

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**VPLIV BIOKEMIČNE SESTAVE MEDUZ NA KROŽENJE
ORGANSKE IN ANORGANSKE SNOVI V MORJU**

DIPLOMSKO DELO

Helena JERMAN

Mentor: doc. dr. Valentina Turk

Nova Gorica, 2011

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Helena Jerman

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Valentini Turk za vodenje in strokovne nasvete, predvsem pa za optimizem in spodbudne besede pri izdelavi diplomskega dela. Prav tako gre iskrena zahvala Tinkari Tinta in Tjaši Kogovšek za pomoč in svetovanje, tako tekom eksperimentalnega dela, kot pri izdelavi pisnega izdelka.

Hvala g. Milijanu Šiški za pomoč pri izdelavi statistične analize podatkov ter ostalim zaposlenim na Morski biološki postaji, ki so mi kakorkoli pomagali pri opravljanju praktičnega dela diplomske naloge.

Posebna zahvala pa gre tudi mojim staršem, bratu in fantu, ki brez izjem vedno verjamejo vame in me spodbujajo. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so verjeli vame in mi vlivali optimizem.

POVZETEK

Množično pojavljanje klobučnjaških meduz je vse bolj pogost pojav po svetu, kot tudi v Jadranskem morju. Ko se pojavljajo v velikem številu povzročajo gospodarsko škodo v turizmu in ribištvi, vplivajo pa tudi na ekološko stanje morskega ekosistema, ker povzročajo spremembe v prehranski verigi ali zaradi izločanja organskih in anorganskih snovi, kot produktov metabolizma ali razgradnje. Za pravilno oceno njihovega vpliva na ekosistem je pomembna kemična sestava meduz. Meduze vsebujejo velike količine vode in soli v mezogleji, kar otežuje analizne postopke. V literaturi se pojavlja mnogo različnih načinov analiz, zato sem v diplomski nalogi sistematično testirala različne postopke priprave vzorcev in dve metodi določanja proteinov. Osnovne morfološke in kemične parametre sem določila na vzorcih meduz uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.), mesečinke (*Pelagia noctiluca*) in morskega klobuka (*Rhizostoma pulmo*). Ugotovili smo, da se vsebnost vode v meduzah giblje od 96,44 do 98,88 %. Vsebnost proteinov se je v različnih vrstah klobučnjaških meduz iz Tržaškega zaliva razlikovala. Najvišjo vsebnost proteinov sem izmerila v vzorcih mesečinke (33,18 % suhe mase), visoka pa je bila tudi v tkivih ustnih ramen morskih klobukov (31,55 % suhe mase), medtem ko je bila vsebnost v tkivih klobuka nekoliko nižja (25,08 % suhe mase). Vsebnost proteinov v vzorcih uhatega klobučnjaka je bila v povprečju za več kot 2-krat nižja kot pri mesečinki. Velik delež proteinov v tkivih meduz se odraža v razmeroma nizkem razmerju C/N, kar smo potrdili z določanjem elementne sestave. Na rezultate lahko vplivajo različni postopki priprave vzorca, med katerimi imata sušenje meduz in dializa največji vpliv.

Ključne besede: morski ekosistem, meduze, *Aurelia* spp., *Pelagia noctiluca*, *Rhizostoma pulmo*, proteini, elementna sestava, Jadransko morje

SUMMARY

Massive jellyfish aggregations are occurring in many areas worldwide as well as in the Adriatic Sea. When appearing in large numbers jellyfish can cause severe economic damage to fisheries and tourism. Jellyfish have an impact on the marine ecosystem through release of organic and inorganic nutrients either through their metabolism or as they decompose. In order to properly assess their impact on the ecosystem it is important to study their chemical composition. Large amounts of water and the mineral content in jellyfish "mezoglea" make the analytical procedures difficult. The literature describes many different methods used to analyze jellyfish biochemical composition, therefore in my work I have systematically tested various procedures of sample preparation and two methods of determining protein concentration. Basic morphological and chemical parameters were determined on samples of moon jellyfish (*Aurelia* spp.), mauve stinger (*Pelagia noctiluca*) and *Rhizostoma pulmo*. We found that the water content in the different jellyfish ranges from 96.4 to 98.9 %. However, protein content is different in three types of jellyfish in the Gulf of Trieste. The highest protein content was measured in samples of mauve stinger (33.18 % of dry weight) as well as in the tissues of the oral arms of *Rhizostoma pulmo* (31.55 % of dry weight), while the content in the umbrellar tissues was slightly lower (25.08 % of dry weight). On the other hand, protein content in samples of moon jellyfish was on average more than two times lower than in the mauve stinger. The large percentage of proteins in the tissues of the jellyfish is reflected in their relatively low C/N ratio, which was confirmed by analysis of their elemental composition. The results may be affected by different procedures of

sample preparation, among which drying jellyfish and dialysis seem to have the greatest impact.

Key words: marine ecosystem, jellyfish, *Aurelia* spp., *Pelagia noctiluca*, *Rhizostoma pulmo*, proteins, elemental composition, Adriatic Sea

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Opredelitev problema in namen dela	1
1.2	Delovne hipoteze.....	2
2	TEORETIČNE OSNOVE	3
2.1	Množično pojavljanje kloбуčnjakov	3
2.2	Vpliv množičnega pojavljanja kloбуčnjakov na morski ekosistem ...	6
2.3	Opis kloбуčnjaških meduz	7
2.3.1	Uhati kloбуčnjak (<i>Aurelia</i> spp.) in življenjski krog.....	7
2.3.2	Mesečinka (<i>Pelagia noctiluca</i>) in življenjski krog.....	8
2.3.3	Morski klobuk (<i>Rhizostoma pulmo</i>) in življenjski krog	9
2.4	Raziskave o biokemični in elementni sestavi kloбуčnjaških meduz	11
3	EKSPERIMENTALNI DEL.....	14
3.1	Materiali in oprema	14
3.1.1	Materiali.....	14
3.1.2	Laboratorijska oprema	14
3.1.3	Kemikalije in puferske raztopine	15
3.2	Metode.....	16
3.2.1	Vzorčenje na terenu.....	16
3.2.2	Postopki priprave vzorcev.....	18
3.2.3	Kemijske analize meduz	19
3.2.4	Vrednotenje in statistična analiza	24
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1	Biometrične meritve kloбуčnjaških meduz	25
4.2	Kemijske analize kloбуčnjaških meduz.....	26

4.2.1	Vsebnost vode v klobučnjaških meduzah	26
4.2.2	Testiranje metodološkega postopka za določitev koncentracije proteinov v tkivu meduze	31
4.2.3	Vsebnost proteinov v klobučnjaških meduzah.....	36
4.2.4	Elementna sestava (C, N) klobučnjaških meduz	42
4.2.5	Vpliv biokemične sestave meduz na kroženje organske in anorganske snovi v morju	46
5	ZAKLJUČKI.....	47
6	VIRI.....	49

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica 1: Povzetek literaturnih podatkov lokacij in vrste meduz po svetu z navedenimi možnimi vzroki množičnega pojavljanja (povzeto po Purcell in sod., 2007)	4
Preglednica 2: Literaturni podatki elementne (ogljik in dušik) in biokemične sestave (proteini, lipidi in ogljikovi hidrati) želatinoznega in neželatinoznega zooplanktona. Vsebnost vode je izražena kot % mokre mase, medtem ko so ostale vrednosti izražene kot % suhe mase (povzeto po Bailey in sod., 1995).....	13
Preglednica 3: Laboratorijska oprema, ki sem jo uporabila pri laboratorijskem delu ..	14
Preglednica 4: Seznam uporabljenih vzorcev klobučnjaških meduz za kemijsko analizo.....	17
Preglednica 5: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode liofiliziranih vzorcev (L) mesečink (<i>Pelagia noctiluca</i>), vzorčenih v Tržaškem zalivu oktobra 2006	26
Preglednica 6: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode v liofiliziranih vzorcih (L) uhatega klobučnjaka (<i>Aurelia</i> spp.), vzorčenih na Mljetu marca 2006	27
Preglednica 7: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode v liofiliziranih vzorcih (L) uhatega klobučnjaka (<i>Aurelia</i> spp.), vzorčenih na Mljetu oktobra 2006	27
Preglednica 8: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode v liofiliziranih vzorcih (L) uhatega klobučnjaka (<i>Aurelia</i> spp.), vzorčenih v Tržaškem zalivu marca 2007.....	28
Preglednica 9: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode v sušenih vzorcih (S = sušilnik, 60 °C) uhatega klobučnjaka (<i>Aurelia</i> spp.), vzorčenih v Tržaškem zalivu aprila 2007.....	29
Preglednica 10: Test enofaktorske analize variance med povprečnimi deleži suhe mase meduz, sušenih na različen način (df = število prostostnih stopenj, F = F-razmerje, p = verjetnost).....	30
Preglednica 11: Povprečne vrednosti in standardni odkloni deležev proteinov v suhi masi nedializiranih vzorcev uhatega klobučnjaka AA17, določenih po metodi BCA in Bradfordovi metodi	33
Preglednica 12: Test dvofaktorske analize variance med metodama za določanje vsebnosti proteinov v suhi masi meduz (df = število prostostnih stopenj, F = F-razmerje, p = verjetnost).....	33
Preglednica 13: Povprečne vrednosti in standardni odkloni deležev proteinov v suhi masi dializiranih vzorcev uhatega klobučnjaka AA17, določenih po metodi BCA in Bradfordovi metodi	34
Preglednica 14: Test dvofaktorske analize variance med metodama za določanje vsebnosti proteinov v suhi masi meduz (df = število prostostnih stopenj, F = F-razmerje, p = verjetnost).....	34

Preglednica 15: Povprečne vrednosti in standardni odkloni deležev proteinov v suhi masi dializiranih vzorcev uhatega klobučnjaka AA17, določenih po BCA metodi	35
Preglednica 16: Povprečni deleži proteinov v posameznih osebkih mesečinke, vzorčenih oktobra 2006. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator)	36
Preglednica 17: Povprečni deleži proteinov v posameznih vzorcih morskega klobuka, vzorčenih januarja in februarja 2007. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator, S = sušilnik pri 60 °C).....	37
Preglednica 18: Povprečni deleži proteinov v posameznih osebkih uhatega klobučnjaka, vzorčenih marca in aprila 2007. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator, S = sušilnik pri 60 °C)	38
Preglednica 19: Test enofaktorske analize variance med povprečnimi deleži proteinov v meduzah, sušenih na različen način (df = število prostostnih stopenj, F = F-razmerje, p = verjetnost).....	39
Preglednica 20: Povprečni deleži proteinov v posameznih osebkih uhatega klobučnjaka, vzorčenih marca 2006. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator)	39
Preglednica 21: Povprečni deleži proteinov v posameznih osebkih uhatega klobučnjaka, vzorčenih oktobra 2006. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator)	39
Preglednica 22: Test enofaktorske analize variance med povprečnimi deleži proteinov v meduzah, vzorčenih na različnih lokacijah (df = število prostostnih stopenj, F = F-razmerje, p = verjetnost).....	41
Preglednica 23: Primerjava deležev C, N in razmerja C/N v dializiranih osebkih mesečinke (<i>Pelagia noctiluca</i>), uhatega klobučnjaka (<i>Aurelia</i> spp.) in morskega klobuka (<i>Rhizostoma pulmo</i>) iz Tržaškega zaliva, predhodno sušenih v liofilizatorju ..	44
Preglednica 24: Primerjava povprečnih deležev proteinov z razmerji C/N v suhi masi dializata, različnih klobučnjaških meduzah iz Tržaškega zaliva.....	45

