1}$  vsebnost Cu pa  $1,34 \text{ nmol L}^{-1}$ . Vsebnost Hg se v poletnih mesecih poveča do 8-krat, vsebnost Cu pa za skoraj 2-krat.



Slika 28: Sezonske spremembe vsebnosti nekaterih kovin (levo zgoraj: Cr, Co, Ni; desno zgoraj: Mn, Cu, Zn) v koloidni frakciji. Levo spodaj so prikazane sezonske spremembe vsebnosti Hg v raztopljeni (GF/F filtrat) in koloidni (5 kDaR) frakciji. Desno spodaj pa vsebnosti raztopljenega in koloidnega Se

Figure 28: Seasonal dynamics of metal concentration (up left: Cr, Co, Ni; up right: Mn, Cu, Zn) in the colloidal fraction. Left bottom are shown seasonal dynamics of Hg concentration in dissolved (GF/F filtrate) and colloidal (5 kDaR) fraction and DOC concentration (DOC). Right bottom are shown seasonal dynamics of dissolved and colloidal Se

Preglednica 7: Vsebnosti kovin in polkovin v GF/F filtratu in koloidni frakciji raztopljeni organske snovi (5 kDaR)

Table 7: Concentration of metals and metalloids in GF/F filtrate and colloidal fraction of dissolved organic matter (5 kDaR)

<b>nmol L<sup>-1</sup></b>	<b>Al</b>	<b>V</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>
<b>13.12.2011 GFF</b>	99,40	74,71	22,90	12,44	457,3	3,23	10,72	40,84	54,20
<b>27.2.2012 GFF</b>	476,90	72,59	59,18	14,79	574,2	2,82	29,13	115,80	69,97
<b>12.4.2012 GFF</b>	661,74	70,31	95,36	51,17	2637,9	3,77	49,50	144,82	69,96
<b>7.5.2012 GFF</b>	656,24	70,66	42,07	60,19	779,5	4,71	18,70	74,64	156,56
<b>6.6.2012 GFF</b>	710,84	65,33	52,85	79,05	624,2	4,52	24,56	113,72	303,59
<b>5.7.2012 GFF</b>	534,14	66,13	120,07	107,34	2208,1	6,42	41,48	109,30	76,34
<b>2.8.2012 GFF</b>	260,18	73,40	37,57	25,13	763,6	4,04	12,19	129,25	65,66
<b>16.10.2012 GFF</b>	132,40	63,02	42,30	17,15	991,1	3,62	9,71	75,56	30,50
<b>19.11.2012 GFF</b>	999,07	73,18	76,87	18,26	1361,1	4,18	25,70	64,58	127,58
<b>19.12.2012 GFF</b>	26,64	75,68	46,23	10,60	571,1	3,87	14,16	60,01	152,25
<b>13.12.2011 5kDaR</b>	1,23	0,84	0,23	0,20	5,3	0,05	0,25	0,82	1,47
<b>9.1.2012 5kDaR</b>	2,33	0,97	0,62	0,13	11,1	0,05	0,30	0,99	3,05
<b>27.2.2012 5kDaR</b>	4,56	1,03	1,20	0,91	60,9	0,05	0,59	1,19	0,53
<b>12.4.2012 5kDaR</b>	1,51	1,10	0,15	0,67	7,9	0,05	0,28	1,33	0,86
<b>7.5.2012 5kDaR</b>	11,23	1,06	0,46	0,76	24,0	0,06	0,35	1,96	1,16
<b>6.6.2012 5kDaR</b>	1,05	1,03	0,52	0,95	8,8	0,06	0,29	1,34	1,92
<b>5.7.2012 5kDaR</b>	3,80	1,16	0,37	1,39	12,7	0,06	0,28	1,73	1,77
<b>2.8.2012 5kDaR</b>	1,91	1,21	0,37	0,35	10,4	0,06	0,22	1,25	1,11
<b>16.10.2012 5kDaR</b>	1,57	1,02	0,20	0,58	25,2	0,07	0,24	1,15	2,39
<b>19.11.2012 5kDaR</b>	0,83	1,11	0,27	0,07	7,1	0,05	0,19	1,50	1,84
<b>19.12.2012 5kDaR</b>	2,30	1,14	0,32	0,17	13,4	0,05	0,23	0,91	2,07
<b>nmol L<sup>-1</sup></b>	<b>Ga</b>	<b>As</b>	<b>Se</b>	<b>Rb</b>	<b>Sr</b>	<b>Cd</b>	<b>Cs</b>	<b>Ba</b>	<b>U</b>
<b>13.12.2011 GFF</b>	8,01	48,71	31,71	1425,0	69555,9	0,68	2,78	37,36	13,28
<b>27.2.2012 GFF</b>	6,56	45,18	/	976,7	51570,5	0,47	1,63	34,54	10,05
<b>12.4.2012 GFF</b>	5,61	44,96	85,04	1255,7	71499,8	0,71	2,00	27,07	13,32
<b>7.5.2012 GFF</b>	7,15	47,04	58,43	1303,4	67224,0	0,59	2,07	34,79	12,40
<b>6.6.2012 GFF</b>	30,85	45,54	88,66	1246,7	68863,6	2,44	2,12	153,05	12,69
<b>5.7.2012 GFF</b>	6,24	44,42	134,51	1149,4	66076,5	0,34	1,73	31,53	11,88
<b>2.8.2012 GFF</b>	8,04	46,86	95,36	1314,2	73461,0	0,49	2,00	41,93	13,15
<b>16.10.2012 GFF</b>	5,82	45,86	144,43	1336,0	73581,6	0,40	2,02	30,93	13,54
<b>19.11.2012 GFF</b>	6,16	47,49	152,96	1357,7	74181,6	0,35	2,01	31,27	13,45
<b>19.12.2012 GFF</b>	5,95	50,86	220,63	1494,3	79586,0	0,45	2,23	32,13	14,14

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7

nmol L <sup>-1</sup>	Ga	As	Se	Rb	Sr	Cd	Cs	Ba	U	Hg
<b>13.12.2011 5kDaR</b>	0,06	0,57	2,08	20,1	937,6	0,007	0,03	0,36	0,15	0,001
<b>9.1.2012 5kDaR</b>	0,08	0,69	3,15	20,6	1045,7	0,008	0,03	0,42	0,23	0,001
<b>27.2.2012 5kDaR</b>	0,10	0,66	2,34	18,5	1046,1	0,008	0,03	0,52	0,22	0,002
<b>12.4.2012 5kDaR</b>	0,09	0,76	2,89	16,0	1190,9	0,010	0,02	0,52	0,22	0,001
<b>7.5.2012 5kDaR</b>	0,11	0,72	2,27	20,5	1134,0	0,009	0,03	0,65	0,23	0,009
<b>6.6.2012 5kDaR</b>	0,11	0,70	2,70	20,4	1113,3	0,014	0,03	0,63	0,21	0,008
<b>5.7.2012 5kDaR</b>	0,09	0,79	3,52	23,3	1306,0	0,009	0,03	0,54	0,24	0,007
<b>2.8.2012 5kDaR</b>	0,10	0,82	3,32	22,8	1261,5	0,007	0,03	0,61	0,24	0,002
<b>16.10.2012 5kDaR</b>	0,09	0,70	2,82	22,7	1201,2	0,007	0,03	0,53	0,24	0,002
<b>19.11.2012 5kDaR</b>	0,08	0,76	3,59	20,9	1075,6	0,004	0,03	0,47	0,21	0,003
<b>19.12.2012 5kDaR</b>	0,09	0,76	3,49	21,1	1143,4	0,006	0,03	0,52	0,22	0,003

/ znak pomeni, da so vsebnosti analita močno odstopale

V Preglednici 8 so podane vrednosti afinitete kovin in polkovin do koloidne organske snovi podane v molskem razmerju  $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}}$  v letu 2012. Kovinam, katerim se vsebnost med letom bistveno ne spreminja, se afiniteta do COM v poletnih mesecih zniža, ko se  $\text{C}_{\text{org.}}$  v koloidih zviša. Bistveno se zviša afiniteta Hg do COM v poletnih mesecih, in sicer do 5 krat. Zviša se tudi pri Cr, vendar ne tako izrazito. Afinitete Pb, Ag in Bi s COM v Preglednici 8 niso navedene, ker so vsebnosti kovin pod mejo detekcije.

Preglednica 8: Sezonske spremembe molskih razmerij  $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}} \times 10^{-5}$  v koloidni frakciji DOM ( $>5$  kDaR)

Table 8: Seasonal dynamic of molar ratio  $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}} \times 10^{-5}$  in colloidal fraction of DOM ( $>5$  kDaR)

	<b>Al</b>	<b>V</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	
<b>13.12.2011-5kDaR</b>	9,10	6,18	1,72	1,45	39,2	0,33	1,83	6,06	10,85	
<b>9.1.2012-5kDaR</b>	15,87	6,61	4,22	0,80	66,9	0,29	1,81	13,46	18,39	
<b>27.2.2012-5kDaR</b>	31,11	7,06	1,59	5,81	108,1	0,33	3,78	7,64	6,83	
<b>12.4.2012-5kDaR</b>	9,56	6,98	0,98	4,25	50,5	0,32	1,81	8,50	5,51	
<b>7.5.2012-5kDaR</b>	72,71	6,85	2,96	3,72	116,8	0,27	1,71	9,52	5,65	
<b>6.6.2012-5kDaR</b>	7,09	6,95	3,53	3,81	35,1	0,22	1,16	5,34	7,70	
<b>5.7.2012-5kDaR</b>	23,14	7,08	2,24	5,30	48,5	0,24	1,05	6,61	6,73	
<b>2.8.2012-5kDaR</b>	11,84	7,48	2,31	1,39	40,6	0,25	0,85	4,91	4,35	
<b>16.10.2012-5kDaR</b>	9,66	6,30	28,57	2,21	96,1	0,28	8,23	4,40	9,09	
	<b>Ga</b>	<b>As</b>	<b>Se</b>	<b>Rb</b>	<b>Sr</b>	<b>Cd</b>	<b>Cs</b>	<b>Ba</b>	<b>U</b>	<b>Hg</b>
<b>13.12.2011-5kDaR</b>	0,46	4,24	15,34	147,9	6918,1	0,05	0,23	2,69	1,14	0,01
<b>9.1.2012-5kDaR</b>	0,46	4,14	19,00	123,9	6297,6	0,05	0,19	2,53	1,37	0,01
<b>27.2.2012-5kDaR</b>	0,63	4,25	14,94	118,4	6682,1	0,05	0,17	3,32	1,37	0,01
<b>12.4.2012-5kDaR</b>	0,61	4,82	18,41	101,8	7588,9	0,07	0,14	3,30	1,40	0,01
<b>7.5.2012-5kDaR</b>	0,55	3,51	11,06	99,7	5519,6	0,04	0,14	3,18	1,13	0,05
<b>6.6.2012-5kDaR</b>	0,44	2,82	10,80	81,5	4456,3	0,06	0,12	2,53	0,84	0,05
<b>5.7.2012-5kDaR</b>	0,34	3,01	13,41	88,7	4978,5	0,03	0,13	2,06	0,92	0,04
<b>2.8.2012-5kDaR</b>	0,41	3,21	13,03	89,3	4951,2	0,03	0,13	2,39	0,93	0,01
<b>16.10.2012-5kDaR</b>	0,34	2,66	10,72	86,3	4574,8	0,03	0,13	2,03	0,92	0,01

#### 4.4.2 Vsebnost kovin in polkovin v reki Soči in na izlivu reke Soče

V reki Soči in v njenem izlivu smo spremljani vsebnosti kovin in polkovin v slanostnem gradientu (0,2, 16, 26 in 33 psu) v koloidni frakciji (Preglednica 9). Večini kovin in polkovin, V, Mn, As, Se, Rb, Sr, Ag, Cd, Cs, Tl, Bi, U in Hg, vsebnost s slanostjo narašča, kar se odraža z visoko pozitivno korelacijo. V manjšini pa so kovine, ki imajo negativno korelacijo s slanostjo, in sicer so to Al, Cu, Ga in Ba. Določene kovine, Cr, Fe, Ni, Zn in Pb, pa ne korelirajo s slanostjo.

Preglednica 9: Primerjava vsebnosti kovin in polkovin ( $\text{nmol L}^{-1}$ ) v slanostnem gradientu: reka Soča – izliv reke Soče. Navedene so tudi korelacije med vsebnostjo kovin/polkovin in slanostjo (pozitivna korelacija (+), negativna korelacija (-))

Table 9: Comparing metal and metalloid concentrations ( $\text{nmol L}^{-1}$ ) through the salinity gradient: Isonzo river – Isonzo river mouth. Here are shown also correlations between metal/metalloid concentration and salinity (positive correlation (+), negative correlation (-))

$\text{nmol L}^{-1}$	Slanost/ psu	Al	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
Izliv Soče 33 - 5kDaR	33	18,6	1,023	0,632	1,554	12,8	0,067	0,751	0,821	6,911
Izliv Soče 26 - 5kDaR	26	7,7	0,856	0,459	1,930	13,1	0,046	0,479	1,742	2,354
Izliv Soče 16 - 5kDaR	16	23,9	0,430	0,331	1,986	5,8	0,033	0,329	0,946	<
Reka Soča - 5kDaR	0,2	28,9	0,128	0,509	0,566	18,2	0,025	0,784	2,560	2,630
korelacija s slanosjo $R^2$ (- neg., + poz.)		-0,54	0,97	0,13	0,50	0,13	0,85	0,02	-0,57	0,28
$\text{nmol L}^{-1}$	Slanost/ psu	Ga	As	Se	Rb	Sr	Ag	Cd	Cs	Ba
Izliv Soče 33 - 5kDaR	33	0,169	0,643	1,873	18,5	911,3	0,153	0,053	0,059	1,612
Izliv Soče 26 - 5kDaR	26	0,178	0,552	1,005	17,9	797,5	0,013	0,026	0,037	2,082
Izliv Soče 16 - 5kDaR	16	0,278	0,279	0,366	8,2	397,6	0,002	0,014	0,015	3,349
Reka Soča - 5kDaR	0,2	0,834	0,058	<	0,06	8,8	0,002	0,001	0,001	6,268
korelacija s slanosjo $R^2$ (- neg., + poz.)		-0,87	0,98	0,88	0,96	0,99	0,50	0,87	0,92	-0,97
$\text{nmol L}^{-1}$	Slanost/ psu	Tl	Pb	Bi	U	Hg				
Izliv Soče 33 - 5kDaR	33	0,015	0,042	0,012	0,210	0,003				
Izliv Soče 26 - 5kDaR	26	0,006	0,021	0,005	0,208	0,004				
Izliv Soče 16 - 5kDaR	16	0,002	0,009	0,001	0,107	0,002				
Reka Soča - 5kDaR	0,2	0,001	0,022	0,000	0,011	0,001				
korelacija s slanosjo $R^2$ (- neg., + poz.)		0,76	0,29	0,74	0,96	0,63				

< znak pomeni, da so bile vsebnosti analita pod mejo detekcije

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 KARAKTERIZACIJA KOLOIDNE ORGANSKE SNOVI (COM)

#### 5.1.1 Sezonske spremembe koncentracije, vsebnosti in izvora koloidne organske snovi (COM)

V Tržaškem zalivu, ki velja za polzaprt sistem, se vsebnost raztopljene organske snovi snovi (DOM) med letom zelo spreminja. Vsebnost raztopljenega organskega ogljika (DOC) je pozno pomladi/začetek poletja skoraj dvakrat višja v primerjavi z zimskimi meseci. Podobno dinamiko, kjer se DOC koncentrira do poletja, so opazili že v preteklih raziskavah (Faganeli in Herndl, 1991; De Vittor in sod., 2008). Akumulacija DOC v poletnem obdobju naj bi bila posledica cvetenja mikroalg spomladi, pri čemer pa se povisana bakterijska produkcija pojavi šele pozno poleti (Fonda Umani in sod., 2007; Tinta in sod., 2014). Faktorjev, ki pogojujejo akumulacijo DOM, je več: omejena vsebnost hranil, struktura mikrobne združbe, tlak (globoko v oceanih) in temperatura (Carlson in Hansell, 2015). Našteti faktorji vplivajo na to, kdaj in kje bo refraktorna DOM postala biološko dostopna.

Tudi koloidna organska snov (COM), ki je del DOC, se akumulira v poletnih mesecih in doseže najvišje vsebnosti ogljika ( $C_{org.}$ ) v juliju leta 2012 ( $26,5 \pm 2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), kar je v primerjavi z decembrom ( $13,6 \pm 2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) kar dvakrat višje. Akumulacija COM se je začela aprila in nadaljevala vse do septembra, ko se % COC dvakrat zviša iz 16,3 na 32,4 %. Delež koloidnega organskega ogljika (% COC) je v povprečju  $23,5 \pm 5,7 \%$  glede na celokupni DOC. Rezultat je primerljiv s preteklimi raziskavami, kjer so ocenili, da je delež koloidne organske snovi v povprečju  $\frac{1}{4}$  celokupne raztopljene organske snovi (DOM) (Mopper in sod., 2007). Z višanjem deleža koloidnega organskega ogljika v vodnem stolpcu se COM akumulira ravno v poletnem obdobju, kar lahko privede do tvorbe mikro- in makrogelov ter nenazadnje tudi do makroagregatov, ki so se v preteklosti periodično pojavljali v severnem Jadranskem morju (Klun in sod., 2015; Kovač in sod., 2002, 2004).

Kot že omenjeno, je lahko razlogov za akumulacijo COM in nenazadnje tudi DOM v poletnem času več. Eden od razlogov je lahko nepopolna (Azam in sod., 1994) in počasna (Ogawa in sod., 2001) razgradnja makromolekul z encimsko hidrolizo mikrobov. Posebno visokomolekularni heteropolisaharidi, ki vsebujejo dušik, in lipidi so težje razgradljivi v primerjavi s koloidnimi proteini in nizkomolekularnimi polisaharidi, ki pa veljajo za lažje razgradljive v morskem okolju (Faganeli in sod., 2010; Turk in sod., 2010). Podobne časovne spremembe so opazili tudi v vodnem stolpcu v Tražškem zalivu pri celokupnih raztopljenih ogljikovih hidratih in posebno pri raztopljenih polisaharidih, ki veljajo za prekurzor nastanka makroagregatov (Penna in sod., 2009).

Drugače se obnaša dušik v koloidni frakciji, saj je vsebnost dušika skozi leto dokaj konstantna, le v poletnih mesecih smo opazili hiter padec vsebnosti dušika. Junija, ko se  $C_{org.}$  približuje najvišjim vrednostim, so bile vrednosti  $N_{tot.}$  najnižje ( $1,1 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; letno povprečje je  $3,5 \pm 1,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ). To nam pokaže tudi molsko razmerje  $C_{org.}/N_{tot.}$ , ki je junija najvišje (28,5). Molsko razmerje  $C_{org.}/N_{tot.}$  je višje v dializiranih vzorcih koloidne frakcije (povprečje 17,1,  $n = 10$ ) v primerjavi z nedializiranimi (povprečje 7,5,  $n = 9$ ). Razlog za to je lahko v izgubi molekul z nizko molsko maso, ki vsebujejo dušik (npr. urea, aminokisline), ali anorganskih dušikovih ionov (npr. hranila:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  in  $\text{NO}_2^-$ ) med dializo. To se pokaže tudi v pozitivni korelaciji ( $R^2 = 0,91$ ,  $n = 9$ ) med  $C_{org.}/N_{tot.}$  v dializiranih in nedializiranih vzorcih, kar kaže na proporcionalno izgubo molekul, ki vsebujejo dušik, med dializo. Molsko razmerje  $C_{org.}/N_{tot.}$  je primerljivo z razmerjem morskih makroagregatov ( $C_{org.}/N_{tot.} = 8,5 - 16,7$ ) (Kovač in sod. 2004) in suspendirane organske snovi (POM) ( $C_{org.}/N_{tot.} = 8,5$ ) (Faganeli in sod., 1988), razlikuje se pa od razmerja  $C_{org.}/N_{tot.}$  zooplanktona (4,2) (Faganeli in sod., 1988) in meduz (4,1 – 4,7) (Kogovšek in sod., 2014), ki vsebujejo visok delež proteinov in imajo zato nižje razmerje.