SEZNAM SLIK

Slika 1: Uhati klobučnjak (<i>Aurelia</i> spp.)	8
Slika 2: Mesečinka (<i>Pelagia noctiluca</i>)	9
Slika 3: Morski klobuk (<i>Rhizostoma pulmo</i>)	10
Slika 4: Shema postopka predpriprave vzorca in določanja količine proteinov z uporabo metode BCA in metode po Bradfordu	23
Slika 5: Povprečne vrednosti in standardni odklon deležev suhe mase v meduzah, posušeni v liofilizatorju in sušilniku pri 60 °C (n = 16)	30
Slika 6: Povprečne vrednosti in standardni odklon deležev proteinov v suhi masi vzorca, raztopljenega v štirih različnih medijih (deionizirani vodi MiliQ, pufru P1, P2 in P3), določenih z metodo BCA in Bradfordovo metodo. Vrednosti so povprečja treh meritev znotraj istega vzorca (*opravljena je bila le ena meritev).	32
Slika 7: Povprečni deleži proteinov določenih v dializiranih vzorcih mesečinke glede na suho maso meduze (n = 10)	37
Slika 8: Povprečni deleži proteinov določenih v dializiranih vzorcih uhatih klobučnjakov glede na velikostni razred meduze (n = 9)	40
Slika 9: Povprečne vrednosti in standardni odklon deležev proteinov v suhi masi meduz <i>Pelagia noctiluca</i> , <i>Rhizostoma pulmo</i> (R = ustna ramena, K = klobuk) in <i>Aurelia</i> spp. v Tržaškem zalivu	41

1 UVOD

Množično pojavljanje klobučnjaških meduz in njihovo razširjanje v vedno nove habitate je vse bolj pogost pojav po svetu, kot tudi v slovenskem delu Jadranskega morja. Meduze klobučnjakov se pojavljajo sezonsko. Ko se pojavljajo v velikem številu, povzročajo gmotno gospodarsko škodo predvsem v turizmu in ribištvi, nevšečnosti pa povzročajo tudi na hladilnih sistemih jedrskih elektrarn in obratih za razsoljevanje (Purcell in sod., 2007). Vplivajo pa tudi na ekološko stanje morskega ekosistema zaradi sprememb v prehranski verigi ali zaradi izločanja organske in anorganske snovi, kot produktov metabolizma. Dosedanje raziskave so pokazale, da so pomembne tudi spremembe, ki nastajajo kot posledica razgradnje meduzne populacije. Kljub velikim odstotkom vode v telesu klobučnjakov (~ 95 %), lahko v času množičnega pojavljanja odmrle populacije služijo kot pomemben vir ogljika v ekosistemu. Bakterijska združba hitro razgradi odmrli meduzni material, pri čemer pride do povečanja bakterijske abundance in s tem novonastale bakterijske biomase, ter sproščanja anorganskih hranil (Titelman, 2006; Tinta in sod., 2010). Zaradi intenzivne razgradnje se slabša nasičenost vod s kisikom, kar lahko privede do lokalne hipoksije (West in sod., 2009; Tinta in sod., 2010). V obalnih habitatih se, ob odsotnosti naravnega sovražnika, v biomasi meduz zaradi njihove številčnosti akumulirajo velike količine biološko pomembnih elementov ogljika, dušika in fosforja. Prenos v višje trofične nivoje je torej odsoten, kar negativno vpliva na kroženje elementov in prenos energije.

1.1 Opredelitev problema in namen dela

Največja pomanjkljivost dosedanjih raziskav na tem področju so podatki same kemične sestave posameznih vrst meduz, da bi lahko pravilno ocenili vpliv razgradnih produktov na ekosistem. V literaturi se pojavlja mnogo različnih načinov analize, zato obstaja potreba po sistematični optimizaciji metode. Meduze so za analize kemične sestave težavni organizmi, zaradi velike količine soli v njihovi mezogleji.

Namen naše raziskave je bil proučiti kemično sestavo uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.), mesečinke (*Pelagia noctiluca*) in morskega klobuka (*Rhizostoma pulmo*), ki se v zadnjih letih vse bolj pogosto in številčno pojavljajo v Tržaškem zalivu. V diplomskem delu smo se osredotočili na naslednje cilje:

- Določitev in primerjava osnovnih biometričnih parametrov različnih vrst meduz.
- Določitev vsebnosti vode in suhe mase v meduzah.
- Testiranje metodološkega postopka priprave vzorcev za določitev koncentracije proteinov v tkivih meduz:
 - primerjava občutljivosti in ponovljivosti metode BCA in Bradfordove metode,
 - vpliv soli (nedializirani, dializirani vzorci) na določanje koncentracije proteinov,
 - vpliv ekstrakcijskega pufra na sprostitvev netopnih proteinov v tkivih meduz.

- Določitev in primerjava vsebnosti proteinov v tkivu različnih meduz.
- Določitev in primerjava elementne sestave (C, N) različnih meduz.
- Primerjava kemične sestave uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.) vzorčenega v Tržaškem zalivu in na Mljetu.

1.2 Delovne hipoteze

V diplomskem delu sem si postavila naslednje hipoteze:

- različen način sušenja meduz (liofilizator, sušilnik na 60 °C) in dializa vzorcev vpliva na delež suhe mase v meduzi in rezultate kemične analize;
- vsebnost proteinov in elementna sestava je v različnih vrstah klobučnjakov meduz različna;
- vsebnost proteinov se z velikostjo in spolno zrelostjo meduze veča;
- organski delež meduz je večinsko zgrajen iz proteinov, kar se kaže v razmeroma nizkem razmerju C/N.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Množično pojavljanje klobučnjakov

Želatinozni zooplankton, kamor spadajo klobučnjaške meduze, meduze drugih ožigalkarjev ter drugih skupin kot so plaščarji in rebrače, se v zadnjih desetih letih vse pogosteje in v večjem številu pojavlja široko po svetu (Mills, 2001). V našem opisovanju se bomo omejili na meduze klobučnjakov, ki jih bomo imenovali krajše meduze.

Gosta populacija meduz predstavlja naravni element morskega ekosistema, vendar se zaradi vse večje številčnosti in njihovega razširjanja v nove habitate spreminja vzpostavljeno ravnovesje v morskem ekosistemu (Richardson in sod., 2009). Nival in Gorsky (2001) sta masovno pojavljanje želatinoznih organizmov pripisala zmožnosti učinkovitejše izrabe dostopnih hranilnih snovi v primerjavi z drugimi vrstami, zmožnosti izogibanja plenilcem in hitre reprodukcije. Purcell in sod. (2007) navajajo, da se meduze pojavljajo v tako velikem številu zaradi menjavanje spolnega in nespolnega razmnoževanja. Masovni pojavi meduz so kratkotrajni, trajajoči nekaj tednov ali mesecev, nato pa število osebkov populacije hitro upade, potone in se razgradi (West in sod., 2009). Pojavljajo se predvsem v estuarijih in delno zaprtih morskih ekosistemi po svetu (Purcell, 1999), vendar jih lahko opazimo tudi v odprtih oceanskih vodah. Večji problem predstavljajo množična pojavljanja v delno zaprtih in obalnih habitatih, kjer navadno meduze nimajo naravnega sovražnika. Elementi, ki jih meduze asimilirajo, se kopičijo v njihovi biomi in se ne prenesejo v višje trofične nivoje, kar lahko negativno vpliva na kroženje elementov in prenos energije.

V zadnjih letih so po svetu opažene masovne populacije dvajsetih vrst klobučnjaških meduz (Richardson in sod., 2009), ki v večini primerov pripadajo redom *Semaeostomeae* in *Rhizostomeae* (Hammer in Dawson, 2009). Podatki masovnih pojavov klobučnjaških meduz po svetu so zbrani v spodnji preglednici in sicer za vrste: *Aurelia* spp., *Chrysaora hysoscella*, *Cotylorhiza tuberculata*, *Cyanea capillata*, *Nemopilema nomurai*, *Pelagia noctiluca*, *Periphylla periphylla*, *Rhizostoma pulmo*, *Sanderia malayensis*. Najpogostejše se kot možne povzročitelje za množična pojavljanja meduz po svetu omenja antropogene vplive, kamor spadajo prekomerni ribolov (8 vrst meduz), eutrofikacija (5 vrst meduz), grajene strukture (4 vrst meduz), invazija tujerodnih vrst želatinoznega planktona (3 vrst meduz) in akvakultura (2 vrsti meduz). Poleg antropogenih dejavnikov, pa lahko na številčnost populacije vplivajo tudi dejavniki okolja, kot so klimatske spremembe (6 vrst meduz) (Purcell in sod., 2007). Povzetek literaturnih podatkov lokacij, vrste meduz po svetu z navedenimi možnimi vzroki množičnega pojavljanja meduz je podan v preglednici 1.

Preglednica 1: Povzetek literaturnih podatkov lokacij in vrste meduz po svetu z navedenimi možnimi vzroki množičnega pojavljanja (povzeto po Purcell in sod., 2007)

K = klimatske spremembe, E = evtrofikacija, R = ribolov, A = akvakultura, G = grajene strukture, I = invazija tujerodnih vrst

+ = verjetno, ? = neznano ali neraziskano, - = neverjetno

Lokacija	Vrste meduz	Možni vzroki za množična pojavljanja						Viri
		K	E	R	A	G	I	
Tokijski zaliv, morje Seto	<i>Aurelia spp.</i>	+	+	+	+	+	+	Ishii (2001), Uye in Ueta (2004)
Vzhodnoazijska morja	<i>Nemopilema nomurai</i>	+	+	+	?	+	-	Uye (2008)
Estuar reke Yangtze	<i>Cyanea</i> , <i>Sanderia malayensis</i>	+	+	+	?	+	+	Ding in Cheng, Cheng in sod., Xian in sod. (2005)
Mar Menor, Jadransko morje	<i>Cotylorhiza</i> , <i>Rhizostoma</i>	?	+	+	+	+	+	Pages (2001)
Mediterran, Jadransko morje	<i>Pelagia noctiluca</i>	+	-	+	-	-	-	Goy in sod. (1989), Purcell in sod. (1999b)
Benguelski tok	<i>Chrysaora hysoscella</i>	?	-	+	-	-	-	Lynam in sod. (2006)
Zaliv Chesapeake	<i>Chrysaora quinquecirrha</i>	+	+	+	-	-	-	Purcell in Decker (2005)
Beringovo morje	<i>Chrysaora melanaster</i>	+	-	+	-	-	-	Brodeur in sod. (2008)
Lurefjord	<i>Periphylla periphylla</i>	?	-	?	-	-	-	Eiane in sod. (1999)

Množična pojavljanja klobučnjakov v Sredozemlju in severnem Jadranskem morju

V zadnjih 200 letih so bila masovna pojavljanja skifomeduze mesečinke zabeležena v povprečju na vsakih 12 let, v zahodnem delu Sredozemskega morja (Goy in sod., 1989). Množična pojavljanja mesečink v Sredozemskem morju so v zadnjih desetletjih povzročila splošen preplah med ljudmi, predvsem zaradi nevarnosti ožigov, kar ogroža turizem, ki predstavlja enega izmed glavnih virov dohodka za sredozemske države. Poleg turizma pa ogrožajo tudi ribištvo, saj se goste populacije meduz ujamejo v ribiške mreže in tako zmanjšajo količino ulova (Purcell in sod., 1999). Odsotnost bentoškega stadija v življenjskem krogu omogoča mesečinki večjo razpršenost kot pri drugih vrstah, zato lahko včasih populacije mesečink opazimo tudi izven običajnega območja razširjenosti (Malej in Malej, 2004). Med leti 1977-1986 in 2004-2007, kot tudi v preteklosti, so bila zabeležena množična pojavljanja mesečink tudi v severnem Jadranskem morju (Kogovšek in sod., 2009).