Vrednosti razmerja stabilnega izotopa ogljika  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  v COM so se med letom spremajale (pozimi – 21 ‰, spomladi in poleti – 24 do – 26 ‰). Vrednosti razmerja stabilnega izotopa dušika  $\delta^{15}\text{N}$  v COM smo uspeli detektirati le v zimskem obdobju, ki pa so precej nihale (od – 3,5 do + 0,7 ‰). Za ločevanje med morskim in kopnenskim izvorom DOM se pogosto uporablja razmerja  $\text{C}_{\text{org.}}/\text{N}_{\text{tot.}}$  in vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  (Opsahl in sod., 1999). Glede na to, da so vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  v COM (vzorčili pri slanosti 37–38 psu) spomladi in poleti zelo nizke, kaže na to, da poleg mešanja morske in sladke vode potekajo še durgi procesi, ki vplivajo na distribucijo  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  v COM. Eden izmed procesov je lahko vpliv produkcije alg v območjih, ki so obogatena s  $\text{CO}_2$  (Fogel in Cifuentes, 1993). Poleg tega so lahko nižje vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  pri dnu zaradi bolj razgrajene in frakcionirane frakcije COM, ki je obogatena z ogljikom in ima v našem primeru tudi visoke vrednosti molskega razmerja  $\text{C}_{\text{org.}}/\text{N}_{\text{tot.}}$ , in so zato vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  nižje (Benner in sod., 1987). Prav tako so v ultrafiltrirani raztopljeni organski snovi, izolirani iz srednjatlantskega območja (*angl. Mid-Atlantic Bight*), opazili tudi nizke vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  (od – 28,2 do – 21,8 ‰) (Guo in sod., 1996). Za primerjavo poletne vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  za suspendirano organsko snov (POM) kažejo na avtohtonji, torej morski izvor (Faganelli in sod., 2009). Na razmerje stabilnih izotopov ogljika vpliva tudi kemijska sestava organske snovi. Lipidi imajo večinoma nižje vsebnosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  za relativno 5–8 ‰ glede na celokupno organsko snov (Hoefs, 2009). Prav tako so v koloidni frakciji določili za lipide nizke vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  (– 28,2 ‰) (Loh in sod., 2004), kar nakazuje, da je lahko razlog za nizke vrednosti  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org.}}$  v poletnem obdobju povečanje vsebnosti lipidov v COM v Tržaškem zalivu, kar smo opazili pri sestavi COM in povišanem razmerju  $\text{C}_{\text{org.}}/\text{N}_{\text{tot.}}$ .

Tudi razmerje stabilnih izotopov dušika ( $\delta^{15}\text{N}$ ) je v COM nizko in primerljivo z vrednostmi neproteinskih dušikovih spojinah kot je N-acetilglukozamin (Smucker in Dawson, 1986). Do osiromašenja s težkim izotopom  $^{15}\text{N}$  naj bi prišlo zaradi encimske transaminacije (Fogel in Cifuentes, 1993; Sachs in sod., 1999). Tako COM sestavljajo spojine, ki vsebujejo dušik, vendar ne proteini, kar je podobno kot pri makroagregatih (Faganelli in sod., 2009).

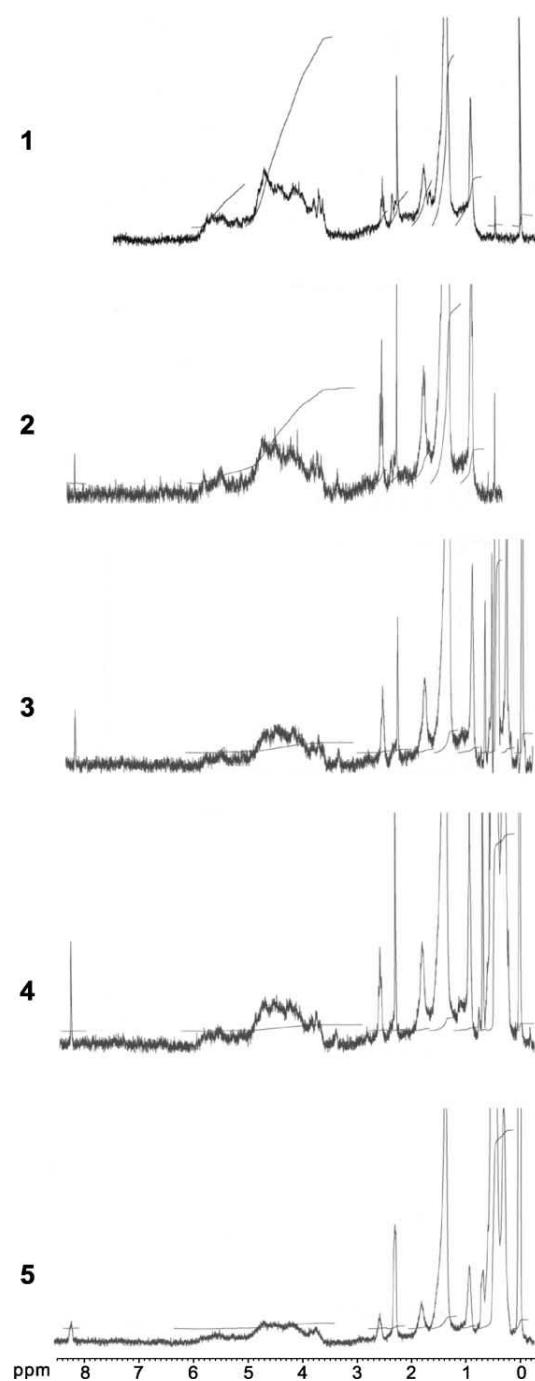
### 5.1.2 Sezonske spremembe sestave koloidne organske snovi (COM)

S pomočjo FTIR in  $^1\text{H}$  NMR smo spremljali spremembe v sestavi koloidne organske snovi (COM). Ti dve metodi sta znani za karakterizacijo sestave in strukture tako DOM, COM kot tudi makroagregatov (Mopper in sod., 2007). Za podrobnejši vpogled v sestavo COM bi morali uporabiti še spektroskopijo  $^{13}\text{C}$  NMR in dvodimenzionalno spektroskopijo NMR (HSQC (*angl. Heteronuclear single quantum correlation*) in HMBC (*angl. Heteronuclear multiple bond correlation*)), za kar bi potrebovali vsaj 10 000 L morske vode, kar pa v našem primeru žal ni bilo možno.

V spektrih FTIR so vidni vrhovi, značilni za funkcionalne skupine pomembnih biokemičnih spojin, prisotnih v morskem okolju: lipidi (metilne in metilenske skupine), proteini (aminska in amidna skupina) in polisaharidi (hidroksilna in etrska skupina). Prisotnost lipidov iz spektrov ni jasno vidna, ker je zaradi visoke higroskopičnosti vzorcev vrh pri  $2900 \text{ cm}^{-1}$  prekrit z nihanjem hidroksilne skupine vode, je pa bolj izrazit v spektru makroagregatov, ker je v vzorcu manj soli, ki bi vezala vodo. Spektri dializirane in nedializirane COM so si zelo podobni, saj se glavni vrhovi absorpcije prekrivajo. Bolj pomembno pa je, da se prekrivajo vrhovi COM z vrhovi makroagregatov iz leta 1997, 2000 in 2004 (Kovač in sod., 2002; 2004; Faganeli in sod., 2010), glede na to, da je COM prekurzor za nastanek makroagregatov (Chin in sod., 1998). Vidnih sezonskih sprememb v spektrih FTIR koloidne organske snovi nismo opazili.

S spektroskopijo  $^1\text{H}$  NMR smo lahko spremljali sezonske spremembe znotraj COM. Z integracijo posameznih območij, ki predstavljajo določene biokemijske komponente COM (lipidi, proteini, polisaharidi in huminske snovi), smo lahko semi-kvantitativno karakterizirali sezonske variacije sestave COM.

Od zimskega do poletnega obdobja, ko se COM akumulira, se lipidni del poveča relativno za 25 %, medtem ko se proteinski del zmanjša relativno za 40 % in polisaharidni del za 5 %. To je lahko razlog za akumulacijo COM, ki postaja proti poletju težje razgradljiva zaradi višje vsebnosti lipidov, kar se pokaže tudi v visokem molskem razmerju  $C_{\text{org.}}/N_{\text{tot.}}$ . Proteinski delež se do poletja skoraj razpolovi, kar kaže na porabo visokomolekularnih proteinov poleti, ko se bakterijska abundanca zviša in s tem tudi bakterijska produkcija (Tinta in sod., 2014). Kljub temu, da huminske spojine predstavljajo najmanjšo frakcijo COM (< 1%), lahko opazimo sezonske spremembe tudi te komponente. Najnižji delež je v zimskih in poletnih mesecih, spomladi in jeseni pa se vrednosti podvojijo, kar je lahko posledica vpliva rečnih vnosov. V samih spektrih je moč videti postopno večanje vrha pri kemijskih premikih pod 0,8 ppm od januarja do julija, ki pripada organosilicijevim spojinam. Spektri  $^1\text{H}$  NMR makroagregatov, podobno kot pri spektrih COM, pokažejo ravno tako najvišji delež lipidov in polisaharidov ter najnižji delež proteinov (Kovač in sod., 2002) (Slika 29). Pri makroagregatih predstavljajo organosilicijeve spojine, ki izvirajo iz diatomej in silicija, vezanega na agregirano organsko snov, večji delež organske snovi v primerjavi s COM (Kovač in sod., 2002). V  $^1\text{H}$  NMR spektrih makroagregatov so zelo slabo vidne resonance aromatskih protonov, kar je lahko delno posledica uporabe različnih topil za snemanje spektrov.



Slika 29: Spektri  $^1\text{H}$  NMR makroagregatov iz Tržaškega zaliva, vzorčenih leta 1997 in 2000 (povzeto po Kovač in sod., 2002)

Figure 29:  $^1\text{H}$  NMR spectra of macroaggregates from the Gulf of Trieste collected in 1997 and 2000 (from Kovač et al., 2002)

Z izključitveno kromatografijo smo dobili vpogled v sezonske spremembe velikosti oz. molske mase koloidne organske snovi. Koloidno organsko snov smo ločili v dve frakciji, katere delež se je zelo spremenjal med letom. Deleža visokomolekularnega (VM COM > 200 kDa) in nižjemolekularnega ( $5 < \text{NM COM} < 50$  kDa) COM sta pozimi skoraj enaka (VM COM: 51 %, NM COM: 49%). Do poletja se delež visokomolekularnega COM postopno viša, ko julija doseže najvišji delež (95 %), nižjemolekularni COM pa najnižji delež (5 %), kar pomeni, da se celotna COM prične agregirati in tvori mikrogele v začetku poletja. Tudi molska masa VM COM se med letom spreminja, in sicer je v zimskih mesecih molska masa višja ( $\sim 1,0 \times 10^6$  Da) v primerjavi s poletnimi ( $\sim 7,7 \times 10^5$  Da). To pomeni, da pride pri koncentriranju VM COM do samozdruževanja molekul z višjimi molskimi masami (Verdugo in Santschi, 2010). Nastanek mikro- in makrogelov je lahko posledica šibkih interakcij med molekulami, kot so elektrostatske, vodikove in van der Waalsove vezi ter tudi možne hidrofobne interakcije (Verdugo in Santschi, 2010). Pri navzkrižnem povezovanju molekul igrajo pomembno vlogo kovine, kot sta  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  (Chin in sod., 1998). Povezovanje NM COM v VM COM je vidno tudi v spektrih  $^1\text{H}$  NMR. V območju resonanc polisaharidnih protonov (3,0 – 4,5 ppm) je vedno prisoten širok vrh, iz katerega štrlijo ožji in bolj ostri vrhovi, ki predstavljajo nizkomolekularni COM. Agregacijo NM COM se tako opazi pri ozkih vrhovih v območju polisaharidov, ki se od zime proti poletju postopoma zmanjšujejo.

### 5.1.3 Primerjava rečne in morske koloidne organske snovi (COM)

Za primerjavo rečne in morske koloidne organske snovi smo uporabili spektroskopijo  $^1\text{H}$  NMR, vsebnosti DOC in COC in razmerja  $\text{C}_{\text{org}}/\text{N}_{\text{tot}}$  ter fluorescenčne lastnosti CDOM, ki smo jih pridobili iz spektrov EEM.

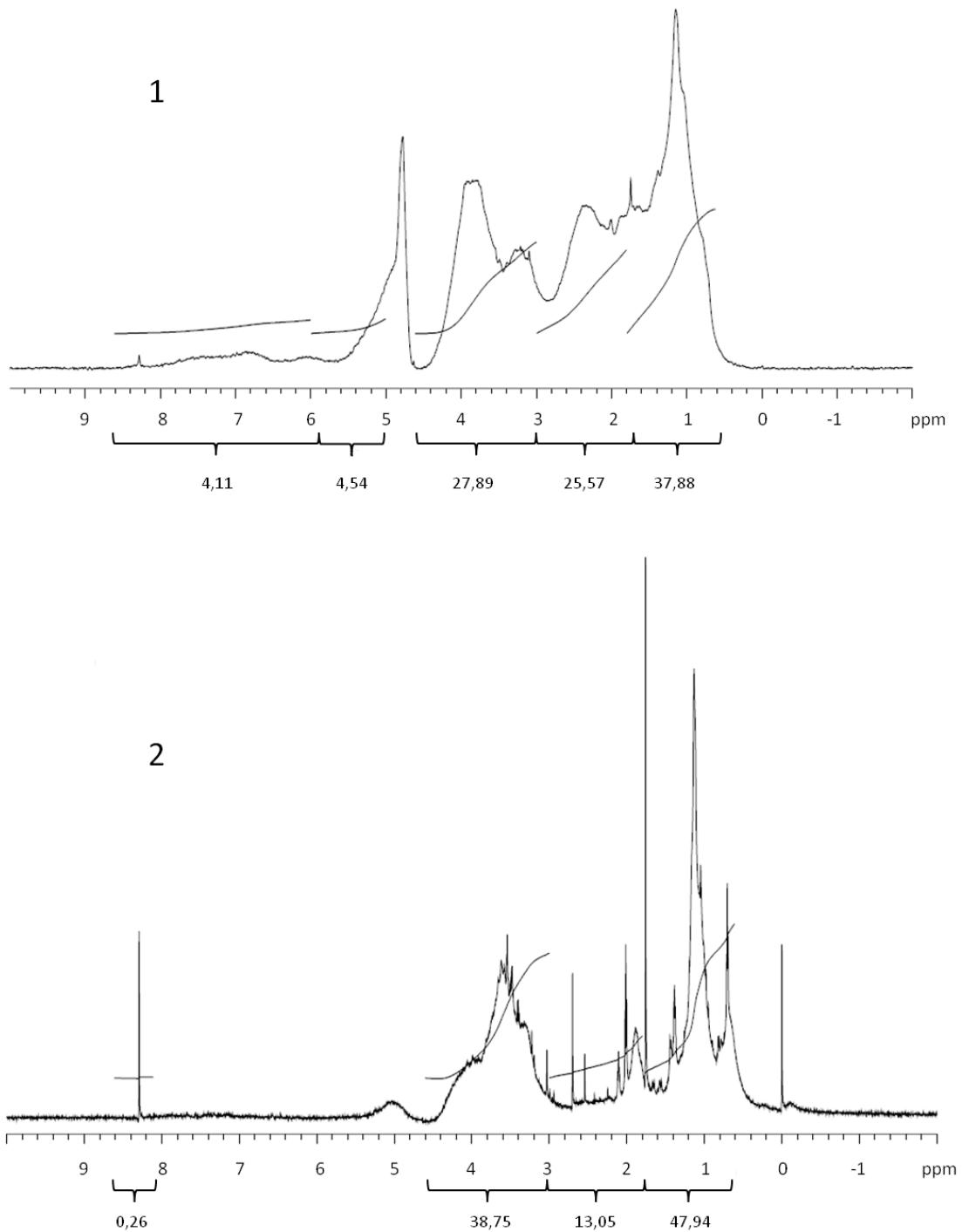
Vsebnosti DOC preko slanostnega gradienta na izlivu reke Soče so pozitivno korelirale s slanostjo, kar sugerira na redčenje morske vode z rečno, saj je pri slanosti 16 psu znašala vsebnost DOC  $66,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  in pri 33 psu  $100,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Rečno DOM smo vzorčili v deževnem obdobju pri visokih pretokih, kar je lahko razlog za višjo vsebnost DOC ( $113,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) glede na vsebnosti ob mešanju rečne in morske vode v poletnem obdobju pri zelo nizkih pretokih. Pri višjih pretokih reka odnaša zemljo obrežja, ki je bogata z organsko snovjo, kar se izkaže v višji vsebnosti DOC v primerjavi z obdobji nizkih pretokov.

Primerjali smo spektre  $^1\text{H}$  NMR med koloidno organsko snovjo, izolirano iz morja, reke in izliva reke. Zanimivo je, da so si spektri COM v slanostnem gradientu na izlivu reke Soče in spektri morske COM (vzorčeno ob oceanografski boji Vida) med seboj zelo podobni. Tudi deleži integriranih območij pomembnih biokemijskih komponent so si med COM izliva reke in morskimi COM primerljivi. Drugačna pa je sestava rečne COM v primerjavi s COM izliva in morsko COM, kar je razvidno iz spektrov  $^1\text{H}$  NMR in deležev integralov (Slika 30). Sestava morske COM se med letom spreminja, in sicer v zimskem obdobju prevladujejo polisaharidi, v poletnem pa lipidi. V primeru rečne COM prevladujejo lipidi (37,9 %) in polisaharidi (32,4 %). Proteinski del rečne COM je precej višji (25,6 %) od morske COM (povprečno 14,4 %,  $n = 9$ ), vendar ne moremo opredili tega območja protonske resonance za izključno proteinsko, glede na to, da je molsko razmerje  $\text{C}_{\text{org}}/\text{N}_{\text{tot}}$  rečne COM (11,3) precej višje v primerjavi z morsko (7,5). V območju  $2,0 - 3,1 \text{ ppm}$  so lahko resonance protonov substituiranih alifatskih spojin, torej vsebujejo funkcionalne skupine, kot so karbonili, estri in amidi (Gueguen in sod., 2012). V območju resonance aromatskih protonov je opazna velika razlika med rečno in morsko COM. V spektru  $^1\text{H}$  NMR morske COM je viden samo manjši oster vrh pri  $8,4 \text{ ppm}$ , medtem ko je v spektru

rečne COM območje resonance aromatskih protonov precej širše (6,0 – 9,0 ppm), s tem pa je tudi delež aromatskih protonov do 10-krat višji v primerjavi z morskim. Spektri  $^1\text{H}$  NMR rečne COM so primerljivi s spektri iz drugih nekontaminiranih rek po svetu (Lam in Simpson, 2008; Gueguen in sod., 2012).

Delež rečne koloidne organske snovi je v primerjavi z morsko nižji (9,2 %), vendar je iz spektrov  $^1\text{H}$  NMR razvidno, da so molske mase rečnega COM višje (COM je bolj agregirana) v primerjavi z morsko. To se kaže v širokih vrhovih rečne COM (Lam in Simpson, 2009), medtem ko so v spektrih morske COM prisotni izraziti ozki vrhovi oligomerov (Slika 30).

Podobnost med spektri COM izliva in morsko COM, skupaj s pozitvno korelacijo vsebnosti DOC in slanostjo, nakazuje, da rečna koloidna organska snov ob stiku z morsko vodo in posledično ob večanju ionske moči prične flokulirati (preide v suspendirano organsko snov) in postopno tone proti dnu (Guo in sod., 2000).