Uhati klobučnjak se množično pojavlja ob obalah v Sredozemlju, predvsem v zaprtih in delno zaprtih morskih ekosistemih. Pogosta množična pojavljanja uhatega klobučnjaka so bila zabeležena v severnem Jadranskem morju v delno zaprtih zalivih in lagunah, pa tudi v jezerih kot je Mljetško jezero (Benović in Lučić, 2001; Malej in sod., 2007).

Lotan in sod. (1994) v preglednem članku navajajo pozitivno korelacijo med onesnaženostjo morja in gostimi populacijami meduz klobučnjaka *Rhopilema* v obalnih vodah Mersinovega zaliva v Turčiji in uhatega klobučnjaka v Egejskem morju. Pri prekomernem onesnaženju morja pride do povečanega vnosa anorganskih in organskih hranilnih snovi, kar vodi v eutrofikacijo. Posledica eutrofikacije je povečana produkcija in kopičenje biomase organizmov v različnih trofičnih nivojih, motnost vodnega stolpca in hipoksija (Arai, 2001; Benović in sod., 2000; Purcell in sod., 2001). Nastale razmere favorizirajo razširjanje meduz, saj so na nižje koncentracije kisika in motnost vodnega stolpca bolj odporne, medtem ko se ribe takim razmeram izogibajo (Arai, 2001). Z opazovanjem pojavljanja *Rhopilema nomadice* skozi vse leto, so Lotan in sod. (1994) prekomerno pojavljanje meduz pripisali presežku hranil v vodi in naraščajoči temperaturi.

V letu 2003 in 2004 so bila zabeležena masovna pojavljanja morskega klobuka v severnem Jadranskem morju (Kogovšek in sod., 2009). Najbolj pogosta pojavljanja morskega klobuka so ob vzhodnih sredozemskih obalah v poletnih mesecih. Čeprav za morski klobuk niso tako značilna množična pojavljanja ob obalah, pa so bila leta 1972, 1979 in 1986 ob obalah Libanona zabeležena obdobja s prekomerno številčnostjo populacije (Lakkis, 1987). V letu 1986 je bila populacija številčno izrazitejša v obdobju od konca maja do sredine avgusta, z najvišjo gostoto v juliju. Avtor je vzrok za izbruh populacije pripisal nenadnemu povišanju temperature površinske vode v maju ter spremembi slanosti. Posledično temperatura v okolju vpliva na primarno in sekundarno produkcijo v morju ter s tem na količino hrane za meduzo. Poleg omenjenega področja se je istočasno v letu 1986 morski klobuk v prekomernem številu pojavil ob obalah Sirije. Goste populacije pa so bile opažene tudi ob obalah Toskane v Italiji (10 julij, 2003) in zahodni Franciji blizu La Rochelle (15 avgust, 2003), (Lilley in sod., 2009).

S preveliko abundanco klobučnjakov se od leta 1995 soočajo tudi v laguni Mar Menor v Španiji. Množična pojavljanja so se pojavila po odprtju kanala, s čimer se je v laguni zmanjšala slanost od 52 na 45 PSU (angl. *practical salinity unit* – praktična enota slanosti). Poleg tega je območje podvrženo velikemu onesnaževanju iz kmetijskih površin in urbanih naselij. Največ nevšečnosti jim v poletnih mesecih povzročata meduzi morskega klobuka in morske cvetače (*Cotylorhiza tuberculata*). Najvišja

gostota omenjenih klobučnjakov je bila zabeležena poleti 1997 (Perez in sod., 2002). Nekateri avtorji, kot možni vzrok za vse večjo abundanco novo naseljenih populacij klobučnjaških meduz, pripisujejo visoki koncentraciji dušika (N) v vodi (Purcell, 2007).

2.2 Vpliv množičnega pojavljanja klobučnjakov na morski ekosistem

Veliko časa je med znanstveniki veljala paradigma o meduzah kot slepem koncu prehranjevalne verige, ki pa danes ne velja več. Meduze predstavljajo pomembni člen v morskih združbah, tako v vlogi plenilcev kot tudi redkeje plena, s čimer vplivajo na kroženje organske snovi in prenos energije prek prehranjevalne verige. Predvsem v odprtih oceanskih vodah predstavljajo meduze hrano nekaterim vrstam ekonomsko pomembnih rib (Purcell in Arai, 2001), morskim želvam (Witt in sod., 2007) in celo nekaterim meduzam (Arai, 2005). V primerjavi z drugimi morskimi organizmi, imajo meduze zelo nizko energijsko gostoto na mokro maso, pa vendar so se nekatere večje morske želve, kot je orjaška usnjača (*Dermochelys coriacea*) in riba morski mesec (*Mola Mola*) sposobne dlje časa prehranjevati z njimi (Doyle in sod., 2007). V obdobju, ko se meduze pojavljajo v visokem številu, izvajajo močan plenilski pritisk na mikrozooplankton in mezozooplankton (Larson, 1986), s čimer v svojo biomaso akumulirajo velike količine biološko pomembnih elementov in energije, ki pa se, ob odsotnosti njihovih plenilcev, predvsem v delno zaprtih in obalnih habitatih, ne prenesejo na višje trofične nivoje. Meduze lahko tako vplivajo na kroženje elementov in prenos energije.

Z neposrednim plenilskim vplivom na mezozooplankton in mikrozooplankton, pa meduze posredno vplivajo na kopičenje biomase fitoplanktona. Na povezavo med meduzami in kopičenjem fitoplanktona so že opozarjali (Vasas in sod., 2007), medtem ko so Pitt in sodelavci (2007) empirično dokazali, da sinergizem visoke abundance meduz in eutrofikacije pozitivno vpliva na pojav rdečih plim. Dodatno klobučnjaške meduze s svojim metabolizmom v okolje izločajo hranila, predvsem amonij (NH_4^+) in fosfat (PO_4^{3-}), s čimer v obdobju visoke številčnosti prispevajo velike količine dušika in fosforja za spodbuditev primarne produkcije fitoplanktona (Schneider, 1989; Pitt in sod., 2005; Shimauchi in Uye, 2007; Tinta in sod., 2010). Nadalje lahko številčnost fitoplanktona povzroči motnost v vodnem stolpcu, kar ponovno privede do razgradnje organske snovi in zmanjševanja koncentracij kisika. V takem okolju imajo klobučnjaki selektivno prednost pred drugimi organizmi, ker tolerirajo območja nižjih koncentracij kisika (Purcell in Arai, 2001).

Povečana abundantnost klobučnjaških meduz v morskem okolju lahko privede tudi do zmanjšanja populacij rib, bodisi zaradi tekmovanja med meduzami in planktivornimi ribami za hrano, ali zaradi prehranjevanja skifomeduz z jajčeci in ličinkami rib (Purcell in Arai, 2001). Vedno več je podatkov, da so zaradi prelova rib, meduze, ki so nižje na prehranjevalni verigi zasedle prehrambeno nišo, ki so jo zasedale ribe (Jackson in sod., 2001; Daskalov in sod., 2007).

Plenilski pritisk klobučnjakov na zooplankton omogoča tudi porast bakterijske biomase. Meduze vplivajo na bakterijsko populacijo posredno (Turk in sod. 2008), z izvajanjem močnega plenilskega pritiska na bakteriovore, kot tudi neposredno, z izločanjem hranil in raztopljenih organske snovi v vodni stolpec (Titelman in sod., 2006; Tinta in sod., 2010). Turk in sod. (2008) so v morskih jezerih na južnojadranskem otoku Mljet z *in situ* poskusi pokazali, da se je v prisotnosti meduz povečala bakterijska abundanca in produkcija kot posledica plenjenja bakteriovorov in verjetno tudi dodatnega sproščanja

raztopljene organske snovi. Količina raztopljene organske snovi, ki jo v okolje izločajo klobučnjaške meduze, je v primerjavi s količino raztopljenega organskega ogljika, nastalega s primarno produkcijo nizka, pa vendar lahko v oligotrofnih območjih igra pomembno vlogo (Hannson in Norman, 1995).

V času masovnega pojavljanja klobučnjaških meduz, lahko odmrle populacije predstavljajo pomemben vir ogljika (C) ne le v vodnem stolpcu temveč tudi na morskem dnu. Billett in sod. (2006) so v letih z večjo abundanco meduz v Arabskem morju ocenili, da se v obliki meduzne biomase nakopiči kar 78 g ogljika/m². Odmrle meduzne populacije je tako lahko pomemben vir energije in ogljika za bentoške organizme in predvsem bakterije. Prvič so razgradnjo meduznega materiala z naravno morskno bakterijsko združbo potrdili Titelman in sodelavci (2006) in kasneje še West in sod. (2009). Veliko recikliranje elementov in povečana poraba kisika ob razgradnji odmrle biomase, lahko pripelje do hipoksije, predvsem v polzaprtih in zaprtih morjih po svetu (Pitt in sod., 2009).

2.3 Opis klobučnjaških meduz

2.3.1 Uhati klobučnjak (*Aurelia* spp.) in življenjski krog

Rod *Aurelia* naseljuje vsa morja sveta. Razširjena je vse od 40 stopinj južno do 70 stopinj severno od ekvatorja. Poleg Tržaškega zaliva v severnem Jadranskem morju, naseljuje tudi ostale predele Jadranskega in Mediteranskega morja, Črno morje, morja v severno-zahodni Evropi, na Japonskem in nekatera morja Severne Amerike. Številne so tudi v nekaterih zaprtih morskih sistemih, npr. Mljetsko jezero (Lucas, 2001; Turk in sod., 2007). Čeprav je kozmopolitka vrsta, ji bolj kot odprte vode, odgovarjajo plitkejša obalna področja, fjordi in estuariji. Prilagodljivost uhatega klobučnjaka se kaže v razširjenosti vrste v različnih morskih okoljih, ki se med seboj močno razlikujejo v temperaturi, slanosti in trofičnem stanju (Lucas, 2001).

Meduza uhatega klobučnjaka ima značilno obliko dežnika. Telo je sestavljeno iz dveh vrst celic, epiderma in gastroderma. Epiderm so celice, ki tvorijo povrhnjico, medtem ko je gastroderm plast celic, ki obdajajo gastrovaskularno votlino. Med obema plastema celic je zdrizasta snov imenovana mezogleja, ki je večinoma brez celic. Odrasla meduza ima prosojni klobuk, s premerom od 20 do 30 cm in 16 glavnih lovč z dolžino do 25 cm. Rob klobuka je razdeljen na osem režnjev in je posut s številnimi kratkimi lovčami. Zunanja povrhnjica lovč vsebuje celice knidocite, ki vsebujejo ožigalke. Med režnji so čutilni organi ropaliji, ki meduzi služijo kot vid in kot čutilo za ravnotežje. Gastrovaskularna votlina leži na spodnji strani klobuka in ima funkcijo prebavil in krvožilja. V votlino vodi ustna odprtina, ki je posuta z ožigalkami. Okrog ust so nameščene štiri obustne krpe z nagubanimi robovi (Turk, 2007). Na dnu gastrovaskularne votline ima spolno zrela meduza razvite štiri spolne žleze (gonade), ki so vijolično obarvane in imajo obliko podkve.

Uhati klobučnjak se prehranjuje s planktonom, v katerem so različni planktonski raki in ličinke školjk, deseteronožcev in drugih morskih živali, prehranjuje pa se tudi z ribjimi ikrami ter drugim zooplanktonom. Sam pa je plen klobučnjakom *Cyanea capillata* in *Aequorea victoria* in vrsti morskega polža *Coryphella verrucosa* ter nekaterih rib in želv (Bishop in sod., 2006).

Življenjski krog uhatega klobučnjaka obsega menjavanje spolne in nespolne generacije (metageneza). Generacijo, ki se spolno razmnožuje predstavlja prosto plavajoča meduza, medtem ko nespolno generacijo predstavlja bentoški polip. Odrasla meduza je ločenih spolov. Meduza je spolno zrela, ko doseže maksimalno velikost (Arai, 1997). Samica jajčeca zadrži v gastrovaskularni votlini, kjer pride do notranje oploditve. Zarodek se razvije v prosto plavajočo ličinko planulo, ki se kmalu potopi in pritrdi na ustrezen substrat na morskem dnu. Po pritrditvi se razvije v polip. Zrel polip se razmnožuje nespolno z vegetativnim brstenjem in strobilacijo, pri čemer se tvorijo efire. Brstenje polipa poteka z vzdolžno delitvijo starševskega polipa, ki se razdeli na dva enakopravna dela ali s tvorbo stranskih brstov. Strobilacija je najpogostejši način nespolnega razmnoževanja pri uhatem klobučnjaku. Polip se podaljša in pod lovskimi se tvorijo prečni zavijki. V tej fazi nastanejo zametki efire, ki se kmalu odcepi. Efira se razvije v odraslo meduzo.



Slika 1: Uhati klobučnjak (*Aurelia* spp.) (foto: Tihomir Makovec)

2.3.2 Mesečinka (*Pelagia noctiluca*) in življenjski krog

Mesečinka živi v toplejših in zmernejših pasovih. Pogosto se pojavlja v Atlantiku in Sredozemskem morju. Množična pojavljanja teh živali so opažena tudi v srednjem in južnem Jadranu. Mesečinka spada med manjše klobučnjaške meduze, s premerom klobuka do 10 cm (Mayer, 1910). Polkrožni klobuk je lahko različnih barv, od svetlo rdeče do slezenasto rjave ali škrlatne. Na robu klobuka ima 16 robnih krp, izpod katerega visi 8 lovčev in 8 čutnih betičev (Turk, 2007). Dolžina posamezne lovke je približno dvakrat večja od premera klobuka in se lahko raztegne do 3 m. Lovke so zelo elastične in pokrite z ožigalnimi celicami (nematocistami). Njena posebnost je v tem, da je sposobna ustvarjati svetlobo (bioluminiscenco).

Večinoma se prehranjuje z morskimi plaščarji, manjšimi meduzami, ceponožci ter ribjimi jajčecami in mladimi (Malej, 1989; Zavodnik, 1991; Hayward in sod., 1996). Plen ujame s pomočjo ožigalnih celic, ki so napolnjene s strupeno tekočino. Ko se žival ali človek dotakne ožigalke, se sproži in izbrizga strup. S tem plen omrtviči in ga z lovskimi ter ustnimi rameni spravi skozi usta v telesno votlino na spodnji strani klobuka. Neprebavljene ostanke skozi isto votlino izloči. Ožigalke ne služijo samo za omrtvičenje plena, temveč tudi za obrambo. Mesečinka ima kar nekaj plenilcev, najbolj ranljiva zanje je v stopnji efire.

Mesečinka se od večine drugih klobučnjakov razlikuje v tem, da v svojem življenjskem krogu nima pritrjenega polipa. Mlada meduza se razvije neposredno iz planule. Odrasle meduze so ločenih spolov in se razmnožujejo spolno. Spolne celice, ki nastanejo v meduzi so sproščene v okolje, kjer pride do zunanje oploditve. Po združitvi semenčice z jajčecem se razvije omigetalčena ličinka (planula). Ker je mesečinka v svojem razvoju izgubila polipni stadij se iz planule razvije mlada meduza (efira). Efira se nato hitro razvije v odraslo meduzo, s čimer zaključi življenjski krog (Banister in Campbell, 1985; Calder, 2000).



Slika 2: Mesečinka (*Pelagia noctiluca*) (foto: Wikipedia.org)

2.3.3 Morski klobuk (*Rhizostoma pulmo*) in življenjski krog

Meduza morskega klobuka se v Mediteranu pogosto pojavlja, pogosto pa je opažena tudi v Severnem in Južnem Atlantskem oceanu ter Rdečem in Črnem morju. Prisotna je skozi celo leto, vendar je najbolj množično zastopana v poletnih mesecih od junija do avgusta, ko poteka strobilacija in tvorjenje efir. Zrelostno obdobje nastopi v avgustu in septembru. Takrat pogosto opazimo odrasle meduze, ki se množično pojavljajo blizu obal. Odrasle posamezne meduze se občasno pojavljajo sredi zime (Mayer, 1910).

Meduza morskega klobuka je zvonaste oblike in čvrsta, brez lovk na robu klobuka. Zgrajena je iz dveh zarodnih plasti ektoderma in endoderma med katerima je mezogleja. Površina klobuka je drobno granulirana z posameznimi nematocistami. Premer klobuka meri od 15 do 60 cm, izjemoma pa doseže velikost tudi do 90 cm. Rob klobuka je sestavljen iz 80 majhnih krpic polkrožne oblike, med katerimi je nameščenih 8 parov čutilnih organov (ropaliji). Barva klobuka je lahko različna, od mlečno rumene do rdečkaste, medtem ko so robne krpe modrikaste do vijolične barve (Turk, 2007). Dno gastralne votline je razdeljeno na štiri interradijalne trikotne površine, med katerimi se nahaja režasta ugreznina, ki vodi do bazalnega dela ustnega stožca. Mezoglejske odebelitve v gastralni votlini so na vrhu te votline popolnoma zrasle in pri tem je izvorna gastralna votlina popolnoma zaprta. Šestnajst radialnih kanalov vodi od gastralne votline do roba klobuka, kjer se združijo v primarni krožni kanal, ki pa je prisoten samo v stadiju efire. V odrasli meduzi ti kanali tvorijo sekundarni krožni kanal, ki ima vlogo glavnega krožnega kanala. Na spodnji strani klobuka je ustni stožec, na katerem je 16 epolet sestavljenih iz nagubanih trakastih struktur. Epotele s sekundarnimi ustnimi odprtinami so lahko obarvane oranžno rumeno do rjavkasto rdeče ali rjavo. Pod

epoletami je osem ustnih ramen urejenih v štiri pare. Na vsakem ustnem ramenu se nahaja naguban trikrilni del z ustnimi odprtinami, ki jim sledi gladek podaljšan končni privesek brez ustnih odprtin (Mayer, 1910). Morski klobuki se hranijo s planktonom. V času stradanja se lahko meduzam zmanjša teža na 12 do 7 % izhodiščne teže (Russell, 1970).

V življenjskem krogu morskega klobuka se izmenjujeta pritrjen polip in prostoživeča meduza. Meduze so ločenega spola in sprostijo spolne celice v vodo. Iz oplojenega jajčeca se razvije prosto plavajoča omigetalčena ličinka planula, ki se pritrdi na podlago ter razvije v polip. Novi polipi lahko nastajajo s tvorbo stranskih brstov na polipu ali pa z odcepitvijo bazalnega dela polipa, ki se oblikuje v mirujočo tvorbo, obdano s hitinom (podocista), in je namenjena preživetju neugodnih razmer. V ugodnih razmerah se polip nespolno razmnožuje s strobilacijo. Telo polipa se podaljša in pod lovkami se tvorijo prečni zavihki. Vrhnji zavihkec je tudi najbolj zrel in se po določenem času odcepi in splava kot zelo mlada meduza, imenovana efira. Efira se v treh do štirih tednih razvije v odraslo in spolno zrelo meduzo.



Slika 3: Morski klobuk (*Rhizostoma pulmo*) (foto: Tihomir Makovec)

2.4 Raziskave o biokemični in elementni sestavi klobučnjaških meduz

Znanje o biokemični in elementni sestavi meduz predstavlja osnovo za razumevanje in določanje biomase populacije, prenosa energije prek prehranjevalne verige ter za oceno doprinosa organske snovi na morskem dnu prek razgradnje odmrlih meduz (Percy in Fife, 1981). Billett in sod. (2006) so v letih z večjo abundanco meduz v Arabskem morju ocenili, da se v obliki meduzne biomase na dno poseda tudi do 78 g C/m², kar lahko predstavlja pomemben vir ogljika za bentoške organizme in bakterije. Heterotrofne morske bakterije odmrlo meduzno tkivo razgradijo z zunajceličnimi hidrolitičnimi encimi. Produkti razgradnje beljakovin (amini, proste aminokisline) prispevajo k celotni koncentraciji raztopljenega organskega in anorganskega dušika v okoljski morski vodi, razgradni produkti lipidov (fosfolipidi v celičnih membranah) in nukleinskih kislin pa prispevajo k celotni koncentraciji raztopljenega organskega fosforja (Arai, 1997). Poleg velikega recikliranja elementov, pa lahko ob razgradnji odmrle biomase pride do povečane porabe kisika, kar lahko privede do lokalne hipoksije in posledično do sprememb v delovanju ekosistema (West in sod., 2009; Tinta in sod. 2010).

Zanimanje za študije elementne in biokemične sestave želatinoznega planktona so se začele šele v zadnjih letih, z vse večjim zavedanjem pomembnosti teh predatorjev v vodah priobalnih morij (Clarke in sod., 1992). Prve empirične raziskave o biokemični sestavi meduz so predstavili Percy in Fife (1981), Schneider (1988a), Arai in sod. (1989) in Clarke in sod. (1992). Izsledki raziskav kažejo, da največji delež v telesu meduz predstavljata voda (~ 95 % mokre mase) in sol (~ 70 % suhe mase). Organski delež znaša manj kot 3 % mokre mase, od tega predstavljajo proteini večinski delež (~ 5–30 % suhe mase), nato lipidi (~ 2–10 % suhe mase) in ogljikovi hidrati (~ 0,5–1,7 % suhe mase) (Lucas, 2008). V meduzah imajo proteini različne funkcije, od strukturnih proteinov, ki se nahajajo v nematocistah in kolagenskih vlaknih mezogleje, kot tudi encimov, toksinov in pigmentov (Pitt in sod., 2009). Meduze si elemente pridobijo z asimiliranjem organske snovi iz zaužitega plena, privzemanja majhnih količin raztopljenega ogljika, nekatere vrste pa tudi aktivno privzemajo snovi v raztopljeni anorganski obliki (Pitt in sod., 2009).

Biokemična sestava je različna v posameznih delih telesa meduze in je pogojena z velikostjo meduze oz. njeno starostjo in spolno zrelostjo. To je bil predmet raziskave Lucas (1994), ki je preučevala biokemično sestavo uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.) v Southampton Water. Rezultati raziskav so potrdili, da je sestava uhatega klobučnjaka tipična za želatinozne organizme, z zelo nizko vsebnostjo ogljikovih hidratov (0,10–1,12 % suhe mase), srednje vrednosti lipidov (3,50–11,50 % suhe mase) in najvišjo vrednostjo proteinov (2,07–28,56 % suhe mase). Testirala je tudi, kakšna je sestava meduze v posameznih delih telesa. Biokemična sestava posameznih delov klobučnjakov večjih od 50 mm je pokazala, da so vrednosti organskega dela v gonadah (proteinov 4,38–22,98 %, lipidov 2,59–6,08 % in ogljikovih hidratov 1,08–2,10 % suhe mase) v primerjavi z vrednostmi v tkivih klobuka (proteinov 2,43–8,31 %, lipidov 0,87–2,91 % in ogljikovih hidratov 0,33–0,85 % suhe mase) večje. V izoliranih ustnih ramen je biokemična sestava podobna sestavi gonad. Ugotovila je tudi, da je v velikostnem razredu meduz od 60 do 110 mm najvišja vsebnost proteinov, medtem ko se z rastjo meduz vsebnost proteinov občutno manjša. Prišla je do zaključkov, da hitra rast in zrelost meduz v velikostnem razredu od 60 do 110 mm sovпада s spomladanskim vrhom mezozooplanktona v Southampton Water, medtem ko je upadanje proteinov v večjih velikostnih razredih pripisala odmiranju meduz.