Slika 30: Primerjava spektrov  $^1\text{H}$  NMR rečne COM (1) in morske COM (2)

Figure 30: Comparison of  $^1\text{H}$  NMR spectra of riverine COM (1) and marine COM (2)

V vseh naravnih vodah je del raztopljeni organske snovi obarvan oz. kromoforen, zato se ta frakcija imenuje kromoforma raztopljeni organska snov (CDOM, *angl. Chromophoric dissolved organic matter*). Pri visokih vsebnosti CDOM (reke, jezera) je voda obarvana rumeno. CDOM absorbira svetlobo v območju UV-Vis, pri čemer je narava absorpcije odvisna od elektronskih prehodov (pri kateri valovni dolžini bo prišlo do elektronskih prehodov). Za CDOM se upošteva spojine, ki vsebujejo od ene dvojne vezi (absorpcija pri nizkih valovnih dolžinah) pa vse do konjugiranih dvojnih vezi (absorpcija pri visokih valovnih dolžinah). Del CDOM emitira del absorbirane svetlobe tudi v obliki fluorescence. S pomočjo tridimenzionalnih spektrov EEM (vzbujevalno emisijske matrice) smo spremljali fluorescenčne lastnosti COM na izlivu reke Soče. Z modelom PARAFAC smo lahko opredelili, katere vrste spojin fluorescirajo v CDOM. Kljub temu, da v spektrih  $^1\text{H}$  NMR ni vidnih večjih razlik med COM pri različnih slanostih, se v spektrih EEM opazi razliko v jakosti fluorescence. Fluoresanca naj bi pripadala spojinam, podobnim proteinom in fulvinski kislini. Jakosti fluorescence v spektru EEM pri slanosti 16 psu so trikrat večje v primerjavi s spektrom EEM pri 33 psu. Posneli smo tudi spekter EEM čisto morske COM, kjer pa so bile intenzitete še nižje v primerjavi s spektri COM pri slanosti 33 psu. Polisaharidi niso v spektrih EEM, ker ne vsebujejo dvojnih vezi (če že zelo malo posamičnih) in zato tudi ne fluorescirajo. Ker je bilo usposabljanje v Pisi opravljeno pred vzorčenjem v reki Soči, spektrov EEM COM iz reke Soče nismo posneli. Kljub temu je bilo že na pogled videti, da COM iz Soče vsebuje visoko vsebnost CDOM in najverjetneje tudi FDOM (*angl. Fluorescence dissolved organic matter*) (Slika 31).



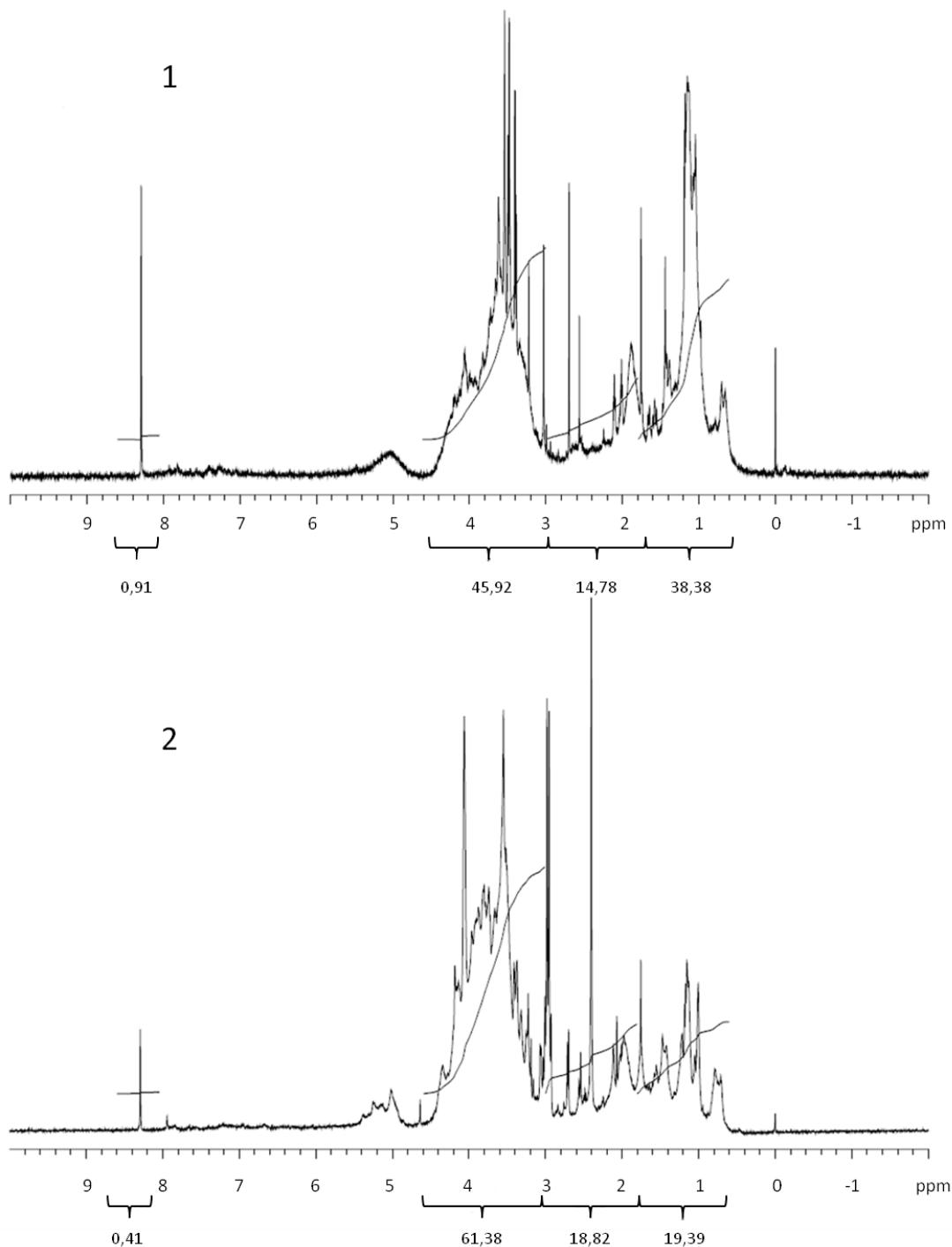
Slika 31: Filtrirana voda iz reke Soče

Figure 31: Filtered water from Isonzo river

### 5.1.4 Primerjava morske in fitoplanktonske koloidne organske snovi (COM)

Ekstracelularno raztopljeno organsko snov, ki jo izloča fitoplankton, hrani sekundarno produkcijo bakteriplanktona v morskem okolju. Količina in sestava ekstracelularnega DOM, ki jo producira fitoplankton, je odvisna od vrste organizma in fiziološkega stanja (Becker in sod., 2014), od fizikalnih in kemijskih lastnosti (temperatura, svetloba, rast in dostopnost anorganskih hranil) in tudi od prisotnosti drugih organizmov (Becker in sod., 2014). Tako smo z izolacijo ekstracelularne koloidne organske snovi (5 kDa retentat) iz treh različnih vrst fitoplanktona, izoliranih iz Tržaškega zaliva, želeli spremljati spremembo njene sestave. Primerjali smo tudi nizkomolekularno organsko snov (5 kDa retentat) med tremi vrstami fitoplanktona.

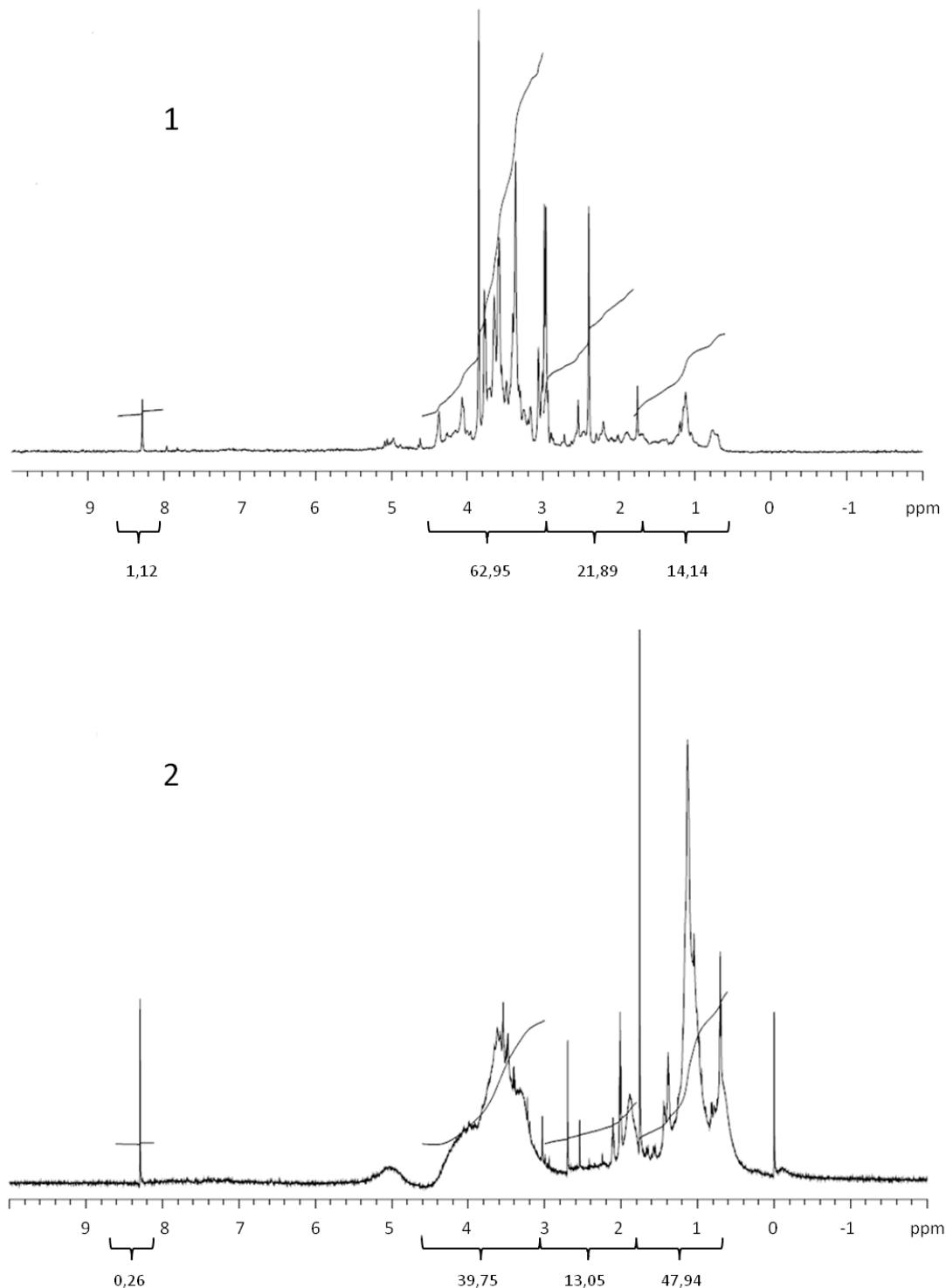
Vsebnost  $C_{org.}$ , spektri  $^1H$  NMR in integrali znotraj spektrov se razlikujejo med koloidno in nizkomolekularno frakcijo EPS treh kultur (nanoflagelat *Tetraselmis marina*, diatomeja *Chaetoceros socialis* in dinoflagelat *Prorocentrum minimum*). Nanoflagelat in diatomeja v koloidni frakciji izločita večinoma polisaharide, medtem ko dinoflagelat večinoma proteine. V nizkomolekulanih frakcijah v vseh treh vrstah prevladuje proteinska komponenta. Z morsko koloidno organsko snovjo se po videzu spektra  $^1H$  NMR in integralih najbolj ujema ekstracelularna koloidna organska snov nanoflagelata *Tetraselmis marina* (Slika 32), ki velja za pogosto vrsto fitoplanktona v oceanih. Vse fitoplanktonske COM imajo v primerjavi z morsko COM nižje vsebnost lipidov (za skoraj polovico), kar nakazuje, da lipidna frakcija COM ne izvira iz fitoplanktona. Tako kot DOM tudi COM nastaja iz različnih virov. Lipidni del COM lahko predstavlja refraktorno COM, ki je težko razgradljiva in odporna na mikrobično in kemijsko razgradnjo. Refraktorna COM nastane preko transformacije lipidov, proteinov in ogljikovih hidratov, vendar mehanizem tovrstnih pretvorb še ni povsem jasen. Do pretvorbe lahko pride preko mikrobne razgradnje in tudi fotooksidacije (Repeta, 2015).



Slika 32: Primerjava spektrov <sup>1</sup>H NMR morske COM, izolirane aprilja 2012 (1) in COM, izolirane iz nanoflagelata *Tetraselmis marina* (2)

Figure 32: Comparison of <sup>1</sup>H NMR spectra of marine COM isolated in April 2012 (1) and COM isolated from nanoflagellate *Tetraselmis marina* (2)

Dolgoletni podatki kažejo, da so nanoflagelati in diatomeje najbolj številčne vrste fitoplanktona v Tržaškem zalivu skozi leto (Mozetič in sod., 2012). Znano je, da diatomeje cvetijo predvsem pozno jeseni (novembra) in spomladi, zadnja leta pa opažajo zamik cvetenja diatomej in nanoflagelatov v mesecu juliju (Mozetič in sod., 2012). Prav v letu 2012, ko smo spremljali sezonske spremembe COM, je v juliju prevladovala diatomeja *Chaetoceros socialis* (France, ustno izr.), kar pomeni, da je lahko ekstracelularna COM diatomej močno vplivala na sestavo julijske COM. Primerjava spektrov  $^1\text{H}$  NMR julijske COM in ekstracelularne COM diatomeje (Slika 33) kaže, da diatomeje k COM prispevajo predvsem v vsebnosti polisaharidov (delež polisaharidov v COM diatomeje je 62,9 %) in manj lipidov in proteinov, ki izvirajo iz drugih virov.



Slika 33: Primerjava spektrov <sup>1</sup>H NMR COM, izolirane iz diatomeje *Chaetoceros socialis* (1) in morske  
COM, izolirane julija 2012 (2)

Figure 33: Comparison of <sup>1</sup>H NMR spectra of marine COM isolated in July (1) and COM isolated from  
diatom *Chaetoceros socialis* (2)

## 5.2 KOMPLEKSACIJA KOVIN IN POLKOVIN S KOLOIDNO ORGANSKO SNOVJO

### 5.2.1 Sezonske spremembe kompleksacije kovin in polkovin

Raztopljeni in koloidni organski snovi predstavljata vrsto spojin, ki vplivajo na porazdelitev, transport in biološko dostopnost nekaterih kovin in polkovin v morskem okolju, med katerimi so nekatere tudi toksične (Guo in sod., 2000). Poznavanje interakcij med kovinami in COM je zelo pomembno za boljše razumevanje biogeokemijskih procesov biološko aktivnih kovin in polkovin v morskem okolju. Zato smo poleg karakterizacije sestave COM želeli spoznati, kakšno vlogo ima COM v kroženju kovin. Zanimalo nas je, če COM z agregacijo odvzema kovine iz raztopljenih frakcij ali pa s kompleksacijo pospeši raztopljanje nekaterih kovin. Zato smo v letu 2012 spremljali vsebnost kovin in polkovin v raztopljeni in koloidni frakciji.

Pri večini kovin in polkovin V, Co, Ni, Ga, As, Rb, Sr, Cd, Cs, Ba in U je vsebnost skozi leto skoraj nespremenjena, kar nakazuje, da DOM in COM ne vplivata na transport in usodo navedenih elementov glede na to, da se DOM in COM sezonsko spreminja v vsebnosti organskega ogljika in nenazadnje tudi v sestavi. Ostalim kovinam, Al, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Se in Hg, se vsebnost med letom spreminja. Med njimi sta Hg in Cu tista, ki se koordinativno vežeta na raztopljeni organski snov, posebno na koloidno, glede na to, da pozitivno korelirata z vsebnostjo raztopljenih organskih snovi. Hg velja za mehko kovino (lahko polarizabilna zunanja lupina elektronov) in se veže na mehke ligande, kot so funkcionalne skupine, ki vsebujejo žveplo. Nasprotno je s Cu, ki je trda kovina (težje polarizabilna zunanja lupina elektronov) in se veže z visokimi konstantami stabilnosti predvsem na funkcionalne skupine, ki vsebujejo kisik. Tako kot COM se tudi Hg in Cu akumulirata do julija, že avgusta pa njuna vsebnost hitro pada. Naše raziskave so pokazale, da ima COM junija in julija najvišji delež visokomolekularnega COM ( $> 200$  kDa; 95 %), medtem ko avgusta njegov delež hitro pada na 65 %. Tako sta Hg in Cu julija skoraj v celoti vezana v visokomolekularni COM, ki se postopoma agregira. Hiter padec vsebnosti Hg in Cu od julija do avgusta je lahko posledica tega, da se s koloidi agregira do mikro- in makrogelov ter preide v suspendirano fazo. Pretekle študije asocijacije kovin z organsko

snovjo v Tržaškem zalivu so pokazale, da je precejšen delež večine kovin (med njimi tudi Hg in Cu) vgrajen v matriks makroagregatov, ki ima heterogeno sestavo (organska snov, celice mikrobov in predvsem anorganski delci) in se od lokacije do lokacije spreminja (Koron in sod., 2013). Cu je kot esencialna kovina lahko v veliki meri sestavni del celic mikrobov in če ti kopičijo Hg, lahko enako velja tudi zanj. Primerjava vsebnosti kovin in polkovin s preteklo študijo v Tržaškem zalivu (Koron in sod., 2013) pokaže, da je večina kovin in polkovin v raztopljeni frakciji v enakem koncentracijskem območju, kar pa ne velja za Se, Cu in Zn, saj so vsebnosti v naši študiji precej višje (Preglednica 10). Vsebnost Ni pa je bistveno nižja. V koloidni frakciji je vsebnost večine kovin primerljivih z vrednostmi iz Coron in sod. (2013), medtem ko se vrednosti Hg bistveno razlikujejo kar bi lahko bilo zaradi uporabe različnih analitskih metod in različnih časov vzorčenja.

Preglednica 10: Primerjava vsebnosti kovin in polkovin v raztopljeni in koloidni frakciji s preteklo raziskavo v Tržaškem zalivu (Koron in sod., 2013). Za primerjavo so za to študijo podane povprečne vsebnosti kovin in polkovin v letu 2012. Podana so tudi povprečja deležev koloidno vezanih kovin in polkovin v letu 2012

Table 10: Comparison of metal and metalloid concentration in dissolved and colloidal fraction with previous research in the Gulf of Trieste (Koron in sod., 2013). For comparison we took average metal and metalloid concentrations from 2012. Percentage of colloidal bonded metals and metalloids in 2012 are also shown

	<b>Raztopljeni kovini</b>	<b>Raztopljeni kovini</b>	<b>Koloidi</b>	<b>% koloidno vezanih kovin</b>	<b>Koloidi</b>
	nmol L <sup>-1</sup> povprečje v letu 2012	nmol L <sup>-1</sup> Koron in sod. 2013*	nmol L <sup>-1</sup> povprečje v letu 2012	% povprečje v letu 2012	nmol L <sup>-1</sup> Koron in sod. 2013*
<b>Al</b>	334,2 ± 247,6	490	2,9 ± 2,9	1,5	20
<b>V</b>	70,5 ± 4,3	104	1,1 ± 0,1	1,5	2
<b>Cr</b>	42,5 ± 17,9	78	0,8 ± 0,3	1,9	0,6
<b>Mn</b>	39,6 ± 33,4	47	0,6 ± 0,4	2,0	0,4
<b>Co</b>	4,1 ± 1,0	4	0,05 ± 0,01	1,4	/
<b>Ni</b>	16,0 ± 8,0	334	0,5 ± 0,1	3,5	0,8
<b>Cu</b>	92,9 ± 34,1	14	4 ± 0,3	4,0	7
<b>Zn</b>	98,3 ± 81,5	< 31	1,7 ± 0,7	2,1	3
<b>As</b>	46,7 ± 2,0	94	0,70 ± 0,07	1,6	1,2
<b>Se</b>	102,0 ± 63,0	4	2,9 ± 0,5	5,8	0,5
<b>Cd</b>	0,7 ± 0,6	0,5	0,010 ± 0,003	1,4	/
<b>Cs</b>	2,1 ± 0,3	2	0,030 ± 0,004	1,5	/
<b>Ba</b>	45,5 ± 38,0	42	0,50 ± 0,09	1,5	1,3
<b>U</b>	12,8 ± 1,2	10	0,20 ± 0,02	1,7	0,4
<b>Hg</b>	0,3 ± 0,2	0,025**	0,004 ± 0,003	3,8	0,025**

\*Vzorčenje je potekalo pred letom 2012.

\*\*Preračunano iz Coron in sod. (2013).