V kasnejših literaturnih podatkih (Arai, 1997) je bila prav tako ugotovljena različna razporeditev beljakovin, lipidov in ogljikovih hidratov po posameznih telesnih delih klobučnjakov, z najvišjimi vrednostmi v tkivih ustnih ramen in gonad. Dodatno so raziskave pokazale različno biokemično sestavo med različnimi vrstami meduz. Proteinska sestava ustnih ramen uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.) je v povprečju 7,3 %, medtem ko v morskem klobuku predstavlja v povprečju 27 % tkiva. Ustna ramena morskega klobuka so v primerjavi z uhatim klobučnjakom večja, kar se posledično odraža v višji vsebnosti proteinov.

Elementno sestavo (C, N) različnih vrst meduz so prvič analizirali Schneider in Weisse (1985), Larson (1986b) in Schneider (1988b). Izsledki raziskav elementne sestave skifomeduz kažejo, da se vrednosti za ogljik gibljejo med 4–15 % suhe mase, vrednosti za dušik pa med 1–4 % suhe mase. Velika količina proteinov v tkivih se odraža v razmeroma nizkem razmerju C/N od 3,4 do 4,3 (Larson, 1986b). Tako kot biokemična sestava je tudi elementna sestava različna v posameznih delih telesa meduze in je pogojena z velikostjo in spolno zrelostjo meduze. Analize uhatega klobučnjaka so pokazale, da so najvišje vsebnosti ogljika in dušika v tkivih gonad (12–17 % C in 3–5 % N) (Schneider, 1988b). Poleg razlik v biokemični in elementni sestavi v različnih delih telesa meduze, pa so razlike prisotne tudi med različnimi vrstami meduz. Pri analizah uhatega klobučnjaka so vsebnosti za ogljik v povprečju 4,3 % suhe mase in 1,3 % za dušik, medtem ko so v mesečinki vsebnosti ogljika nekoliko višje (9 % suhe mase in 1 % dušika) (Larson, 1986b).

V spodnji preglednici (preglednica 2) so povzeti literaturni podatki biokemične in elementne sestave glavnih vrst zooplanktona. Podatki kažejo, da ima želatinozni zooplankton v telesu višjo vsebnost vode, v primerjavi z drugim neželatinoznim zooplanktonom, medtem ko so vsebnosti C, N ter organskega dela (proteini, lipidi in ogljikovi hidrati) v želatinoznem zooplanktonu nižje. Razlike v sestavi so vidne tudi znotraj želatinoznih vrst organizmov. V splošnem imajo meduze višje vsebnosti ogljika, dušika, proteinov in lipidov, kot ctenofore.

Preglednica 2: Literaturni podatki elementne (ogljik in dušik) in biokemične sestave (proteini, lipidi in ogljikovi hidrati) želatinoznega in neželatinoznega zooplanktona. Vsebnost vode je izražena kot % mokre mase, medtem ko so ostale vrednosti izražene kot % suhe mase (povzeto po Bailey in sod., 1995).

Vrste	Voda	Ogljik	Dušik	Proteini	Lipidi	Ogljikovi hidrati	Viri
Želatinozne vrste							
Ctenofore							
<i>B. fosteri</i>	96,19	0,82	0,2	0,6	0,38	0,24	Bailey in sod. (1994); (1995)
<i>P. pileus</i>	96,05	3,68	0,74	3,7	1,24	0,97	Hoeger (1983); Schneider (1982)
Meduze							
<i>Aeginura grimaldii</i>	95,61	6,73	1,67	7,8	1,82	0,53	Bailey in sod. (1995)
<i>Aurelia spp.</i>	98,00	5,20	1,40	5,9	1,9	2,8	Schneider (1988a)
Neželatinozne vrste							
Raki							
<i>S. phorcus</i>	77,5	42,76	10,36	54,13	20,53	0,62	Childress in Nygaard (1974)
<i>S. henseni</i>	75,5	36,86	10,57	44,45	5,59	0,41	Donnelly in sod. (1993)
Ribe							
<i>Avocettina sp.</i>	80,7	41,35	9,95	37,77	14,66	0,57	Childress in Nygaard (1973)
<i>Stomias atriventer</i>	80,9	46,86	7,07	30,89	37,17	0,42	Childress in Nygaard (1973)

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Materiali in oprema

3.1.1 Materiali

V diplomski nalogi sem uporabila vzorce sledečih klobučnjaških meduz:

- uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.),
- mesečinke (*Pelagia noctiluca*)
- in morskega klobuka (*Rhizostoma pulmo*).

3.1.2 Laboratorijska oprema

Pri laboratorijskemu delu sem uporabljala naprave in pripomočke opisane v Preglednici 3.

Preglednica 3: Laboratorijska oprema, ki sem jo uporabila pri laboratorijskem delu

Oprema	Model, tip	Proizvajalec
avtomatska pipeta 0,5-10 μ L avtomatska pipeta 100-1000 μ L	Transferpette®S	Brand (Nemčija)
avtomatska pipeta 10-100 μ L avtomatska pipeta 500-2500 μ L avtomatska pipeta 500-5000 μ L	Research Reference Research	Eppendorf (Nemčija)
CHN analizator	EA11	Carlo Erba Instruments (Italija)
centrifuga	5417R 5804R	Eppendorf (Nemčija)
eksikator		
epruvete	sterilne, različni volumni	Sardsted (Nemčija)
električno magnetno mešalo	Type RTCB	Ika® Ika-Werke (Nemčija)
homogenizator	Ultra-Turnax, Type18710	Ika® Ika-Werke (Nemčija)
laboratorijska tehtnica 0-210g laboratorijska tehtnica 0-1500g	BP 211D TE 1502S	Sartorius (Nemčija)
liofilizator	Alfa 1-4	Christ (Nemčija)
refraktometer	S/Milli-E	Atago
spektrofotometer	Lamda 14 UV/VIS	Perkin Elmer inc. (ZDA)
sušilnik	Tip I-50	Kambič (Slovenija)
vodna kopel	WB-45ST	Kambič (Slovenija)
vortex	TypeT	Ika® Ika-Werke (Nemčija)

3.1.3 Kemikalije in puferske raztopine

Pri delu sem uporabljala analitsko čiste reagente in kemikalije sledečih proizvajalcev: Sigma, Merck in Aldrich. Za pripravo vseh raztopin sem uporabljala deionizirano (miliQ) vodo (Millipore). Kemikalije, ki sem jih uporabljala pri posameznih eksperimentih, so natančno navedene v opisu različnih eksperimentalnih metod. Uporabljala sem predvsem:

- komplet za določanje količine proteinov (Bio Rad Protein Assay Kit; Bio Rad Laboratories GmbH, Nemčija)
- komplet za določanje količine proteinov v vzorcih, ki za proteinski standard uporablja goveji serumski albumin (BSA) (Quanti Pro BCA Assay Kit; Sigma-Aldrich, Inc.)
- celulozne dializne membrane MWCO:1000 Da (Spectra/Por)

Kot ekstrakcijsko sredstvo za sproščanje proteinov iz tkivih meduz sem uporabljala sledeče pufre:

➤ 10x PBS (pH = 7,3):

- 1,4 M NaCl
- 27 mM KCl
- 101 mM Na₂HPO₄
- 18 mM KH₂PO₄

➤ Pufer za lizo1 (P1):

- 1x PBS
- 5 mM DTT
- 5 mM EDTA
- 0,1 % Triton X-100
- 10 % glicerol
- deionizirana miliQ voda

➤ Pufer za lizo 2 (P2):

- 1x PBS
- 0,5 mM EDTA
- 0,1 % Triton X-100
- 1 % glicerol
- deionizirana miliQ voda

➤ Pufer za lizo 3 (P3):

- 1x PBS
- 0,5 mM EDTA
- 5 % Triton X-100
- 1 % glicerol
- deionizirana miliQ voda

3.2 Metode

3.2.1 Vzorčenje na terenu

Meduze smo vzorčevali v Tržaškem zalivu, kjer se meduze pojavljajo v večjem številu občasno in južnem Jadranu, kjer so vse leto prisotne v velikem številu.

Vzorčenja uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.) so bila opravljena v različnem časovnem obdobju v Tržaškem zalivu in v sredozemskem slanim jezeru na otoku Mljet (Veliko jezero, južni Jadran). Vzorčenja mesečinke (*Pelagia noctiluca*) in morskega klobuka (*Rhizostoma pulmo*) pa so bila opravljena samo v Tržaškem zalivu.

Vzorci klobučnjaških meduz so bili odvzeti:

- marca in oktobra 2006 (Mljet)
- 18. oktobra 2006 (Tržaški zaliv)
- 11. januarja, 1. februarja, 6. marca, 20. aprila in 6. avgusta 2007 (Tržaški zaliv)

Meduze so bile vzorčene s potapljači ali ročno s plovila Sagita, ki je last Morske biološke postaje, Nacionalnega inštituta za biologijo. Pri vzorčenju s plovila so si pomagali z mrežo za lovljenje meduz na daljši palici. Na plovilu so bile takoj po vzorčenju določene osnovne biometrične značilnosti za vsako meduzo. Določen je bil premer klobuka (2r) meduz in njena mokra teža (wet weight - WW) .

Vzorci so označili tako, da je iz oznake razvidno leto in mesec vzorčenja, vrsta klobučnjaka (RH - *Rhizostoma pulmo*, AA – *Aurelia* spp., PN – *Pelagia noctiluca*) ter zaporedna številka osebkov. Vzorci klobučnjakov smo do analiz skladiščili na –30 °C.

Primer: 06/10/AA70

06 - leto vzorčenja

10 - mesec vzorčenja

AA - *Aurelia* spp.

70 - zaporedna številka osebkov

V diplomskem delu sem za določitev biokemične sestave klobučnjakov uporabila 28 vzorcev meduz, nabranih v Tržaškem zalivu (Koprski in Piranski zaliv) in 9 vzorcev iz Velikega jezera na otoku Mljet. Podrobnejši podatki o vzorcih, katerim smo določali proteinsko in elementno sestavo so opisani v preglednici 4.

Preglednica 4: Seznam uporabljenih vzorcev klobučnjaških meduz za kemijsko analizo

DATUM VZORČENJA	MESTO VZORČENJA	OZNAKA VZORCA
Oktober, 2006	Mljet	06/10/AA70
Oktober, 2006	Mljet	06/10/AA69
Oktober, 2006	Mljet	06/10/AA56
Oktober, 2006	Mljet	06/10/AA67
Oktober, 2006	Mljet	06/10/AA73
Marec, 2006	Mljet	06/03/AA43
Marec, 2006	Mljet	06/03/AA48
Marec, 2006	Mljet	06/03/AA38
Marec, 2006	Mljet	06/03/AA16
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA52
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA55
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA47
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA38
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA54
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA41
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA35
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA49
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA46
20.4.2007	Tržaški zaliv	07/04/AA45
06.3.2007	Tržaški zaliv	07/03/AA28
06.3.2007	Tržaški zaliv	07/03/AA48
06.3.2007	Tržaški zaliv	07/03/AA23
06.3.2007	Tržaški zaliv	07/03/AA49
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN04
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN37
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN68
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN14
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN23
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN10
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN09
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN61
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN44
18.10.2006	Tržaški zaliv	06/10/PN63
11.01.2007	Tržaški zaliv	07/01/RH2K
11.01.2007	Tržaški zaliv	07/01/RH2R
01.02.2007	Tržaški zaliv	07/02/RH2R
01.02.2007	Tržaški zaliv	07/02/RH2R
01.02.2007	Tržaški zaliv	07/02/RH11R
01.02.2007	Tržaški zaliv	07/02/RH11K
01.02.2007	Tržaški zaliv	07/02/RH10R
01.02.2007	Tržaški zaliv	07/02/RH10K

3.2.2 Postopki priprave vzorcev

3.2.2.1 Sušenje meduz

Pred kemično analizo sem meduze najprej posušila in sicer s postopkom sušenja v liofilizatorju in sušenjem v sušilniku pri 60 °C.

3.2.2.1.1 Sušenje v liofilizatorju

Posamezne zamrznjene meduze sem postavila na stojalo liofilizatorja in jih liofilizirala 3–5 dni. Trajanje sušenja je bilo odvisno od velikosti meduze. Pri relativno nizki temperaturi (ca. – 50 °C) in tlaku (skoraj vakuumu) voda, ujeta v zamrznjenem vzorcu, sublimira in se ujame na ohlajenem kovinskem obroču. Ker delež vode v meduzah predstavlja preko 95 odstotkov celotne teže osebka, je sušenje nekoliko dolgotrajnejše. V liofilizatorju sem sušila predvsem meduze manjših velikostnih razredov. V primeru, da je bil vzorec prevelik sem sušila le podvzorec, ki sem ga pripravila tako, da sem predhodno homogenizirala celotno tkivo meduze s pomočjo rezalnika (homogenizator Ika® Werke Ultra-Turrax tip 18710, ZDA).

3.2.2.1.2 Sušenje v sušilniku pri 60 °C

Cele zamrznjene meduze sem v aluminijastih posodah sušila v sušilniku pri temperaturi 60 °C. Vsak dan sem s tehtanjem beležila spremembo mase. Pred tehtanjem sem vzorec najprej postavila v eksikator, da se ohladi na sobno temperaturo in ga šele nato stehtala. To sem ponavljala vse do konstantne mase posameznega vzorca.

V primeru, da je bil vzorec prevelik, sem sušila le homogeniziran podvzorec. Meduzo sem homogenizirala s pomočjo rezalnika (homogenizator Ika® Werke Ultra-Turrax tip 18710, ZDA). Pred podvzorčenjem sem homogenat dobro premešala in ga sušila na način, kot je opisan zgoraj.

3.2.2.2 Homogenizacija posušenih meduz

Ko sem meduze posušila, sem si zabeležila težo posameznega vzorca in ga nato v ahatni terilnici zdrobila v prah. Na ta način homogeniziran vzorec sem uporabljala pri nadaljnjih kemičnih analizah. V primeru, da analiz nisem opravila takoj, sem homogenat meduz spravila na –30 °C.

3.2.2.3 Dializa posušenih meduz

Dializa je metoda, s katero lahko vzorec razsolimo ali zamenjamo pufrski sistem. Pri dializi uporabljamo tanko semipermeabilno membrano z različno velikimi porami (1- 50 kDa), dimenzijami in iz različnih materialov (npr. celofan – celulozni acetat, nitroceluloza, koloidon). Metoda temelji na principu pasivne difuzije. Semipermeabilno membrano prehajajo (prehajanje je lahko v obe smeri) le molekule, ki so manjše od velikosti por membrane.

Postopek dialize vzorcev:

Pri naših eksperimentih smo uporabljali celulozne dializne vrečke s propustnostjo MW 1000 Da (Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO:1000). Dializne vrečke, ki so originalno shranjene v pufrski raztopini natrijevega azida, sem pred uporabo dobro sprala in jih zrezala na kose z dolžino približno 8 cm, velikost, ki je bila prilagojena količini posameznega vzorca. Posamezne kose dializne vrečke sem nato pustila namakati v deionizirani MilliQ vodi najmanj 30 minut pri sobni temperaturi. Posušen homogeniziran vzorec sem stresla v dializno vrečko in jo na zgornji in spodnji strani zaprla s sponkami. Tako pripravljen vzorec sem potopila v čašo z deionizirano vodo in pustila v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Naslednji dan sem z refraktometrom odčitala slanost in nato zamenjala vodo v čaši z dializno vrečko. To sem počela toliko časa, dokler slanost ni padla na 0 PSU. Dializa je v večini primerov trajala 2–3 dni. Na koncu dialize sem sponke odprla in izlila vzorec v posodico, ga zamrznila in nato ponovno liofilizirala. Suh material sem nato homogenizirala v ahatni terilnici in ga do analiz skladiščila v hladilni skrinji na temperaturi –30 °C.

3.2.3 Kemijske analize meduz

3.2.3.1 Določanje koncentracije proteinov

V diplomskem delu sem za določanje koncentracije proteinov v vzorcih meduz uporabila metodo po Bradfordu in metodo BCA.

3.2.3.1.1 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi

Metoda po Bradfordu (Bradford, 1976) je kolorimetrična metoda pri kateri uporabljamo reagent, ki vsebuje barvilo Commassie Brilliant Blue G250.

Metoda temelji na vezavi kislega reagenta na proteinske komponente v vzorcu. Reagent se s kislimi sulfonskimi kislinami veže na zunanje bazične in aromatske skupine aminokislin v proteinih. Ob vezavi nastane kompleks, ki povzroči premik absorpcijskega maksimuma barvila iz 465 nm na 595 nm. Barvilo obstaja v dveh barvah. Rjavo-rdeči, kadar v vzorcu ni prisotnih proteinov, ter modri barvi, ki postaja intenzivnejša z naraščajočo koncentracijo proteinov v vzorcu. Pri izvedbi metode smo uporabili komplet za določanje količine proteinov v vzorcih (Bio Rad Protein Assay Kit; Bio Rad Laboratories GmbH, Nemčija), ki vsebuje barvni reagent (Bio Rad dye reagent concentrate) in proteinski standard (Bio Rad Protein Standard).

Priprava umeritvene krivulje

Umeritveno krivuljo sem izdelala po navodilih proizvajalca (Bio Rad Protein Assay Kit; Bio Rad Laboratories GmbH, Nemčija). Za proteinski standard sem uporabila standardno raztopino proteina BSA (goveji serumski albumin) s koncentracijo 2 mg/ml. Iz izhodne raztopine standarda sem pripravila 6 standardnih raztopin s koncentracijami 25 µg/ml, 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml in 2,5 µg/ml. Poleg standardov sem pripravila še slepi vzorec s koncentracijo 0 µg/ml, ki je vseboval samo deionizirano miliQ vodo oz. pufer v katerem smo ekstrahirali proteine meduz. Vzela sem 0,8 ml vsake razredčine in dodala 0,2 ml koncentriranega barvnega reagenta ter dobro premešala (vorteks Ika® Werke GmbH & Co. KG tip T, Nemčija). Po 10 min sem s spektrofotometrom izmerila absorbanco (A) pri valovni dolžini 595 nm (Philips International PU 8620 UV/VIS/NIR, Nizozemska). Na osnovi izmerjenih koncentracij sem pripravila umeritveno krivuljo, ki prikazuje absorbanco v odvisnosti od koncentracije proteinov.

Analiza vzorcev

Na osnovi predposkusov sem ocenila, kolikšna je koncentracija proteinov v suhi masi vzorcev in koliko podvzorca je potrebno zatehtati, da pridem v območje sredine umeritvene krivulje. V kolikor sem uporabljala večje zatehte (10 mg), da bi se izognila napakam pri tehtanju, je bilo potrebno vzorec razredčiti.

V 15 ml epruveto sem zatehtala ustrezno količino posušenega in homogeniziranega podvzorca, ter mu dolila pufer za lizo do končnega volumna 10 ml. Ekstrakcijo proteinov sem preizkusila v pufru za lizo P1 in P2. Vsebino sem dobro premešala in pustila stati 10 min pri sobni temperaturi. Sledila je 5-minutna inkubacija v vodni kopeli pri 95 °C. Po končani inkubaciji sem počakala, da se vzorec ohladi ter centrifugirala. Preizkusila sem 5, 10 in 15-minutno centrifugiranje pri 10000 rpm. Previdno sem odpipetirala supernatant, pelet pa zavrgla. Iz supernatanta sem nato pripravila po tri podvzorke (triplikat meritve).

Vsem podvzorcem supernatanta in slepim vzorcem (0,8 ml) sem po navodilu proizvajalca (Bio Rad Protein Assay; 2005) dodala 0,2 ml koncentriranega reagenta (Dye Reagent Concentrate, Bio Rad Laboratories GmbH, Nemčija) in inkubirala pri sobni temperaturi 10 min. Absorbanco (A) vzorca smo izmerili pri valovni dolžini 595 nm (spektrofotometer Philips International PU 8620 UV/VIS/NIR, Nizozemska).

Kontrola z BSA standardom

Za preverjanje in kontrolo metode sem uporabila BSA standard z znano koncentracijo 2 mg/ml. 60 µl standarda sem razredčili v 6 ml predhodno izbranega pufra, zato da sem dobila koncentracijo 20 µg/ml (znotraj umeritvene krivulje). Vzorce standarda sem obravnavala kot vzorce z neznanimi koncentracijami.

3.2.3.1.2 Določanje koncentracije proteinov po metodi BCA

BCA metoda (Smith in sod., 1985) je kolorimetrična metoda, ki temelji na biuretski reakciji proteinov z bakrom v alkalnih pogojih. Princip delovanja bikinkoninske kisline (BCA) temelji na redukciji Cu^{2+} v Cu^{1+} ob prisotnosti proteinov. Ob vezavi BCA reagentov (zmes natrijeve raztopine, bikinkoninske kisline in raztopine bakrovega sulfata) z Cu^{1+} nastane vijoličen kompleks, ki postaja intenzivnejši z naraščajočo koncentracijo proteinov v vzorcu. Absorpcijski maksimum kompleksa je pri 562 nm. Pri izvedbi metode sem uporabila komplet za določanje količine proteinov v vzorcih, ki za proteinski standard uporablja goveji serumski albumin (BSA) (Quanti Pro BCA Assay Kit; Sigma-Aldrich, Inc.).

Izdelava umeritvene krivulje:

Umeritveno krivuljo sem izdelala po navodilih proizvajalca (Quanti Pro BCA Assay Kit; Sigma-Aldrich, Inc.). Najprej sem pripravila zahtevan delež mešanice reagentov potrebnih za izdelavo umeritvene krivulje. Za proteinski standard sem uporabila standardno raztopino proteina BSA s koncentracijo 1 mg/ml. Iz izhodne raztopine standarda sem pripravila 5 standardnih raztopin s koncentracijami 30 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml in 0,5 µg/ml s končnim volumnom 1 ml. Poleg standardnih raztopin sem pripravila tudi 1 ml slepega vzorca, ki je vseboval samo deionizirano vodo oz. pufer v katerem smo ekstrahirali proteine meduz.

V naslednjem koraku sem vsaki standardni razredčini in slepemu vzorcu dodala 1 ml predhodno pripravljene mešanice reagentov, dobro premešala in inkubirala 1 h pri 60 °C. Po končani inkubaciji sem počakala, da se raztopine ohladijo na sobno temperaturo in izmerila absorbanco (A) pri valovni dolžini 562 nm. Rezultate meritev sem uporabila za izdelavo umeritvene krivulje, ki prikazuje absorbanco pri 562 nm v odvisnosti od koncentracije proteinov.

Analiza vzorcev

V 15 ml epruveto sem zatehtala ustrezno količino posušenega in homogeniziranega podvzorca, ter mu dolila pufer za lizo do končnega volumna 10 ml. Ekstrakcijo proteinov sem preizkusila v P2 in P3. Vsebino sem dobro premešala in pustila stati 10 min pri sobni temperaturi. Sledila je 5-minutna inkubacija v vodni kopeli pri 95 °C. Po končani inkubaciji sem počakala, da se vzorec ohladi ter centrifugirala. Preizkusila sem 5, 10 in 15-minutno centrifugiranje pri 10000 rpm. Previdno sem odpipetirala supernatant, pelet pa zavrgla. Iz supernatanta sem nato pripravila triplikat meritve.