Najvišji delež koloidno vezanih imajo Se (5,8 %), Cu (4,0 %), Hg (3,8 %) in Ni (3,5 %), ostale kovine imajo nižje deleže, in sicer od 1 do 2 % (Preglednica 10). Se ni koordinacijsko vezan na COM, ampak je sestavni del COM v obliki organoselenovih spojin. Delež koloidno vezanega Hg v poletnih mesecih precej naraste, in sicer do 12 %, kar ne velja za ostale kovine. To sovpada s preteklimi raziskavami o kemijskih zvrsti Hg v vodnem stolpu Tržaškega zaliva. Pokazali so, da je precejšni delež raztopljenega Hg v hlapni obliki  $Hg^0$ , ostali del pa predstavlja reaktivni  $Hg^{2+}$ , ki je lahko kompleksiran z anorganskimi in organskimi ligandi (Horvat in sod., 1999; Bratkič in sod., 2013).

Afiniteto kovin do koloidne organske snovi smo primerjali tako, da smo izračunali molsko razmerje med vsebnostjo kovine in organskega ogljika ( $Me/C_{org.}$ ) in jih razvrstili od najnižjega do najvišjega razmerja. Tako smo lahko dobljeno vrsto primerjali z Irving-Williamsovo vrsto:

- Irving-Williamsova vrsta: Cd, Mn < Co < Zn, Ni < Cu < Hg,
- Koloidna frakcija: Co, Ga, Cd, Cs, Hg < U, Cr, Ni, Mn, Ba < As, Zn, Cu, V, Al < Fe, Rb, Sr.

Izkaže se, da afiniteta nekaterih kovin (Cd, Ni in Cu) do COM sledi Irving-Williamsovi vrsti. Ostale kovine nekoliko odstopajo od vrste in nekatere tudi niso v skladu z Irving-Willimasovo vrsto. Razlog za odstopanje in neskladanje z Irving-Williamsovo vrsto je lahko v nižji afiniteti kovin do COM v primerjavi z drugo organsko snovjo v vodnem stolpcu ali v specifičnem koncentracijskem območju kovin v Tržaškem zalivu (Hg). Hg ima najnižje razmerje  $Me/C_{org.}$ , kaže pa na najvišjo afiniteto do COM, saj se razmerje  $Hg/C_{org.}$  od zimskih do poletnih mesecev poviša za kar 5 krat (od 0,01 do 0,05) (Preglednica 8). Koncentriranje visokomolekularne COM v poletnih mesecih predstavlja tudi višanje števila funkcionalnih skupin, ki lahko vežejo kovine in polkovine.

Afiniteto kovin do COM smo primerjali s preteklimi raziskavami v Tržaškem in Mehiškem zalivu ter s srednjearlanškim območjem (Preglednica 11). Največje ujemanje afinitete kovin do COM je z raziskavo iz Tržaškega zaliva (Koron in sod., 2013). Afiniteta kovin do COM v Mehiškem zalivu in srednjearlanskem območju je pri večini kovin in polkovin Al,

V, Mn, Co, Cu, Cd in Ba nižja v primerjavi z afniteto kovin v Tržaškem zalivu, kar je lahko posledica različnih koncentracijskih območij kovin med območji in tudi vsebnosti in sestavi koloidne organske snovi.

Preglednica 11: Primerjava afinitete kovin in polkovin do COM ( $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}} \times 10^{-5}$ ; molsko razmerje) z raziskavami v Tržaškem in Mehškem zalivu ter na srednjeatlantskem območju. Za primerjavo so za to študijo podane povprečne vrednosti razmerja  $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}}$  v letu 2012

Table 11: Comparison of metal and metalloid affinity to COM ( $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}} \times 10^{-5}$ ; molar ratio) with previous studies in Gulf of Trieste, Gulf of Mexico and in Mid-Atlantic Bight. For comparison we took average values of  $\text{Me}/\text{C}_{\text{org.}}$  ratio from 2012

	Tržaški zaliv povprečje v letu 2012	Tržaški zaliv Koron in sod. 2013*	Mehški zaliv Guo in sod. 2000**	srednjeatlantsko območje Guo in sod. 2000***
<b>Al</b>	$21,1 \pm 20,9$	62,3	$2,8 \pm 2,5$	$3,3 \pm 2,6$
<b>V</b>	$6,8 \pm 0,4$	6,08	$0,26 \pm 0,31$	$0,34 \pm 0,39$
<b>Cr</b>	$5,4 \pm 8,8$	1,83	$2,6 \pm 1,1$	$20 \pm 24$
<b>Mn</b>	$3,2 \pm 1,8$	0,98	$0,23 \pm 0,18$	$1,1 \pm 1,2$
<b>Co</b>	$0,28 \pm 0,04$	/	$0,083 \pm 0,053$	$0,12 \pm 0,01$
<b>Ni</b>	$2,5 \pm 2,3$	2,45	$1,6 \pm 1,0$	$5,5 \pm 4,3$
<b>Cu</b>	$7,4 \pm 2,8$	19,2	$1,93 \pm 0,40$	$2,5 \pm 1,9$
<b>Zn</b>	$8,3 \pm 4,2$	8,92	$8,8 \pm 6,7$	$2,8 \pm 2,6$
<b>As</b>	$3,6 \pm 0,8$	3,46	/	/
<b>Se</b>	$14,1 \pm 3,1$	1,36	/	/
<b>Cd</b>	$0,04 \pm 0,01$	/	$0,013 \pm 0,008$	$0,059 \pm 0,052$
<b>Cs</b>	$0,15 \pm 0,04$	/	/	/
<b>Ba</b>	$2,7 \pm 0,5$	3,81	$0,031 \pm 0,014$	$0,084 \pm 0,050$
<b>U</b>	$1,1 \pm 0,2$	1,15	/	/
<b>Hg</b>	$0,02 \pm 0,02$	0,03	/	/

\* Vzorčenje je potekalo pred letom 2012.

\*\* Vzorčenje je potekalo leta 1993.

\*\*\* Vzorčenje je potekalo leta 1993.

### 5.2.2 Kompleksacija kovin in polkovin na izlivu reke Soče in v reki Soči

S spremeljanjem vsebnosti kovin in polkovin v COM preko slanostnega gradiента od najnižje slanosti v reki Soči (0,2 psu) do izliva reke Soče (slanost 16, 26 in 33 psu) smo lahko pridobili informacije o procesih, ki se dogajajo v izlivu reke Soče. Večina kovin, V,

Mn, As, Se, Rb, Sr, Ag, Cd, Cs, Tl, Bi, U in Hg, pozitivno korelira s slanostjo, kar je lahko posledica desorpcije kovin in polkovin z delcev, ki jih reka vnaša v Tržaški zaliv. Manjši delež kovin, Al, Cu, Ga in Ba, pa negativno korelira s slanostjo, kar pomeni, da je v izlivu precej manjša vsebnost naštetih kovin v primerjavi z vsebnostmi v reki. Ob večanju ionske moči se rečna koloidna organska snov, na katero so vezane kovine, prične agregirati in flokulirati (preide v suspendirano fazo) in v določenem času potone (Guo in sod., 2000).

## 6 SKLEPI

Glede na postavljeno hipotezo o sestavi in agregaciji koloidne organske snovi sledijo naslednji zaključki:

- Vsebnosti raztopljene in koloidne organske snovi med letom 2012 sta se močno spreminali, in sicer sta se višali od zimskih do poletnih mesecev ter se nato pozno poleti postopoma nižali. Delež koloidne organske snovi v DOC med letom ni enak, saj se od pomlad pa do konca poletja kar dvakrat zveča (od 16,3 do 32,4 %). To lahko povežemo s tem, da se COM razgraja počasneje, saj se bakterijska produkcija zviša šele pozno poleti (Fonda Umani in sod. 2007; Tinta in sod., 2014). Tako se COM, ki so jo izločile predvsem celice fitoplanktona ob cvetenju spomladi, akumulira do konca poletja.
- S pomočjo spektroskopije  $^1\text{H}$  NMR smo lahko semi-kvantitativno analizirali sezonske spremembe sestave koloidne organske snovi tako, da smo spekter integrirali po območjih, značilnih za štiri pomembne biokemijske spojine: lipide, proteine, polisaharide in huminske kisline. V COM se od januarja do julija močno zviša lipidna frakcija (relativno za 44 %), medtem ko se polisaharidna nekoliko zniža (relativno 16 %), najbolj pa se zniža proteinska frakcija, in sicer za skoraj polovico (relativno 38 %). Tako v COM kot tudi v makroagregatih prevladujejo lipidi (več kot COM) (Kovač in sod., 2002), kar potrjuje, da je COM prekurzor za nastanek mikro- in makrogelov ter posledično za tvorbo makroagregatov.
- Izključitvena kromatografija HPSEC nam je omogočila vpogled v sezonske spremembe velikosti in molskih mas organskih koloidov. COM smo uspeli ločiti v dva velikostna razreda: nižjemolekularni COM ( $5 \text{ kDa} < \text{NM COM} < 50 \text{ kDa}$ ) in visokomolekularni COM ( $\text{VM COM} > 200 \text{ kDa}$ ). Rezultati HPSEC so potrdili, da se COM v obdobju od januarja do julija agregira, kajti VM COM se od januarja do julija močno poveča (od 55 do 95 %), NM COM pa zmanjša (45 do 5 %). Že avgusta delež VM COM hitro pada (iz 95 na 65 %). To lahko razložimo s tem, da se

COM agregira v mikro- in makrogele in tako preide iz koloidne v suspendirano fazo, ali pa je COM podvržena mikrobni razgradnji.

Na osnovi primerjave med fitoplanktonsko in morsko koloidno organsko snovjo lahko zaključimo:

- S primerjavo spektrov  $^1\text{H}$  NMR fitoplanktonske in morske COM lahko sklepamo, da ima COM zelo heterogeno sestavo. Fitoplankton prispeva k sestavi COM predvsem s polisaharidi, glede na to, da je delež lipidne frakcije v fitoplanktonski COM zelo nizek. Lipidi morske COM se med letom akumulirajo, kar nakazuje, da predvsem lipidi predstavljajo refraktorno komponento COM, ki je odporna na mikrobno in kemijsko razgradnjo.

S pomočjo raziskave primerjave rečne in morske koloidne organske snovi lahko zaključimo:

- Sestava morske in rečne koloidne organske snovi se razlikuje, kar je najbolj vidno v primerjavi spektrov  $^1\text{H}$  NMR. Rečna COM ima podobno vsebnost lipidne frakcije, višjo proteinsko in nižjo polisaharidno. Rečna COM vsebuje kar do 10-krat višjo vsebnost huminskih snovi, kar je tudi pričakovano, saj v reko prehajajo huminske snovi iz obrežne zemlje. Zanimivo je, da v izlivu reke Soče pri slanosti 16 psu COM kaže popolnoma morsko sestavo, kar nakazuje, da rečni koloidi ob višji ionski moči pričnejo flokulirati in posledično sedimentirajo. Vseeno je iz spektrov EEM na izlivu reke Soče pri slanosti 16 in 33 psu videti, da COM pri 16 psu vsebuje še del rečne COM, saj ima višje jakosti fluorescence v območju spojin podobnim proteinom in fulvinski kislini v primerjavi s COM pri slanosti 33 psu.

Glede na postavljeno hipotezo o kompleksaciji kovin s koloidno organsko snovjo sledijo naslednji zaključki:

- Od vseh analiziranih kovin imata Hg in Cu največjo afiniteto do COM, ki se pokaže v pozitivni korelaciji z organsko snovjo ( $R^2_{\text{Cu-DOC}}=0,68$ ;  $R^2_{\text{Hg-DOC}}=0,56$ ) in pri Hg

tudi v 5 krat višjem razmerju Me/C<sub>org.</sub> v poletnih mesecih v primerjavi z zimskimi. To si lahko razložimo s teorijo trdih in mehkikh kislin in baz (angl. *theory of hard and soft acids and bases – HSAB*), saj ima Hg visoko afiniteto do funkcionalnih skupin, ki vsebujejo žveplo (tiolne skupine), Cu pa do skupin, ki vsebujejo kisik (predvsem karboksilne skupine). Najvišje vsebnosti Hg in Cu so junija in julija, ki pa avgusta hitro padejo. Glede na to, da COM doseže višek VM COM in avgusta hitro pade, ker se agregira v suspendirano snov, se s COM v aggregate ujameta tudi Hg in Cu. S tem COM prispeva k odstranitvi toksičnega Hg in tako lahko zmanjša metilacijo Hg v MeHg<sup>+</sup>, ki se bioakumulira v organizmih in biomagnificira v prehranjevalni verigi.

Iz raziskave vsebnosti kovin in polkovin preko slanostnega gradiента lahko zaključimo, da:

- Kovine v COM, ki pozitivno korelirajo s slanostjo, V, Mn, As, Se, Rb, Sr, Ag, Cd, Cs, Tl, Bi, U in Hg, preidejo v vodni stolpec Tržaškega zaliva preko desorpcije iz delcev, ki jih reke stoletja vnašajo v zaliv. Manj je tistih kovin v COM, ki negativno korelirajo s slanostjo, Al, Fe, Cu, Ga in Ba, kar nakazuje, da ob povečanju ionske moči ob stiku z morsko vodo preidejo v suspendirano snov.

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

Raztopljen organski ogljik (DOC) predstavlja največji rezervoar organskega ogljika v oceanih (662 Pg), kar je 200-krat več kot je ogljika v morski biomasi, in je primerljiv s količino atmosferskega ogljika (750 Pg), zato lahko že manjše spremembe vsebnosti raztopljenega organskega ogljika vplivajo na njegovo globalno kroženje. To pomeni, da je poznavanje kroženja raztopljene organske snovi pomembno na globalni ravni.

V Tržaškem zalivu se je periodično pojavljala fenomen sluzastih makroagregatov, ki se je v velikih obsežnostih nazadnje pojavil poleti leta 2004. Koloidna organska snov (COM) velja kot prekurzor za nastanek mikro- in makrogelov ter ne nazadnje tudi za tvorbo makroagregatov preko agregacije (*angl. self-assembling*). Zato je bil v sklopu pričujoče doktorske naloge velik poudarek na raziskavi sezonske dinamike vsebnosti, sestave, izvora in agregacije koloidne organske snovi. COM je heterogena snov, katere vsebnost med letom varira. Koloidni organski snovi, ki je predvsem fitoplanktonskega izvora, se od zime do poletja vsebnost  $C_{org}$  skoraj podvoji, prav tako tudi delež koloidnega organskega ogljika (% COC) glede na celokupni DOC. COM se torej do konca poletja postopoma akumulira, kar je lahko razlog v težje razgradljivi COM in zamaknjeni povišani bakterijski produkciji pozno poleti. S pomočjo spektroskopije  $^1H$  NMR smo raziskovali sestavo COM, ki se je med letom spremenjala. Proti poletju se je bistveno povišala lipidna frakcija (relativno 44 %), proteinska pa znižala za skoraj polovico, kar še dodatno nakazuje, da je COM težje razgradljiva. Izključitvena kromatografija HPSEC je dodatno potrdila, da se COM akumulira in agregira, saj je bil prisoten junija in julija v COM le visokomolekularni COM (VM COM, 95 %), ki je večja od 200 kDa. Avgusta VM COM hitro pada na 65 %, nižjemolekularni COM (NM COM) pa ponovno naraste na 35 %. K temu lahko prispeva povišana bakterijska produkcija v avgustu in/ali tvorba mikro- in makrogelov (prehod COM iz koloidne v suspendirano fazo). Primerjali smo sestavo morske COM s COM, izolirano iz EPS, ki so jo prodirale tri vrste fitoplanktona: nanoflagelat *Tetraselmis marina*, diatomeja *Chaetoceros socialis* in dinoflagelat *Prorocentrum minimum*. Primerjava integralov protonskih resonanc pokaže, da fitoplanktonska COM prispeva

predvsem k polisaharidni frakciji v morski COM, kajti lipidi in proteini predstavljajo manjši delež.

COM igra pomembno vlogo pri porazdelitvi, transportu in biološki razpoložljivosti kovin in polkovin. Rezultati so pokazali, da imata največjo afiniteto do COM Hg in Cu, ki se tako kot DOM in COM akumulirata v poletnih mesecih. Tudi vsebnost Hg in Cu pade avgusta, kar je lahko posledica tvorbe agregatov ali pa povečane mikrobne razgradnje. Afiniteta nekaterih kovin do COM sledi Irving-Williamsovi vrsti, nekatere odstopajo oz. ne sledijo vrsti, kar je lahko posledica večje afinitete kovin do druge organske snovi, prisotne v vodnem stolpcu ali zaradi specifičnega koncentracijskega območja kovin (npr. Hg) v Tržaškem zalivu.

Spremljali smo tudi spremembe sestave in vsebnosti COM ter vsebnosti kovin in polkovin preko slanostnega gradiента, ki poteka od reke Soče do njenega izliva. Rečna COM se bistveno razlikuje od morske, saj prevladuje delež lipidov in ima v primerjavi z morsko bistveno višjo (do 10-krat) vsebnost huminskih snovi. COM izliva reke Soče pri slanosti 16, 26 in 33 psu je po sestavi bolj podobna morski COM, kar nakazuje na agregacijo (flokulacijo) rečne COM ob povečanju ionske moči v izlivu. Kovine in polkovine so pokazale visoko korelacijo s slanostjo, nekatere pozitivno, druge negativno. Tiste, z negativno korelacijo, se ob stiku z morsko tako kot koloidi agregirajo in izločijo iz raztopljene frakcije. Pozitivna korelacija s slanostjo pa pomeni, da se kovine desorbirajo z delcev, ki so jih nanesle reke.

Pridobljeni rezultati omogočajo poznavanje časovno spremenljajoče sestave COM v obalnem morju, ki je pod vplivom sladkovodnih pritokov. Med drugim ima COM pomembno vlogo v kompleksaciji nekaterih kovin, predvsem Hg in Cu.

## 7.2 SUMMARY

Dissolved organic carbon (DOC) represents the largest reservoir of organic carbon in the ocean (662 Pg), which is more than 200 times greater than the carbon incorporated in marine biomass, and is comparable with atmospheric carbon content (750 Pg). Even small changes in dissolved organic carbon can have a major impact on global carbon cycling, stressing the importance of studying DOC cycling on a global scale.

In the Gulf of Trieste, the phenomenon of periodically occurring mucous macroaggregates was lastly seen in the summer of 2004. Colloidal organic matter (COM) acts as a precursor to micro- and macrogel formation as well as macroaggregates through self-assembling. Hence, the main aim of this research was to investigate the seasonal dynamics of concentration, composition, source and aggregation of colloidal organic matter. COM turned out to be a highly heterogeneous matter, whose content varies throughout the year. COM, mostly of phytoplankton origin, was found to have increased by almost two-fold from the winter to summer months by means of C<sub>org</sub>. Additionally, the percentage of colloidal organic carbon (% COC) also had a two-fold increase. The accumulation of COM towards the summer could have been due to degradation resistance and a lag in increased bacterial production in the late summer. The <sup>1</sup>H NMR spectroscopy enabled us to obtain more information regarding seasonal changes in the COM composition. While the lipid fraction proportionally increased (relatively, by 44 %) towards the summer months, the protein fraction decreased nearly two-fold, indicating refractory properties in the summer COM. Size exclusion chromatography (HPSEC) confirmed that COM accumulates and aggregates in the summer because high molecular weight COM (HMW COM) greater than 200 kDa was the most abundant (95%) COM fraction. In August, HMW COM decreased rapidly (to 65%), whereas lower molecular weight COM (LMW COM) rose to 35%. This could have been due to increased bacterial production in August and/or due to formation of micro- and macrogels (transfer of COM from the colloidal to the suspended phase). We compared the composition of marine COM to COM EPS, which was isolated from three cultured phytoplankton, which were isolated from the Gulf of Trieste: nanoflagellate *Tetraselmis marina*, diatom *Chaetoceros socialis* and dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. A comparison of integrated proton resonance showed that phytoplankton COM

contributed mainly to the polysaccharide fraction and had lower lipid and protein content compared to marine COM.

COM plays a crucial role in metal and metalloid fates, transport and bioavailability. Our results showed that Hg and Cu had the highest affinity to COM and, like DOM and COM, accumulated in the summer period. Like COM, Hg and Cu content decreased in August, indicating formation of aggregates and increased microbial degradation. Some metal affinity to COM followed the Irving-Williams series and some did not, which could have been due to a higher metal affinity to other organic matter in the water column or due to a specific concentration range of metals (e. g. Hg) in the Gulf of Trieste.