Vzorcem supernatanta in slepim vzorcem (po 1 ml) sem nato po navodilu proizvajalca (Quanti Pro BCA Assay Kit; Sigma-Aldrich, Inc.) dodali 1 ml predhodno pripravljene mešanice reagentov, dobro premešala in inkubirala 1 h pri 60 °C. Po končani inkubaciji sem počakala, da se raztopine ohladijo na sobno temperaturo in izmerila absorbanco (A) pri valovni dolžini 562 nm (spektrofotometer Philips International PU 8620 UV/VIS/NIR, Nizozemska).

3.2.3.1.3 Obdelava in prikaz rezultatov

Koncentracijo proteinov v vzorcih ($\mu\text{g/ml}$) sem preračunala iz izmerjene absorbance po linearni enačbi (1), ki je popisala umeritveno krivuljo. Izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 562 nm (metoda BCA) in 595 nm (Bradford) je premosorazmerna koncentraciji proteinov v vzorcih.

$$y = k \times x + n \quad (1)$$

y = absorbanca (A)

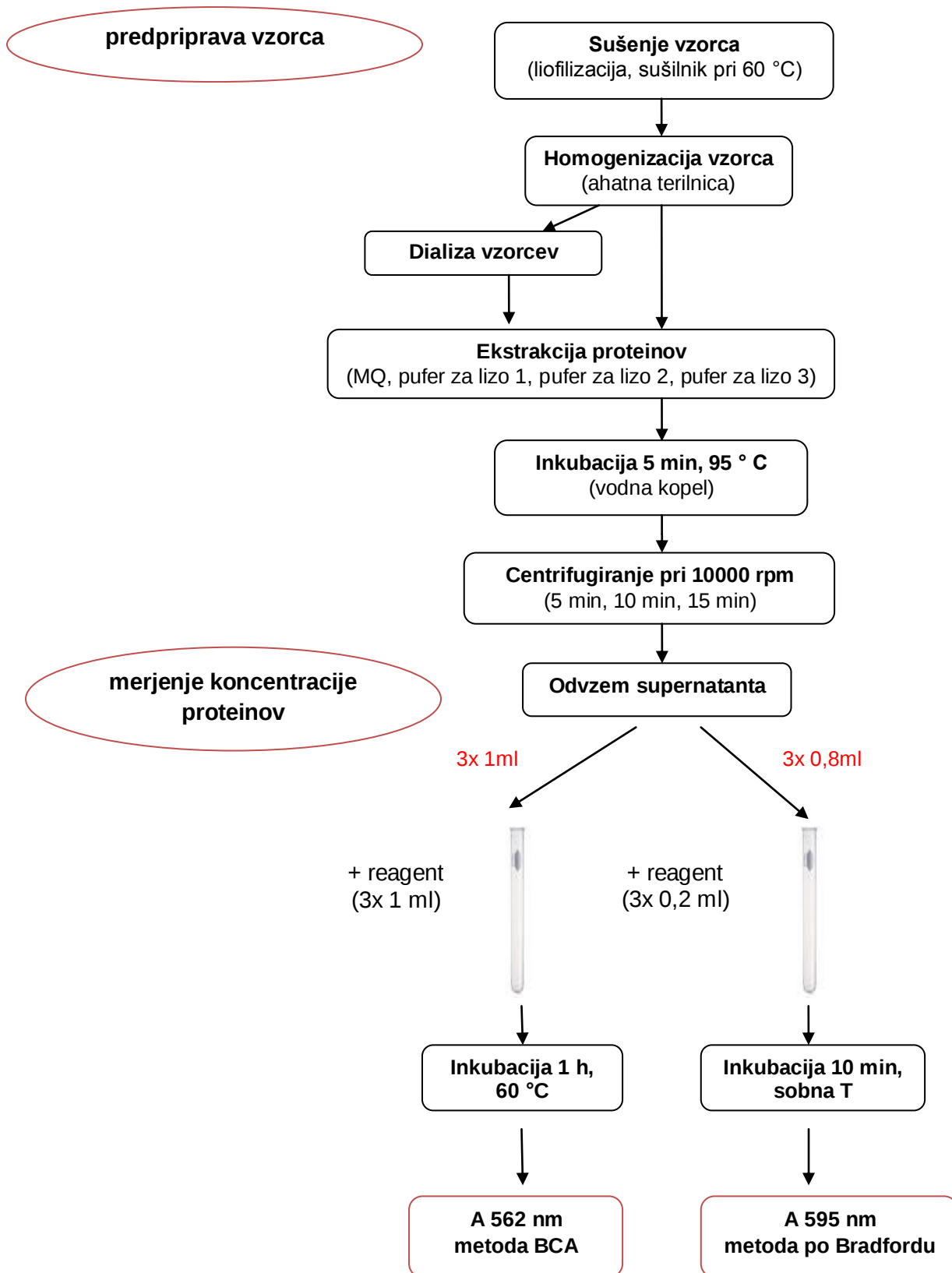
x = koncentracija proteinov (c) v $\mu\text{g/ml}$

n = 0

Prikaz rezultatov:

Vse rezultate sem podala kot aritmetično sredino dveh ali več meritev posameznega testa. Poleg rezultata sem naredila tudi oceno variabilnosti (standardni odklon od povprečne vrednosti).

Shema celotnega postopka predpriprave vzorca in določanja količine proteinov z uporabo metode BCA in metode po Bradfordu je prikazana na sliki 4.



Slika 4: Shema postopka predpriprave vzorca in določanja količine proteinov z uporabo metode BCA in metode po Bradfordu

3.2.3.2 Določanje elementne sestave

Elementno sestavo (C, N) smo določali predhodno posušenim in dializiranim vzorcem uhatega klobučnjaka iz Mljeta in Tržaškega zaliva, mesečinke in morskega klobuka iz Tržaškega zaliva.

Ustrezne zatehte liofiliziranih podvzorcev (~ 5 mg) smo po navodilih shranili v posebno oblikovane srebrove kapsule, s čimer so bili pripravljeni za CHN analizo. Elementno sestavo smo določali s pomočjo elementnega analizatorja (Carlo Erba Instruments EA 1180, Italija), z natančnostjo $\pm 5 \%$ (Pella in Colombo, 1973; Pella in Colombo, 1978) v laboratoriju na Morski biološki postaji v Piranu.

Gre za avtomatizirano analitično metodo, ki v isti napravi omogoča sežig (oksidacija) partikulatne organske snovi pri visoki temperaturi ter nato z aplikacijo plinske kromatografije ločevanje, analizo in kvantifikacijo plinskih produktov, nastalih pri sežigu. Sežig je potekal pri temperaturi 1020 °C. Plinski produkti, ki nastanejo pri sežigu organske snovi se nato ločijo na kromatografski koloni, katere nosilni plin je helij. Plini se ločujejo glede na čas, ki ga prebijejo v mobilni fazi. Spremembe v sestavi plina nato zazna detektor, ki meri toplotno prevodnost plina (TCD detektor).

3.2.4 Vrednotenje in statistična analiza

S pomočjo analize variance (ANOVA) v programu Microsoft Office Excel smo opravili sledeče statistične primerjave:

- delež suhe mase v uhatih klobučnjakih glede na način sušenja,
- delež proteinov glede na uporabljeno metodo (BCA, Bradford) za določanje koncentracije proteinov v suhi masi meduz,
- delež proteinov v uhatih klobučnjakih glede na način sušenja,
- delež proteinov v uhatih klobučnjakih glede na lokacijo.

Kot statistično značilne razlike smo privzeli rezultate, če je bila velikost statističnega tveganja $p < 0,05$.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V dosedanjih študijah (Kos, 2009; Lavtižar, 2010; Tinta in sod., 2010) je bilo prikazano, da odmrle meduze predstavljajo organsko bogat substrat in ga bakterije zelo hitro razgradijo, pri tem pa prihaja do sproščanja velikih količin amonija in pomanjkanja kisika, kar negativno vpliva na okolje (Billett in sod., 2006; Titelman in sod., 2006). Za pravilno oceno vpliva razgradnje organske snovi je pomembna kemijska sestava meduz. Tovrstnih podatkov je malo v literaturnih virih, kot tudi za jadranske vrste meduz. Pomanjkljivi so tudi postopki priprave vzorcev in nekaj primerjalnih analiz vključuje moja diplomska naloga.

Meduze smo vzorčili v Tržaškem zalivu, kjer se meduze pojavljajo v večjem številu občasno, in južnem Jadranu na otoku Mljet, kjer je predvsem uhati klobučnjak prisoten v velikem številu vse leto.

Poleg osnovnih morfoloških značilnosti (velikost in teža) sem določila kemično sestavo pri treh vrstah meduz: uhatem klobučnjaku (*Aurelia* spp.), mesečinki (*Pelagia noctiluca*) in morskem klobuku (*Rhizostoma pulmo*). Določila sem vsebnost vode, vsebnost proteinov, ogljika in dušika. Testirala sem razlike v rezultatih glede na različne postopke predpriprave vzorcev, predvsem glede postopka sušenja (liofilizator, sušilnik) in ekstrakcije proteinov. Poleg tega sem testirala kako vpliva na rezultate meritev različna vsebnost soli v vzorcih meduz (dializirani in nedializirani vzorci). Vsebnost proteinov v tkivu meduz sem določala po metodi BCA in metodi po Bradfordu. Shema celotnega postopka predpriprave vzorca in določanja količine proteinov je prikazana na sliki 4.

4.1 Biometrične meritve klobučnjaških meduz

V diplomskem delu sem uporabila 28 vzorcev meduz nabranih v Tržaškem zalivu (Koprski in Piranski zaliv) in 9 vzorcev iz Velikega jezera na otoku Mljet.

Vzorčenja uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.) so bila opravljena v različnem časovnem obdobju v Tržaškem zalivu in v sredozemskem slanim jezeru na otoku Mljet (Veliko jezero, južni Jadran). Vzorčenja mesečinke (*Pelagia noctiluca*) in morskega klobuka (*Rhizostoma pulmo*) pa so bila opravljena samo v Tržaškem zalivu.

V preglednicah 5–9 so prikazane povprečne, minimalne in maksimalne vrednosti za premer klobuka in mokro maso mesečinke (*Pelagia noctiluca*) ulovljene v Tržaškem zalivu ter uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.), ulovljenega na Mljetu (marec, oktober) in Tržaškem zalivu (marec, april). Med vsemi vzorčenimi klobučnjaki je mesečinka najmanjša ($5,5 \pm 0,8$ cm) in najlažja ($29,45 \pm 9,4$ g). Uhati klobučnjaki, ulovljeni marca 2007 v Tržaškem zalivu so bili manjši ($10,2 \pm 2,9$ cm) in lažji ($48,5 \pm 30,1$ g) od osebkov ulovljenih v aprilu ($19,3 \pm 2,8$ cm in $420,9 \pm 169,3$ g). Biometrični podatki uhatega klobučnjaka, ulovljenega marca 2006 na Mljetu so bili primerljivi s tistimi iz Tržaškega zaliva v istem mesecu, medtem ko so bili uhati klobučnjaki, ulovljeni v oktobru 2006 v povprečju nekoliko večji ($13,9 \pm 3,7$ cm) in težji ($261,7 \pm 156,9$ g) od osebkov ulovljenih v marcu. Med vsemi klobučnjaki v Jadranskem morju so največji in najtežji morski klobuki (*Rhizostoma pulmo*). Moji rezultati velikosti in tež ne odstopajo od meritev veliko večjega števila izmerjenih meduz v Jadranu (T. Kogovšek, doktorska disertacija, v pripravi).

4.2 Kemijske analize klobučnjaških meduz

4.2.1 Vsebnost vode v klobučnjaških meduzah

Vsebnost vode v meduzah smo izračunali po tem, ko smo meduze posušili. Sušenje meduz je potekalo v večji meri v liofilizatorju, nekatere večje meduze uhatnega klobučnjaka iz Tržaškega zaliva pa smo sušili v sušilniku na 60 °C, do določene konstantne mase. S preizkušanjem različnih načinov sušenja smo želeli ugotoviti, ali sušenje meduz vpliva na delež suhe mase v meduzi in na koncentracijo proteinov v tkivih meduz.