Finally, we followed changes in the content and composition of COM and changes in metal and metalloid concentration through the salinity gradient, ranging from the Isonzo River to the river's mouth. Riverine COM differed from marine COM in that it had both a higher lipid and humics content (10-fold). COM from the Isonzo River's mouth, at salinities 16, 26 and 33 psu, was similar to marine COM, indicating aggregation (flocculation) of riverine COM, with increasing ionic strength at the river's mouth. Some metals and metalloids showed positive correlations and others showed negative correlations with salinity. Metals with a positive correlation, such as COM, flocculated and consequently precipitated with increasing ionic strength. Few of them had a positive correlation with salinity, indicating the desorption of metals from particles introduced by the river in the Gulf.

The obtained results contribute to better understanding of temporal dynamics of COM composition which is affected by river inflow. COM has an importat role in some metal complexation, especially with Hg in Cu.

## 8 VIRI

- Arnoldi C. 2011. Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Annual Review of Marine Science*, 3, 401-425.
- Arrieta J.M., Mayol E., Hansman R.L., Herndl G.J., Dittmar T., Duarte C.M. 2015. Dilution limits dissolved organic carbon utilization in the deep ocean. *Science*, 348, 6232: 331-333.
- Azam F., Malfatti F. 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 10: 782-791.
- Azam F., Smith D.C., Steward G.F., Hagström Å. 1994. Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial Ecology*, 28, 2: 167-179.
- Becker J.W., Berube P.M., Follett C.L., Waterbury J.B., Chisholm S.W., DeLong E.F., Repeta D.J. 2014. Closely related phytoplankton species produce similar suites of dissolved organic matter. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-14.
- Benner R., Fogel M.L., Sprague E.K., Hodson R.E. 1987. Depletion of  $^{13}\text{C}$  in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. *Nature*, 329, 6141: 708-710.
- Bratkič A., Ogrinc N., Kotnik J., Faganeli J., Žagar D., Yano S., Tada A., Horvat M. 2013. Mercury speciation driven by seasonal changes in a contaminated estuarine environment. *Environmental Research*, 125: 171-178.
- Braun V., Hantke K. 2007. Molecular physiology of metal-microbe interactions according to groups: acquisition of iron by bacteria V: Molecular microbiology of trace metals. Nies D.H., Silver S. (eds.). Berlin, Springer.
- Carlson C.A., Hansell D.A. 2015. DOM sources, sinks, reactivity and budgets V: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. London, Academic Press: 65-126.
- Chin W.-C., Orellana M.V., Verdugo P. 1998. Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature*, 391, 6667: 568-572.
- Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Brambati A. 2001. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic sea). *Applied Geochemistry*, 16, 5: 541-558.

- Degobbis D., Fonda-Umani S., Franco P., Malej A., Precali R., Smislaka N. 1995. Changes in the northern Adriatic ecosystem and the hypertrophic appearance of gelatinous aggregates. *Science of the Total Environment*, 165, 1-3: 43-58.
- De Vittor C., Paoli A., Fonda Umani S. 2008. Dissolved organic carbon variability in a shallow coastal marine system (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 78, 2: 280-290.
- Doucet F.J., R.L.J., H.S.P. 2007. Colloid-trace element interactions in aquatic systems V: Environmental colloids and particles behaviour, separation and characterisation. Wilkinson J.R., Lead J.R. (eds.). Chichester, England, John Wiley & Sons: 95-195.
- Emerson S., Hedges J. 2008. The global carbon cycle: interactions between the atmosphere and ocean V: Chemical oceanography and the marine carbon cycle (eds.). New York, Cambridge University Press: 372-403.
- Faganeli J. 1989. Sedimentation of particulate nitrogen and amino acids in shallow coastal waters (Gulf of Trieste, northern Adriatic). *Marine Chemistry*, 26, 67-80.
- Faganeli J., Avčin A., Fanuko N., Malej A., Turk V., Tušnik P., Vrišer B., Vukovič A. 1985. Bottom layer anoxia in the central part of the Gulf of Trieste in the late summer of 1983. *Marine Pollution Bulletin*, 16, 2: 75-78.
- Faganeli J., Herndl G.J. 1991. Dissolved organic matter in the waters of the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *Thalassia Jugoslavica*, 23: 51-63.
- Faganeli J., Horvat M., Covelli S., Fajon V., Logar M., Lipej L., Cermelj B. 2003. Mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *Science of the Total Environment*, 304, 1-3: 315-326.
- Faganeli J., Kovač N., Leskovšek H., Pezdič J. 1995. Sources and fluxes of particulate organic matter in shallow waters characterized by summer macroaggregate formation. *Biogeochemistry*, 29, 71-88.
- Faganeli J., Malej A., Pezdič J., Malačič V. 1988. C : N : P ratios and stable C isotope ratios as indicators of sources of organic matter in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *Oceanologica acta*, 11, 4: 377-382.
- Faganeli J., Mohar B., Kofol R., Pavlica V., Marinšek T., Rozman A., Kovač N., Vuk A.Š. 2010. Nature and Lability of Northern Adriatic Macroaggregates. *Marine Drugs*, 8, 9: 2480-2492.

- Faganeli J., Ogrinc N., Kovač N., Kukovec K., Falcogna I., Mozetic P., Bajt O. 2009. Carbon and nitrogen isotope composition of particulate organic matter in relation to mucilage formation in the northern Adriatic Sea. *Marine Chemistry*, 114, 3-4: 102-109.
- Filella M. 2007. Colloidal properties of submicron particles in natural waters V: Environmental colloids and particles (behavior, separation and characterisation). Wilkinson J.K., Lead J.R. (eds.). Chichester England, John Wiley & Sons: 17-94.
- Fitzgerald W.F., Lamborg C.H., Hammerschmidt C.R. 2007. Marine Biogeochemical Cycling of Mercury. *Chemical Reviews*, 107, 2: 641-662.
- Fogel M.L., Cifuentes L.A. 1993. Isotope fractionation during primary production V: Organic Geochemistry. Engel M.H., Macko S.A. (eds.). New York and London, Plenum Press: 73-100.
- Fonda Umani S., Del Negro P., Larato C., De Vittor C., Cabrini M., Celio M., Falconi C., Tamberlich F., Azam F. 2007. Major inter-annual variations in microbial dynamics in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea) and their ecosystem implications. *Aquatic Microbial Ecology*, 46, 2: 163-175.
- Fonda Umani S., Ghirardelli E., Specchi M. 1989. Gli episodi di "mare sporco" nell'Adriatico dal 1729 ai giorni nostri. Trieste, Regione autonoma Friuli-Venezia Giulia: 178.
- Geografski inštitut Antona Melika 1998. Meritve globinskih pasov.
- Giani M., Degobbis D., Rinaldi A. 2005. Mucilages in the Adriatic and Tyrrhenian seas. *Science of the Total Environment*. 353:1-379.
- Gómez-Ordóñez E., Jiménez-Escrí A., Rupérez P. 2012. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). *Talanta*, 93, 153-159.
- Gueguen C., Burns D.C., McDonald A., Ring B. 2012. Structural and optical characterization of dissolved organic matter from the lower Athabasca River, Canada. *Chemosphere*, 87, 8: 932-937.
- Guggenberger G., Zech W., Schulten H.R. 1994. Formation and mobilization pathways of dissolved organic matter: evidence from chemical structural studies of organic matter fractions in acid forest floor solutions. *Organic Geochemistry*, 21, 1: 51-66.

- Guo L., Santschi P.H. 2007. Ultrafiltration and its applications to sampling and characterisation of aquatic colloids V: Environmental colloids and particles (behavior, separation and characterisation). Wilkinson J.K., Lead J.R. (eds.). Chichester England, John Wiley & Sons: 159-221.
- Guo L., Santschi P.H., Cifuentes L.A., Trumbore S.E., Southon J. 1996. Cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the Middle Atlantic Bight as revealed by carbon isotopic ( $^{13}\text{C}$  and  $^{14}\text{C}$ ) signatures. Limnology and Oceanography, 41, 6: 1242-1252.
- Guo L., Santschi P.H., Warnken K.W. 2000. Trace metal composition of colloidal organic material in marine environments. Marine Chemistry, 70, 4: 257-275.
- Hansell D.A. 2013. Recalcitrant dissolved organic carbon fractions. Annual Review of Marine Science, 5, 421-445.
- Harrison P.J., Waters R.E., Taylor F.J.R. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. Journal of Phycology, 16, 1: 28-35.
- Herndl G.J. 1992. Marine snow in the northern Adriatic Sea: possible causes and consequences for shallow eco-system. Marine Microbial Food Webs 6, 149-172.
- Hertkorn N., Harir M., Koch B.P., Michalke B., Schmitt-Kopplin P. 2013. High-field NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry: powerful discovery tools for the molecular level characterization of marine dissolved organic matter. Biogeosciences, 10, 3: 1583-1624.
- Hoefs J. 2009. Stable isotope geochemistry. Berlin, Springer.
- Honeyman B.D., Santschi P.H. 1989. A Brownian-pumping model for oceanic trace metal scavenging: Evidence from Th isotopes. Journal of Marine Research, 47, 4: 951-992.
- Horvat M., Covelli S., Faganeli J., Logar M., Mandić V., Rajar R., Širca A., Žagar D. 1999. Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste. Science of the Total Environment, 237-238: 43-56.
- Irving H., Williams R.J.P. 1953. 637. The stability of transition-metal complexes. Journal of the Chemical Society (Resumed), 0: 3192-3210.
- Jiao N., Herndl G.J., Hansell D.A., Benner R., Kattner G., Wilhelm S.W., Kirchman D.L., Weinbauer M.G., Luo T., Chen F., Azam F. 2010. Microbial production of

- recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Review Microbiology*, 8, 8: 593-599.
- Klun K., Šket P., Falnoga I., Faganeli J. 2015. Variation in colloidal organic matter composition and aggregation in coastal waters (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Geomicrobiology Journal*, 32, 7: 609-615.
- Kogovšek T., Tinta T., Klun K., Malej A. 2014. Jellyfish biochemical composition: importance of standardised sample processing. *Marine Ecology Progress Series*, 510: 275-288.
- Koron N., Faganeli J., Falnoga I., Kovač N. 2011. Interaction of Macroaggregates and Hg in Coastal Waters (Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea). *Geomicrobiology Journal*, 28, 7: 615-624.
- Koron N., Faganeli J., Falnoga I., Mazej D., Klun K., Kovač N. 2013. Association of macroaggregates and metals in coastal waters. *Marine Chemistry*, 157, 185-193.
- Kovač N., Faganeli J., Bajt O. 2008. Mucous macroaggregates in the Northern Adriatic. In *Geochemistry Research Advances*. Stefansson O., Ed.. Nova Science: New York, NY, USA, 119-141.
- Kovač N., Bajt O., Faganeli J., Sket B., Orel B. 2002. Study of macroaggregate composition using FT-IR and  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. *Marine Chemistry*, 78, 4: 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, 10: 1095-1104.
- Lam B., Simpson A.J. 2008. Direct  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of dissolved organic matter in natural waters. *Analyst*, 133, 2: 263-269.
- Lam B., Simpson A.J. 2009. Investigating aggregation in Suwannee River, U.S.A., dissolved organic matter using diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28, 5: 931-939.
- Libes S.M. 2009. The redox chemistry of seawater: Trace elements in seawater V: Introduction to marine biogeochemistry (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. Burlington, Academic Press: 259-298.
- Loh A.N., Bauer J.E., Druffel E.R.M. 2004. Variable ageing and storage of dissolved organic components in the open ocean. *Nature*, 430, 7002: 877-881.

- Malej A., Harris R. P. 1993. Inhibition of copepod grazing by diatom exudates: a factor in the development of mucus aggregates? *Marine Ecology Progress Series*, 96: 33-42.
- Malej A., Mozetič P., Malač V., Turk V. 1997. Response of Summer Phytoplankton to Episodic Meteorological Events (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Marine Ecology*, 18, 3: 273-288.
- Meng Y., Yao C., Xue S., Yang H. 2014. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. *Bioresource Technology*, 151, 347-354.
- Mopper K., Stubbins A., Ritchie J.D., Bialk H.M., Hatcher P.G. 2007. Advanced Instrumental Approaches for Characterization of Marine Dissolved Organic Matter: Extraction Techniques, Mass Spectrometry, and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemical Reviews*, 107, 2: 419-442.
- Morel F.M., Price N.M. 2003. The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science*, 300, 5621: 944-947.
- Mozetič P., Francé J., Kogovšek T., Talaber I., Malej A. 2012. Plankton trends and community changes in a coastal sea (northern Adriatic): Bottom-up vs. top-down control in relation to environmental drivers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115: 138-148.
- Müller-Niklas S., Schuster S., Kaltenböck E., Herndl G.J. 1994. Organic content and bacterial metabolism in amorphous aggregations of the Northern Adriatic Sea. *Limnology and Oceanography*, 39, 58-68.
- Ogawa H., Amagai Y., Koike I., Kaiser K., Benner R. 2001. Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science*, 292, 5518: 917-920.
- Olivotti R., Faganeli J., Malej A. 1986. Impact of 'Organic' Pollutants on Coastal Waters, Gulf of Trieste. *Water Science and Technology*, 18, 9: 57-68.
- Opsahl S., Benner R., Amon R.M.W. 1999. Major flux of terrigenous dissolved organic matter through the Arctic Ocean. *Limnology and Oceanography*, 44, 8: 2017-2023.
- Orellana M.V., Leck C. 2015. Marine microgels V: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. London, Academic Press: 451-480.
- Pearson R.G. 1963. Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society*, 85, 22: 3533-3539.

- Penna N., Kovač N., Ricci F., Penna A., Capellacci S., Faganeli J. 2009. The role of dissolved carbohydrates in the northern Adriatic macroaggregate formation. *Acta Chimica Slovenica*, 56, 2: 305-314.
- Ravichandran M. 2004. Interactions between mercury and dissolved organic matter--a review. *Chemosphere*, 55, 3: 319-331.
- Repeta D.J. 2015. Chemical characterisation and cycling of dissolved organic matter V: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. London, American Press: 21-63.
- Ridgwell A., Arndt S. 2015. Why dissolved organic matter: DOC in ancient oceans and past climate change V: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. London, Academic Press: 1-20.
- Rinaldi A., Vollenweider R.A., Montanari G., Ferrari C.R., Ghetti A. 1995. Mucilages in Italian seas: The Adriatic and Thyrrhenian seas during 1988-1991. *Science of the Total Environment*, 165, 1-3: 165-183.
- Sachs J.P., Repeta D.J., Goericke R. 1999. Nitrogen and carbon isotopic ratios of chlorophyll from marine phytoplankton. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63, 9: 1431-1441.
- Simpson A.J., Simpson M.J., Soong R. 2012. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Its Key Role in Environmental Research. *Environmental Science and Technology*, 46, 21: 11488-11496.
- Smucker R.A., Dawson R. 1986. Products of photosynthesis by marine phytoplankton: Chitin in TCA "protein" precipitates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 104, 1-3: 143-152.
- Stachowitsch M., Fanuko N., Richter M. 1990. Mucus aggregates in the Adriatic sea: An overview of stages and occurrences. *P.S.Z.N. I. Marine Ecology*, 11, 4: 327-350.
- Stravisi F. 1983a. Some characteristics of the circulation in the Gulf of Trieste. *Thalassia Jugoslavica*, 19, 1-4: 355-363.
- Stravisi F. 1983b. The vertical structure annual cycle of the mass field parameters in the Gulf of Trieste. *Bollettino di oceanologia teorica ed applicata*, 1, 3: 239-250.
- Svetlić V., Žutic V., Zimmermann A.H. 2005. Biophysical scenario of giant gel formation in the northern Adriatic sea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1048, 524-527.

- Thingstad T. F., Hagström A., Rassoulzadegan F. 1997. Accumulation od degradable DOC on surface waters: Is it caused by a malfunctioning microbial loop? *Limnology and Oceanography*, 42: 398-404.
- Tinta T., Vojvoda J., Mozetič P., Talaber I., Vodopivec M., Malfatti F., Turk V. 2014. Bacterial community shift is induced by dynamic environmental parameters in a changing coastal ecosystem (northern Adriatic, northeastern Mediterranean Sea) – a 2-year time-series study. *Environmental Microbiology*, 17, 10: 3581-3596.
- Turk V., Hagström Å., Kovač N., Faganeli J. 2010. Composition and function of mucilage macroaggregates in the northern Adriatic. *Aquatic Microbial Ecology*, 61, 3: 279-289.
- 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, 1-4: 67-85.
- Verdugo P., Santschi P. H. 2010. Polymer dynamics of DOC networks and gel formation in seawater. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57, 16: 1486-1493.
- Vojvoda J., Lamy D., Sintes E., Garcia J. A. L., Turk V., Herndl G. J. 2014. Seasonal variation in marine-snow-associated and ambient-water prokaryotic communities in the northern Adriatic Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 73, 3: 211-224.
- Walker B. D., Beaupré S. R., Guilderson T. P., Druffel E. R. M., McCarthy M. D. 2011. Large-volume ultrafiltration for the study of radiocarbon signatures and size vs. age relationships in marine dissolved organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75, 18: 5187-5202.
- Wells M. L. 2002. Marine colloids and trace metals V: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell D.A., Carlson C.A. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. USA, Elsevier Science: 367-397.
- Wells M. L., Kozelka P. B., Bruland K.W. 1998. The complexation of 'dissolved' Cu, Zn, Cd and Pb by soluble and colloidal organic matter in Narragansett Bay, RI. *Marine Chemistry*, 62, 3-4: 203-217.
- Whitman W. B., Coleman D. C., Wiebe W. J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 12: 6578-6583.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju, prof. dr. Jadranu Fagenliju, za vso strokovno pomoč in vodenje skozi celoten doktorski študij. Zahvaljujem se tudi somentorici doc. dr. Ingrid Falnoga za koristne nasvete pri raziskavah in pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala vsem sodelavcem na Morski biološki postaji za nasvete in pomoč, še posebej terenski ekipi Tihiju in Marku za pomoč pri vzorčenju in prenašanju na stotine litrov morske vode.

Zahvaljujem se dr. Primožu Šketu in prof. dr. Borisu Šketu za NMR spektre, dr. Darji Mazej in Vesni Fajon za pomoč pri analizi kovin, dr. Alfredu Beranu, ki je izoliral in priskrbel fitoplantkonske kulture in prof. dr. Nives Ogrinc za izotopsko analizo C in N. Zahvaljujem se Jani Gregorič za strokovno lektoriranje doktorske disertacije.

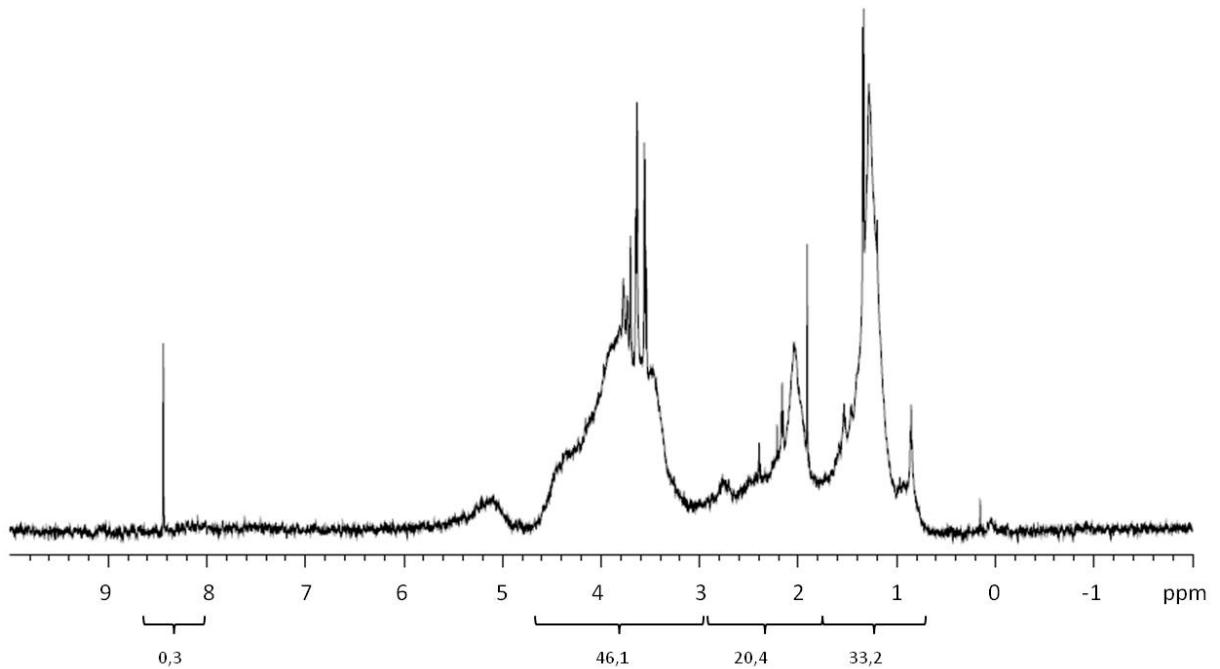
Hvala DRMR društvu: Tinkara, Neli, Tjaša, Mateja, Neža, Tihi, Gašper, Jana V., Jana G., Urška, Manja, Martin, Matjaž, Marko, Jernej, Iva, Borut in Katka, za mnogo nepozabnih popoldnevov in večerov! Ana, hvala za vzdrževanje nivoja mojega krvnega sladkorja ;). Hvala Neli, Tinkara, Tjaša, Jana G. in Mateja, ki ste v teh letih postale veliko več kot sodelavke.

En velik hvala moji družini, mami Majdi, očetu Ervinu, bratu Jaki in noni Lei, za moralno in tudi finančno podporo v vseh letih mojega študija. Brez vas bi to težko izpeljala.

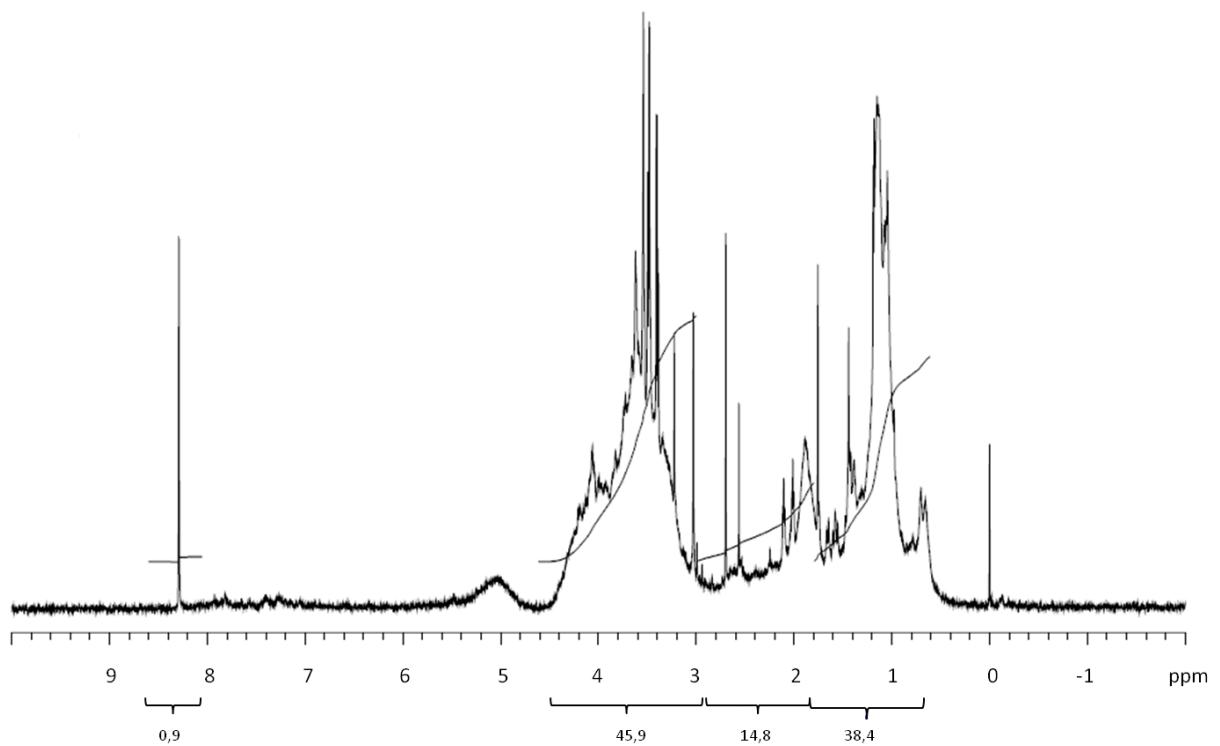
Ne nazadnje pa hvala tebi Til, ki mi ob lepih in slabih trenutkih vedno stojiš ob strani.

## PRILOGE

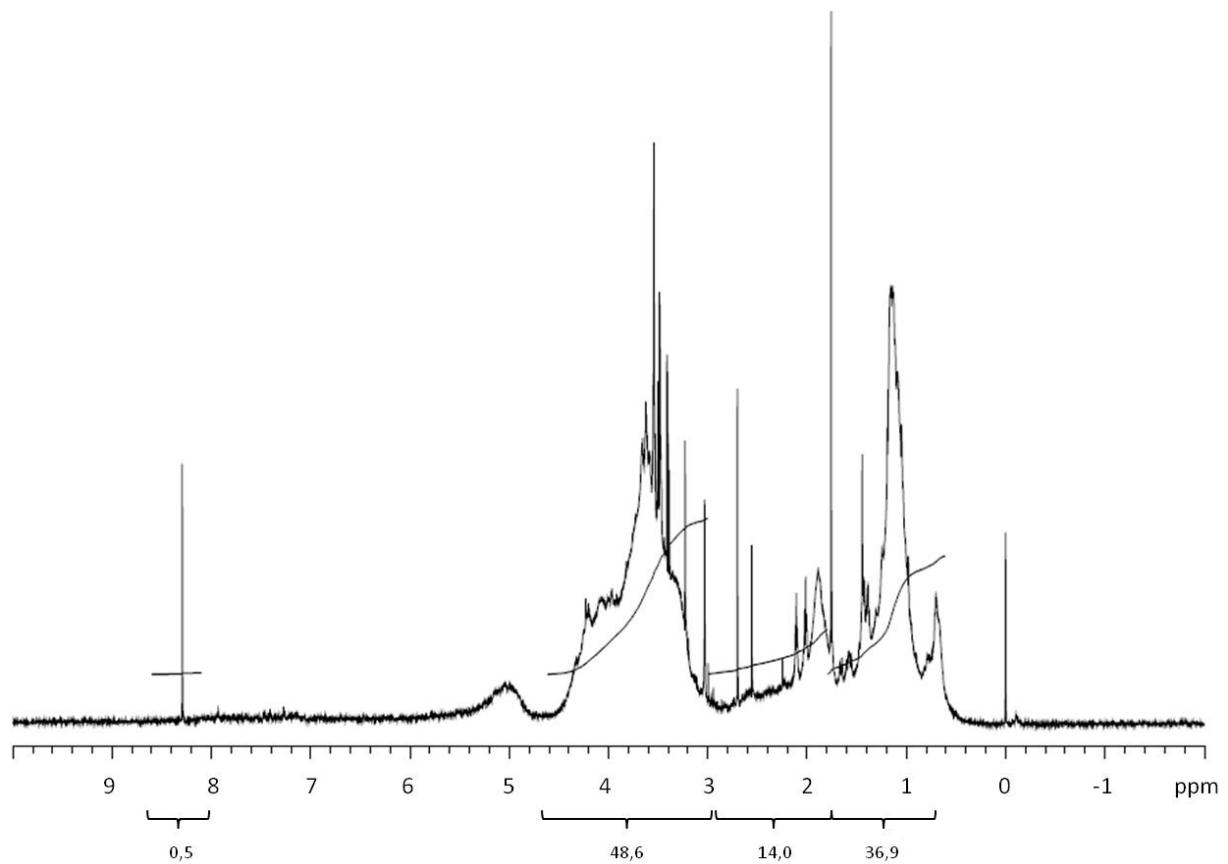
Priloga A1:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz januarja 2012



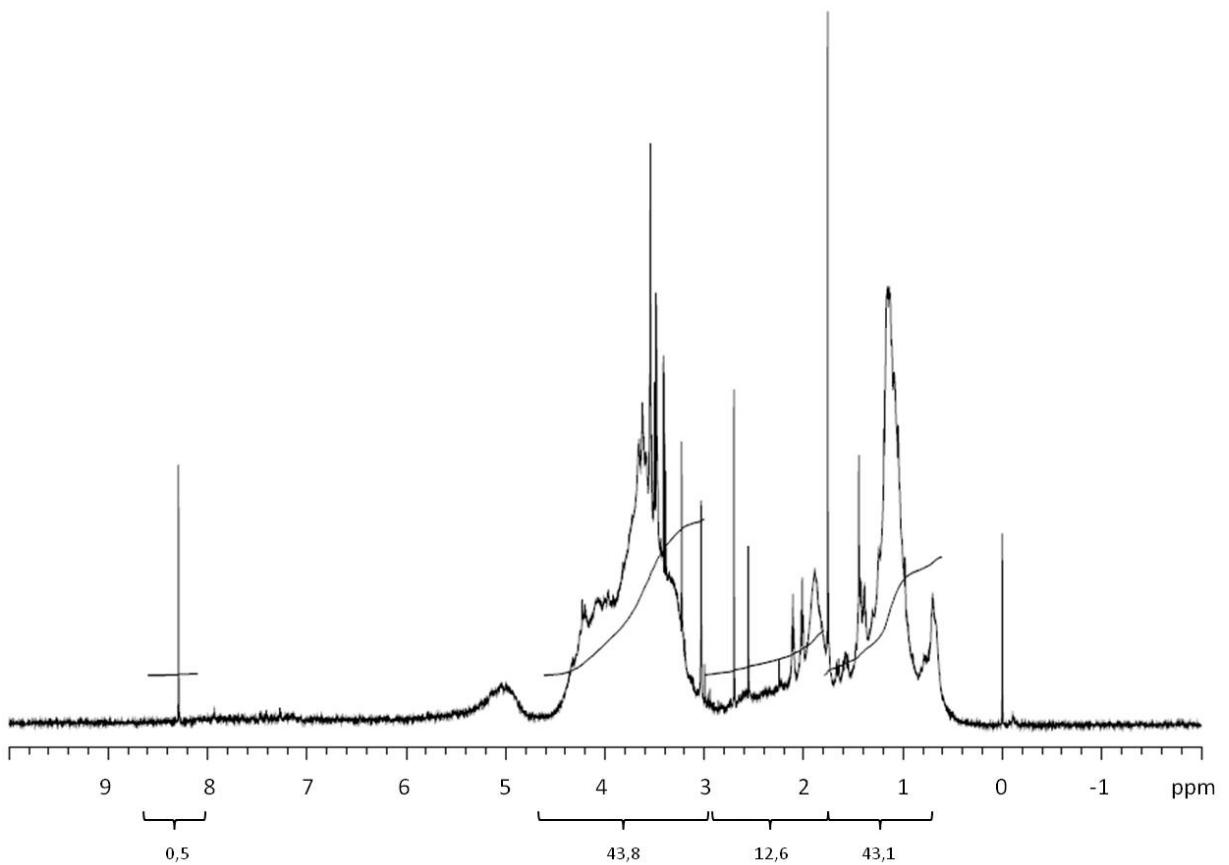
Priloga A2:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz aprila 2012



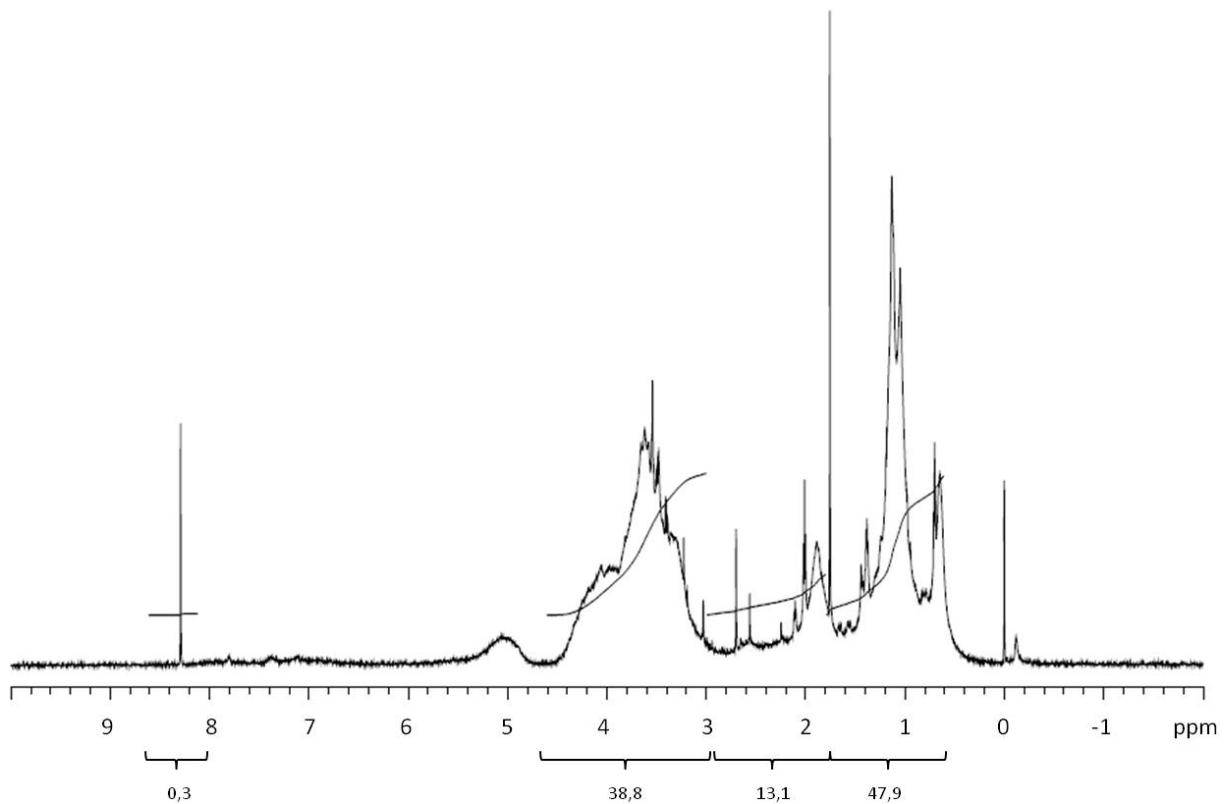
Priloga A3:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz maja 2012



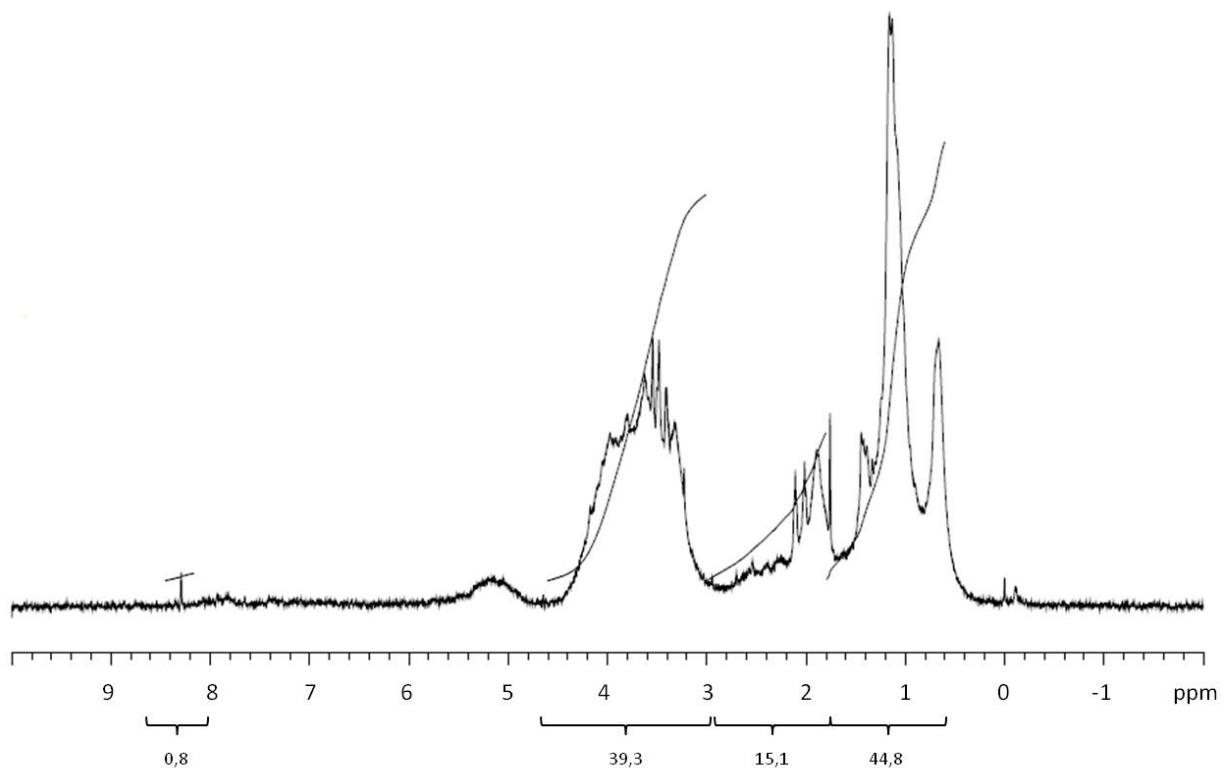
Priloga A4:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz junija 2012



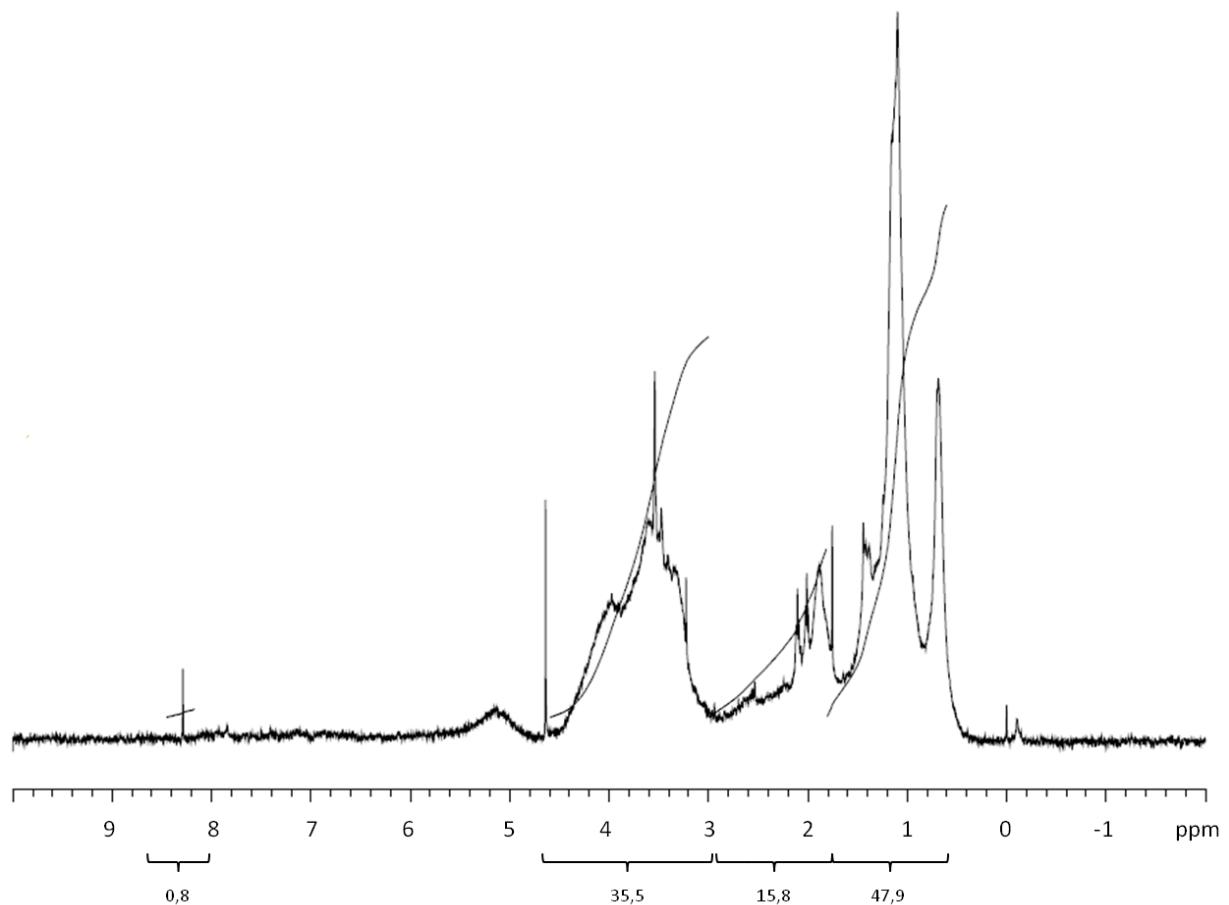
Priloga A5:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz julija 2012



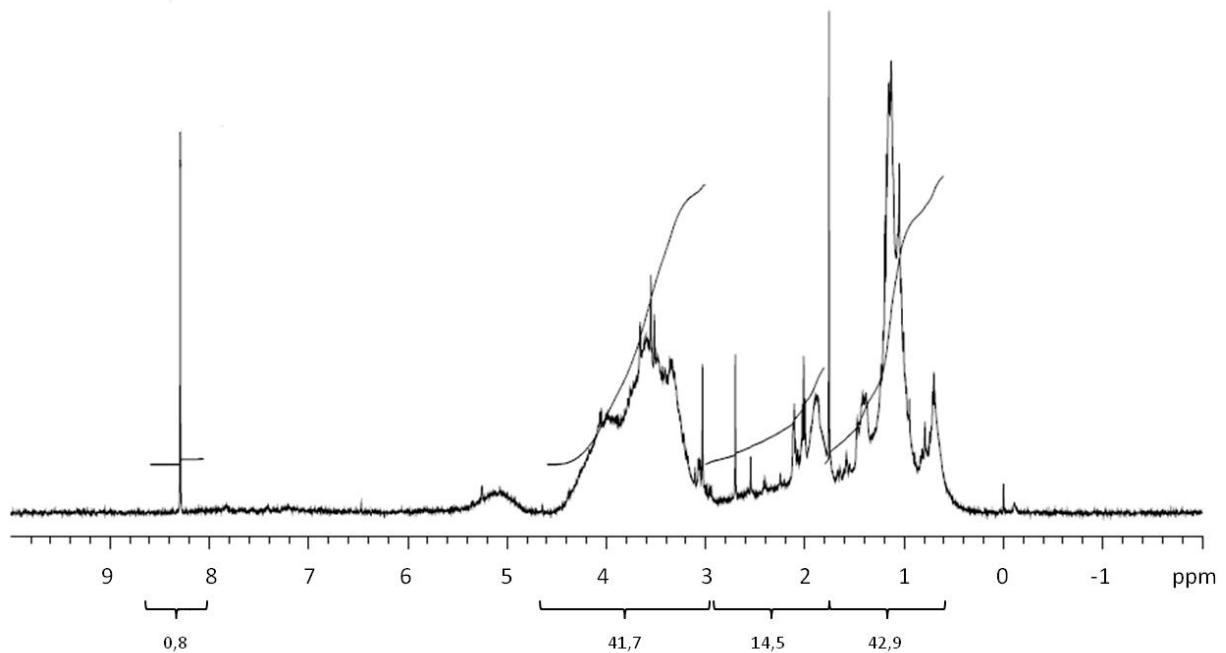
Priloga A6:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz avgusta 2012



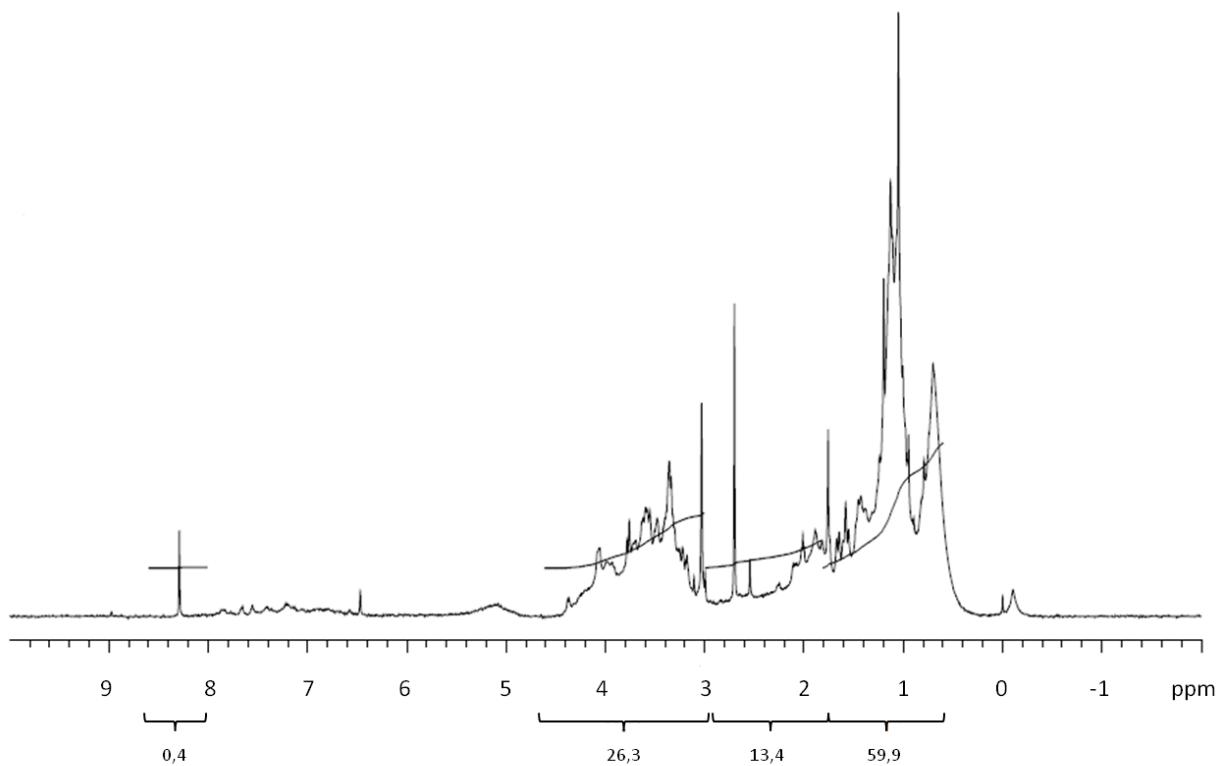
Priloga A7:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz septembra 2012



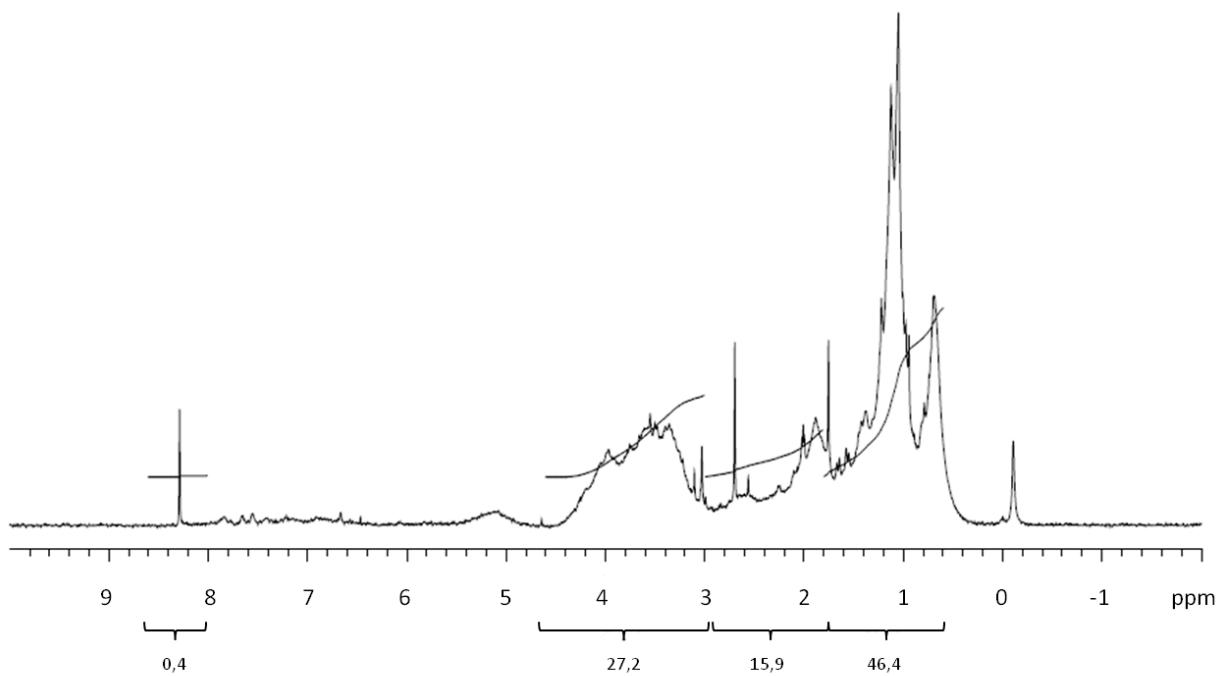
Priloga A8:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz oktobra 2012



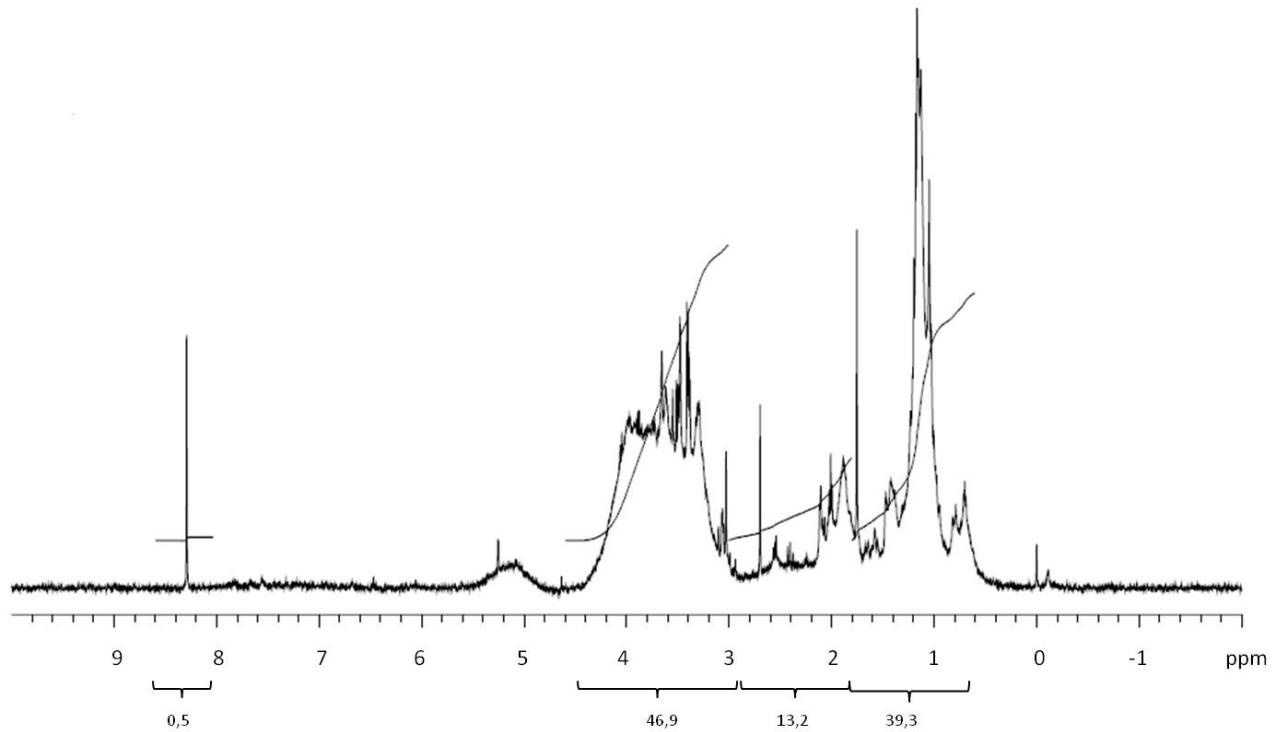
Priloga A9:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz novembra 2012



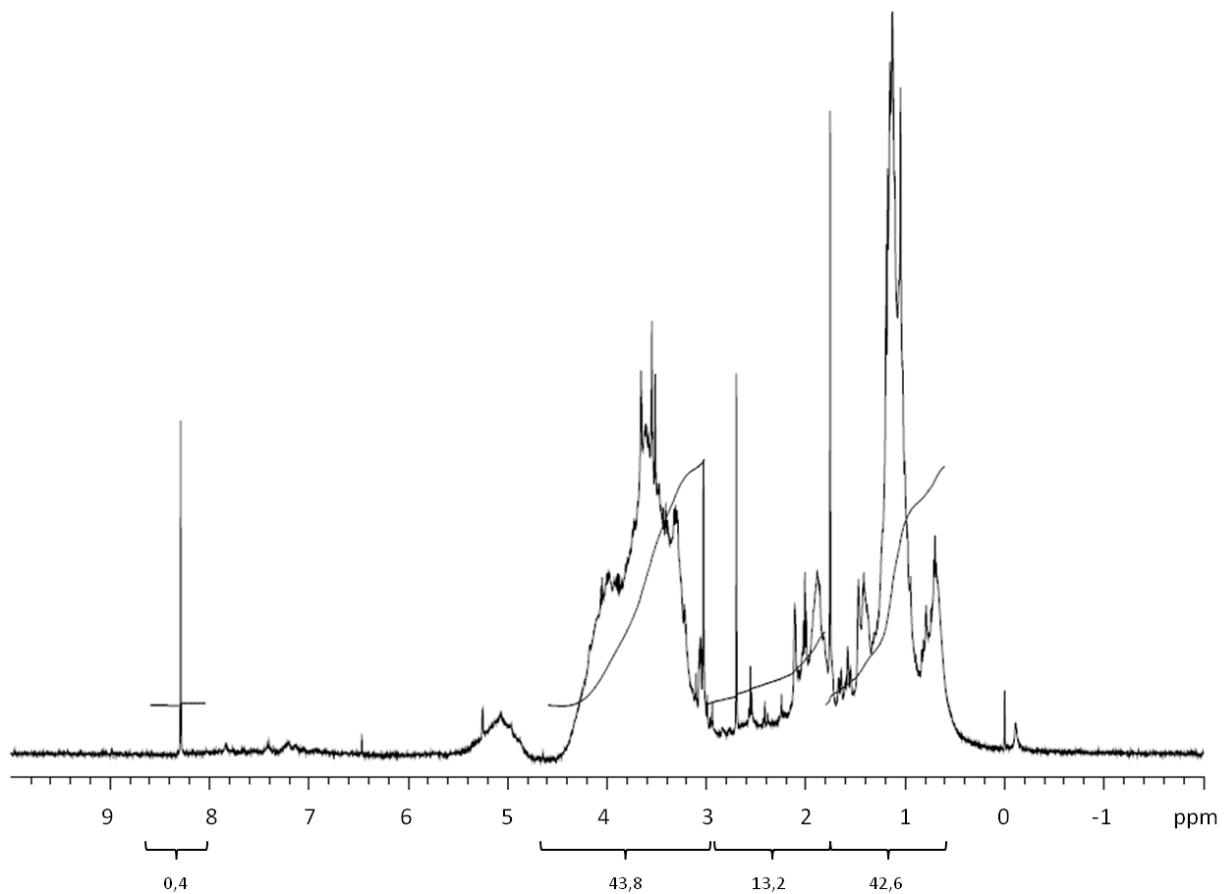
Priloga A10:  $^1\text{H}$  NMR spekter morske COM iz decembra 2012



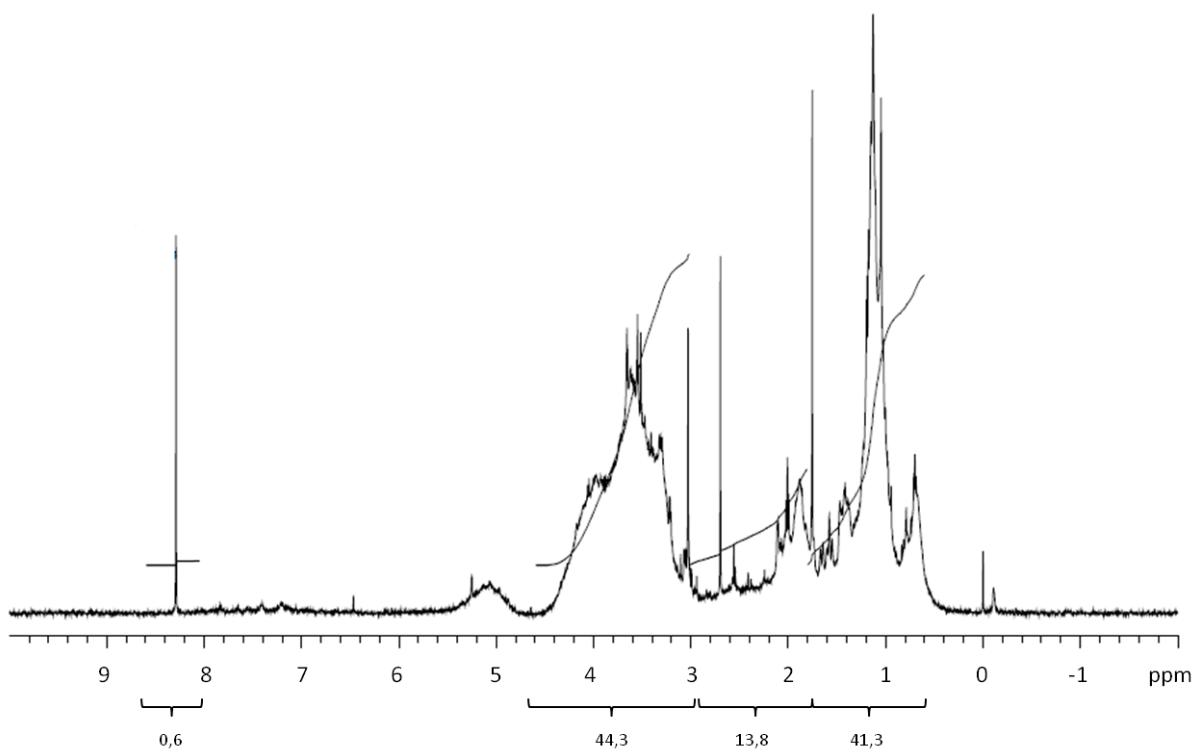
Priloga A11:  $^1\text{H}$  NMR spekter COM izliva reke Soče pri slanosti 16 psu



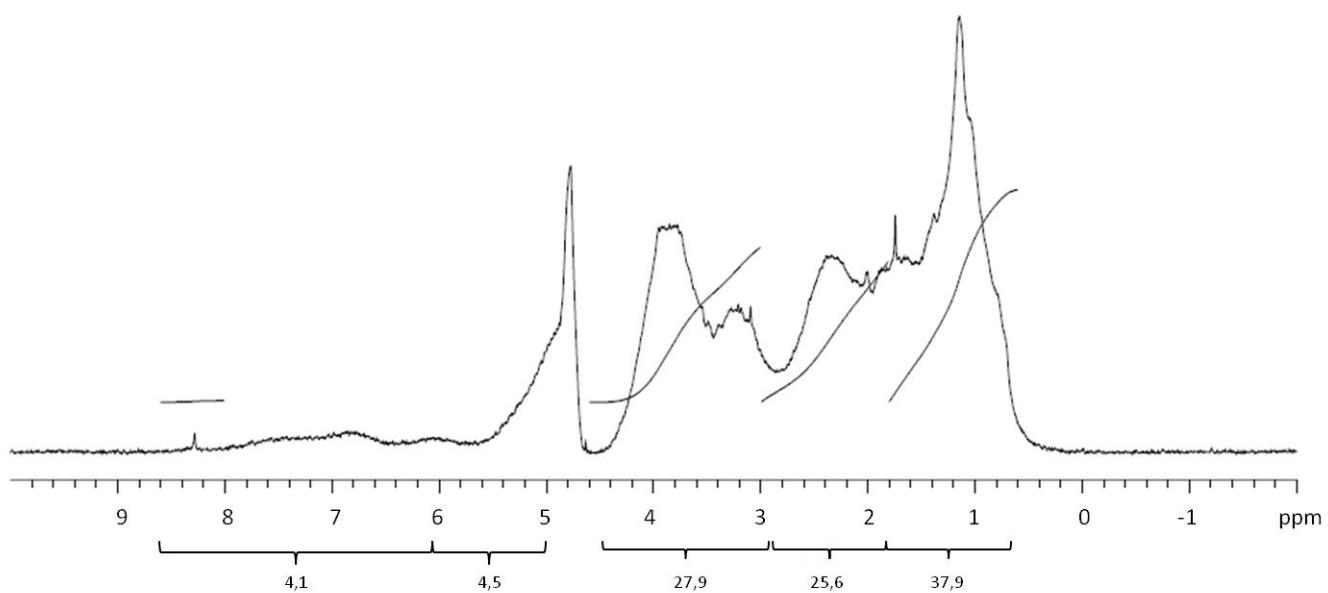
Priloga A12:  $^1\text{H}$  NMR spekter COM izliva reke Soče pri slanosti 26 psu



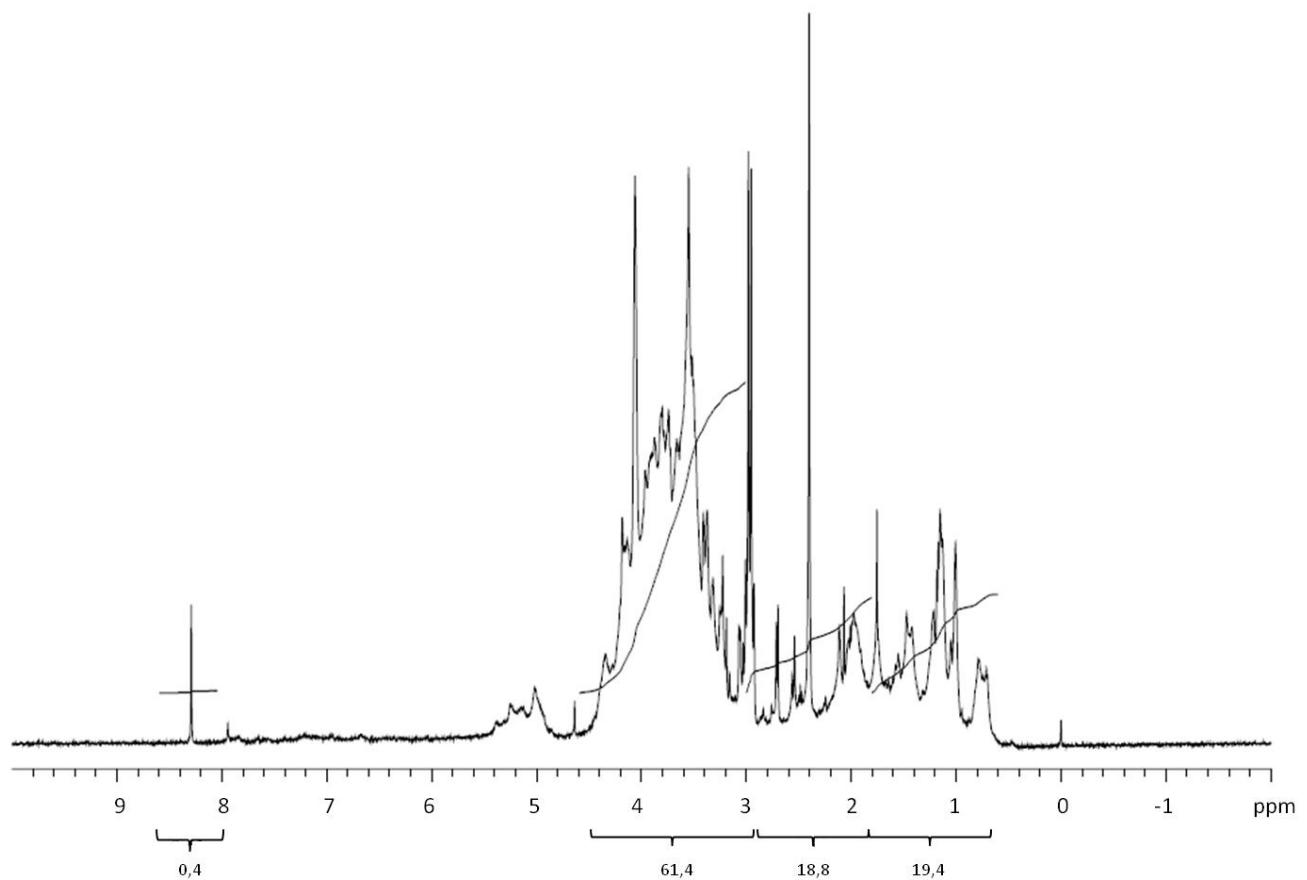
Priloga A13:  $^1\text{H}$  NMR spekter COM izliva reke Soče pri slanosti 33 psu



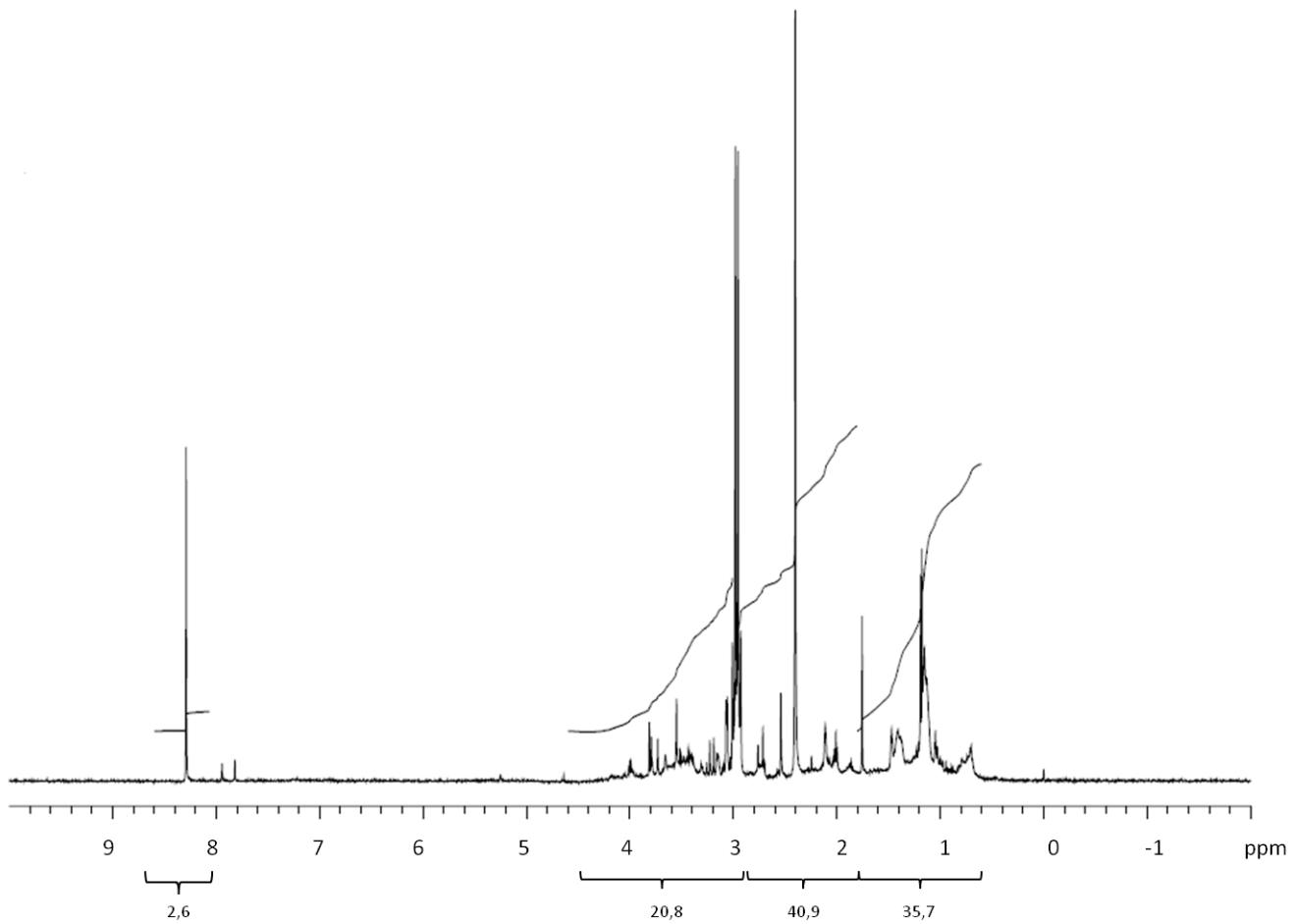
Priloga A14:  $^1\text{H}$  NMR spekter rečne COM reke Soče



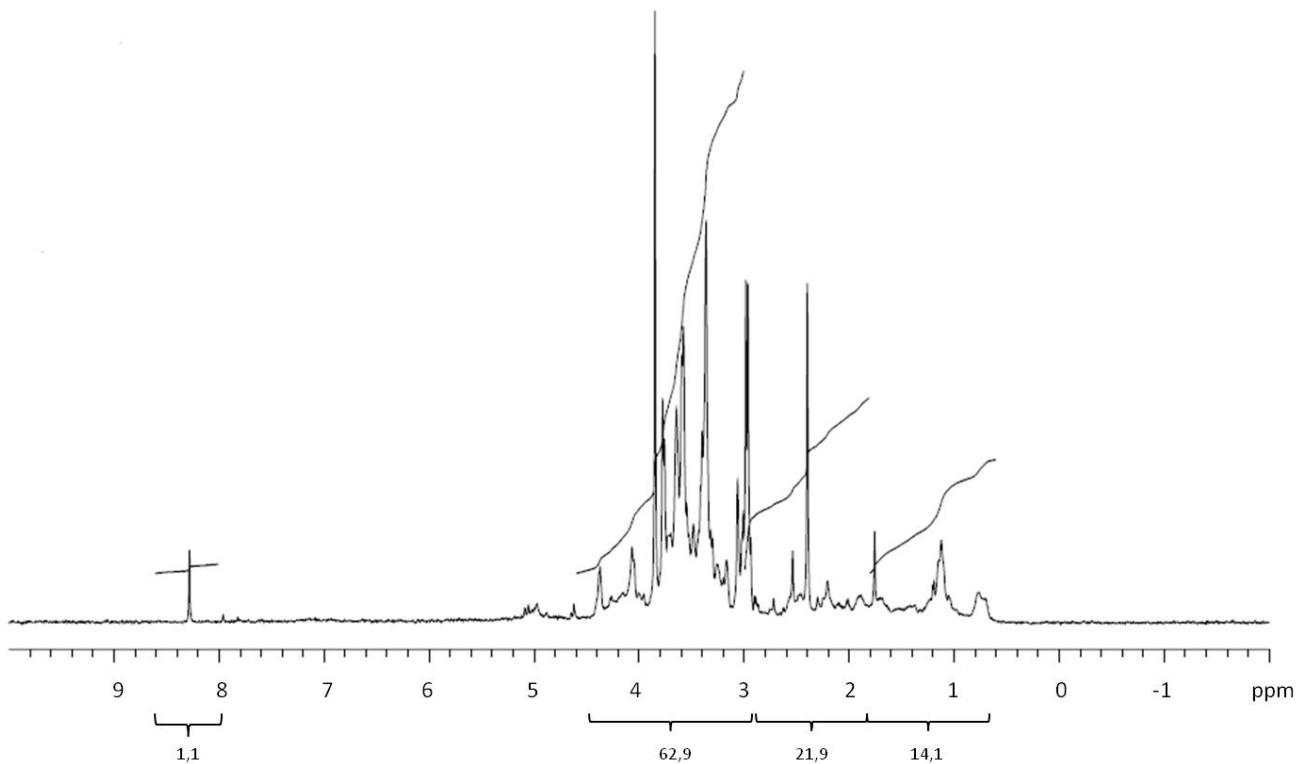
Priloga A15:  $^1\text{H}$  NMR spekter retentata EPS (5 kDaR), ki ga je izločil nanoflagelat *Tetraselmis marina*



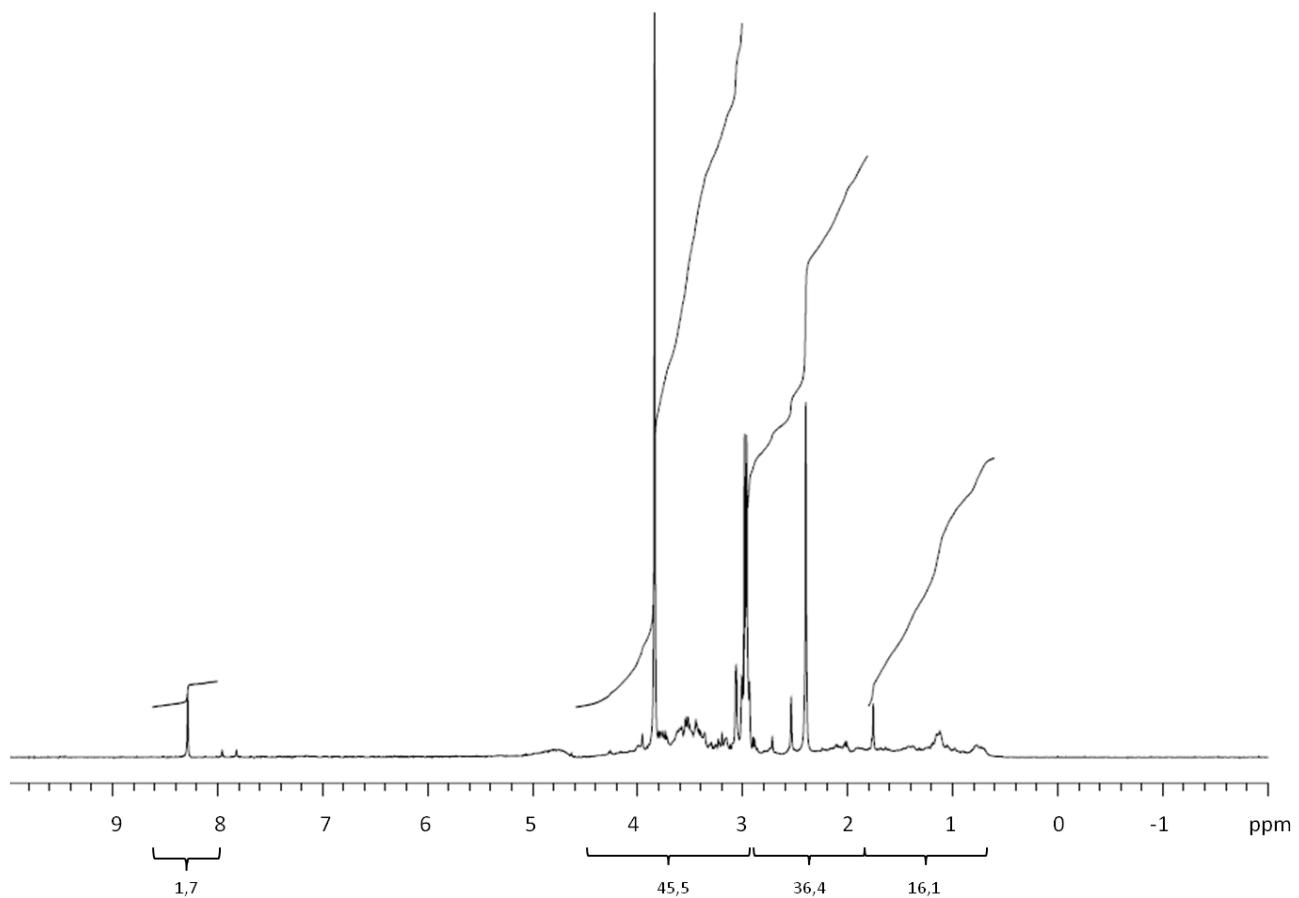
Priloga A16:  $^1\text{H}$  NMR spekter permeata EPS (5 kDaF), ki ga je izločil nanoflagelat *Tetraselmis marina*



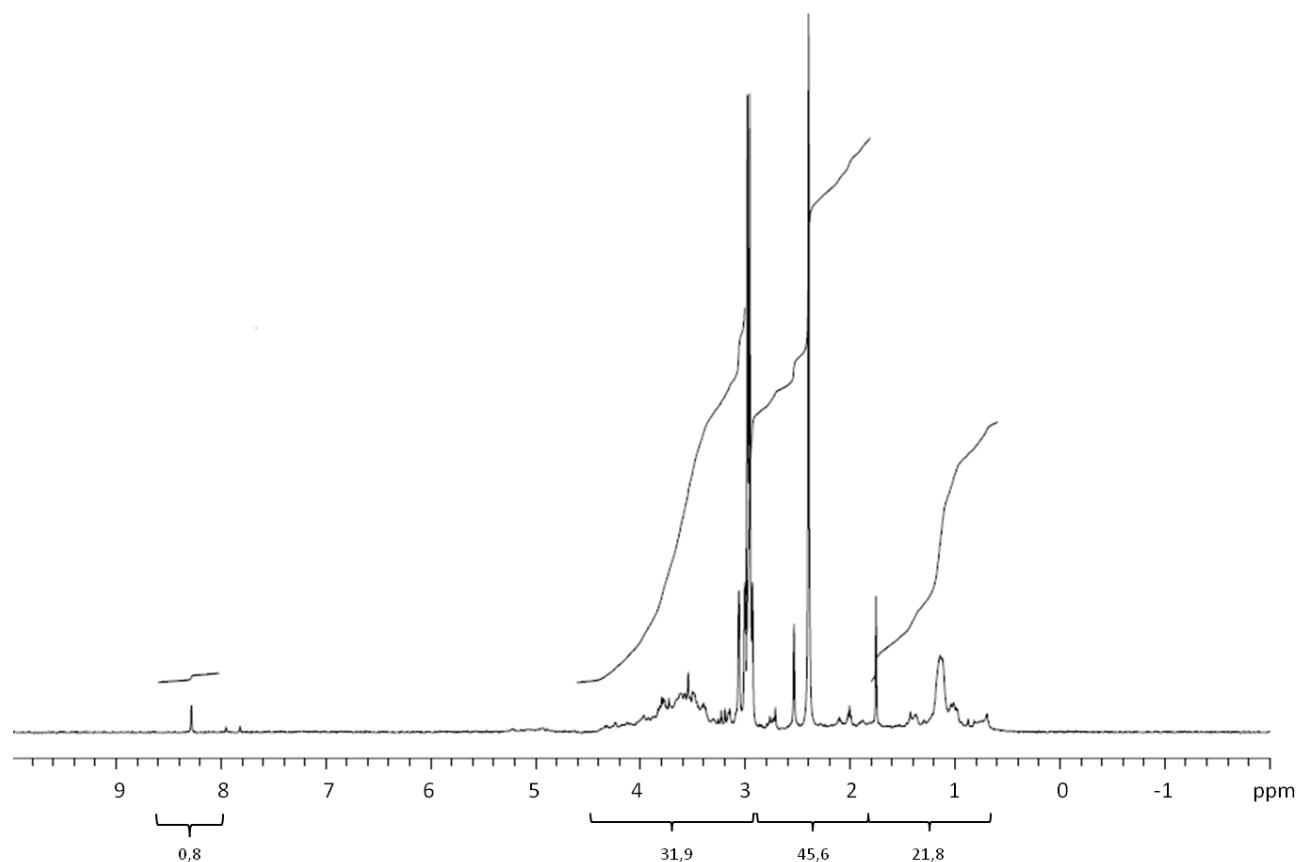
Priloga A17:  $^1\text{H}$  NMR spekter retentata EPS (5 kDaR), ki ga je izločila diatomeja *Chaetoceros socialis*



Priloga A18:  $^1\text{H}$  NMR spekter permeata EPS (5 kDaF), ki ga je izločila diatomeja *Chaetoceros socialis*



Priloga A19:  $^1\text{H}$  NMR spekter retentata EPS (5 kDaR), ki ga je izločil dinoflagelat *Prorocentrum minimum*



Priloga A20:  $^1\text{H}$  NMR spekter permeata EPS (5 kDaF), ki ga je izločil dinoflagelat *Prorocentrum minimum*