Delež vode v meduzah smo preračunali glede na delež suhe mase:

$$\% \text{ suhe mase} = \frac{\text{suha masa} \times 100}{\text{mokra masa}} \quad (2)$$

$$\% \text{ vode} = 100 - \% \text{ suhe mase} \quad (3)$$

V preglednici 5 so podani deleži vode posameznih mesečink, glede na njihovo velikost, mokro in suho maso, vzorčenih v Tržaškem zalivu oktobra 2006. Velikosti premera klobuka desetih analiziranih klobučnjakov so se gibale od 4,7 do 6,8 cm, z mokro maso od 20,16 do 36,99 g. Povprečni delež vode v meduzah je bil $96,17 \pm 0,56 \%$.

Preglednica 5: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode liofiliziranih vzorcev (L) mesečink (*Pelagia noctiluca*), vzorčenih v Tržaškem zalivu oktobra 2006

Vzorec	Metoda sušenja	Premer klobuka (cm)	Mokra masa (g)	Suha masa (g)	Vsebnost vode (%)
PN68	L	4,7	20,36	0,58	97,15
PN14	L	6,8	50,84	2,21	95,65
PN9	L	6,0	32,04	1,45	95,47
PN37	L	6,0	33,85	1,43	95,77
PN4	L	5,0	26,60	1,18	95,56
PN23	L	5,0	25,30	0,87	96,55
PN10	L	5,0	20,16	0,67	96,68
PN61	L	4,8	22,22	0,84	96,24
PN63	L	5,2	26,13	1,02	96,09
PN44	L	6,5	36,99	1,27	96,57
Povprečje (± SD)		5,5 ± 0,8	29,4 ± 9,4	1,15 ± 0,5	96,17 ± 0,56

V preglednici 6 in 7 so podani deleži vode posameznih uhatih klobučnjakov, vzorčenih na Mljetu marca in oktobra 2006. Velikosti premera klobuka sedmih analiziranih klobučnjakov meseca marca so se gibale od 7,5 do 11,7 cm, z mokro maso od 15 do 65 g. Povprečni delež vode v meduzah je bil $95,45 \pm 0,54$ %.

V primerjavi z vzorčenji iz marca, so bile v oktobru meduze večjega velikostnega razreda, s premeri klobuka od 10 do 18,5 cm in maso od 110 do 500 g. Povprečni delež vode v meduzah je bil $98,88 \pm 0,27$ %.

Preglednica 6: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode v liofiliziranih vzorcih (L) uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.), vzorčenih na Mljetu marca 2006

Vzorec	Metoda sušenja	Premer klobuka (cm)	Mokra masa (g)	Suha masa (g)	Vsebnost vode (%)
AA21	L	10,0	45	1,77	96,07
AA6	L	7,5	15	0,51	96,57
AA38	L	8,7	35	1,39	96,03
AA16	L	11,7	60	2,30	96,17
AA48	L	10,8	65	1,69	97,40
AA25	L	8,5	25	1,01	95,97
AA43	L	10,1	55	1,72	96,88
Povprečje ($\pm$ SD)		$9,6 \pm 1,5$	$42,9 \pm 18,7$	$1,5 \pm 0,6$	$96,44 \pm 0,54$

Preglednica 7: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode v liofiliziranih vzorcih (L) uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.), vzorčenih na Mljetu oktobra 2006

Vzorec	Metoda sušenja	Premer klobuka (cm)	Mokra masa (g)	Suha masa (g)	Vsebnost vode (%)
AA70	L	14,2	290	3,93	98,64
AA56	L	18,5	380	4,03	98,94
AA69	L	18,1	500	3,24	99,35
AA73	L	10,0	120	1,24	98,97
AA67	L	12,0	170	2,30	98,65
AA64	L	10,8	110	1,41	98,72
Povprečje ($\pm$ SD)		$13,9 \pm 3,7$	$261,7 \pm 156$	$2,7 \pm 1,2$	$98,88 \pm 0,27$

Vsebnost vode v uhatih klobučnjakih iz Mljeta, vzorčenih v oktobru 2006 (98,88 %), je bila v primerjavi z vsebnostjo vode v uhatih klobučnjakih, vzorčenih marca 2006 (96,44 %), nekoliko višja. Glede na to, da so bili vzorci enako sušeni, predvidevamo, da so razlike v vsebnosti vode med posameznimi vzorčenji, posledica razlik v velikosti in pa predvsem v masi vzorčenih meduz. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da je vsebnost vode v večjih in predvsem težjih meduzah večja.

Dobljeni rezultati o povprečnem deležu vode v uhatih klobučnjakih iz Mljeta, vzorčenih v oktobru 2006 (98,88 %), so primerljivi z rezultati Schneider (1988), ki je v uhatem klobučnjaku določil povprečni delež vode 98,24 %.

V preglednici 8 so podani deleži vode posameznih uhatih klobučnjakov, vzorčenih v Tržaškem zalivu marca 2007. Velikosti premera klobuka sedmih analiziranih klobučnjakov so se gibale od 7 do 15,5 cm, z mokro maso od 13,8 do 102 g. Povprečni delež vode v meduzah je bil $96,65 \pm 0,36$ %.

Preglednica 8: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode v liofiliziranih vzorcih (L) uhatega klobučnjaka (*Aurelia spp.*), vzorčenih v Tržaškem zalivu marca 2007

Vzorec	Metoda sušenja	Premer klobuka (cm)	Mokra masa (g)	Suha masa (g)	Vsebnost vode (%)
AA54	L	8,0	32,6	0,92	97,17
AA28	L	15,5	102,0	3,82	96,25
AA48	L	12,5	74,4	2,83	96,19
AA49	L	8,5	30,2	1,00	96,68
AA35	L	9,5	37,4	1,12	96,99
AA23	L	10,5	49,0	1,60	96,74
AA22	L	7,0	13,8	0,48	96,54
Povprečje ($\pm$ SD)		10,2 $\pm$ 2,9	48,5 $\pm$ 30,1	1,7 $\pm$ 1,2	96,65 $\pm$ 0,36

Dobljeni rezultati povprečnega deleža vode v uhatih klobučnjakih, vzorčenih v Tržaškem zalivu marca 2007 ($96,65 \pm 0,36$ %), so primerljivi s povprečnim deležem vode v uhatih klobučnjakih, vzorčenih istega meseca na Mljetu ($96,44 \pm 0,54$ %) (preglednica 6). Rezultati so bili pričakovani, saj so imeli analizirani vzorci podobne biometrične značilnosti.

V preglednici 9 so podani deleži vode posameznih uhatih klobučnjakov, vzorčenih v Tržaškem zalivu aprila 2007, vendar so bili za razliko od ostalih klobučnjakov, ti sušeni v sušilniku pri 60 °C. Rezultate pa smo primerjali z rezultati meduz, ki so bile sušene v liofilizatorju. Velikosti premera klobuka desetih analiziranih klobučnjakov so se gibale od 7 do 15,5 cm, z mokro maso od 13,8 do 102 g. Povprečni delež vode v meduzah je bil $96,65 \pm 0,36 \%$.

Preglednica 9: Premeri, mokre in suhe mase ter vsebnosti vode v sušenih vzorcih (S = sušilnik, 60 °C) uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.), vzorčenih v Tržaškem zalivu aprila 2007

Vzorec	Metoda sušenja	Premer klobuka (cm)	Mokra masa (g)	Suha masa (g)	Vsebnost vode (%)
AA49	S	15,0	205	6,30	96,93
AA35	S	23,0	627	24,71	96,06
AA46	S	17,0	263	7,55	97,13
AA54	S	16,0	219	9,21	95,79
AA55	S	18,0	357	12,57	96,48
AA52	S	20,5	667	21,15	96,83
AA41	S	21,0	476	20,46	95,70
AA47	S	23,0	527	14,42	97,26
AA38	S	21,0	543	22,60	95,84
AA45	S	18,5	325	8,55	97,37
Povprečje (± SD)		19,3 ± 2,8	420,9 ± 169	14,75 ± 6,9	96,54 ± 0,65

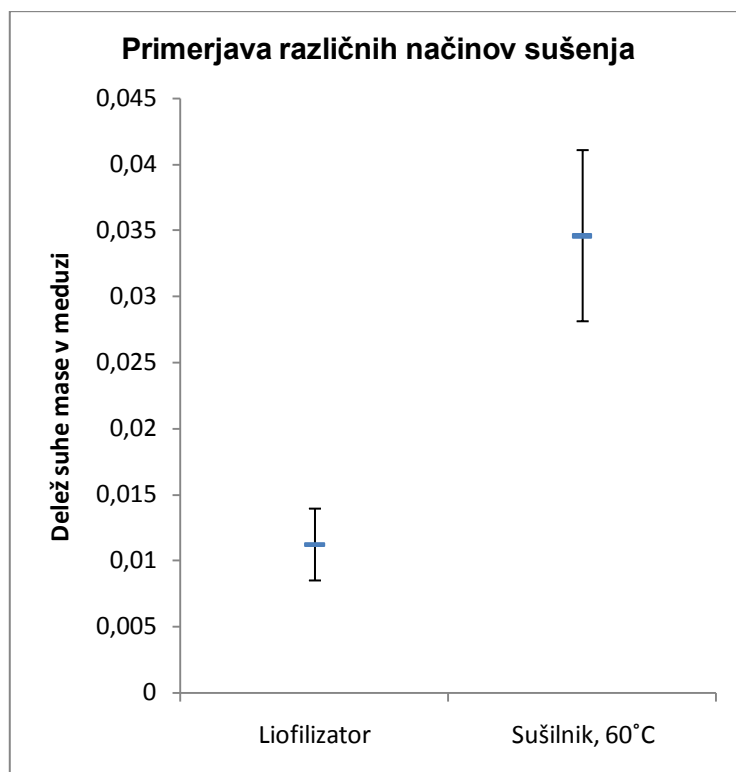
Da bi preverili vpliv različnega sušenja na delež suhe mase v meduzi, smo med sabo primerjali meduze uhatega klobučnjaka večjega velikostnega razreda. Primerjava je pokazala, da so deleži suhe mase v uhatih klobučnjakih sušenih v sušilniku pri 60 °C (preglednica 9), precej večji v primerjavi z deleži suhe mase v uhatih klobučnjakih sušenih v liofilizatorju (preglednica 7). Iz tega lahko sklepamo, da pri sušenju meduz v sušilniku ne pride do popolne izločitve vode in je v suhi masi meduze ostalo vezane še nekaj vode.

Z ANOVA testom smo potrdili statistično značilno razliko med povprečnimi deleži suhe mase meduze posušene v liofilizatorju in povprečnimi deleži suhe mase meduze posušene v sušilniku pri 60 °C (preglednica 10). Primerjava povprečnih deležev suhe mase pridobljene na dva različna postopka sušenja meduz je prikazana na sliki 5. Deleži suhe mase v meduzah posušeni v sušilniku pri 60 °C so precenjeni in ne predstavljajo pravih vrednosti. Rezultati se ujemajo z dognanji nekaterih avtorjev, ki navajajo, da pri sušenju v sušilniku pri 60 °C, ostane v suhi masi vzorca vezane od 10 do 15 % vode (Ceccaldi in sod., 1976; Madin in sod., 1981).

Preglednica 10: Test enofaktorske analize variance med povprečnimi deleži suhe mase meduz, sušenih na različen način (df = število prostostnih stopenj, F = F -razmerje, p = verjetnost)

	df	F	p
Med skupinami	1	69,18	0,0000009
Znotraj skupin	14	-	-

Statistična značilnost: $p < 0,01$



Slika 5: Povprečne vrednosti in standardni odklon deležev suhe mase v meduzah, posušenih v liofilizatorju in sušilniku pri 60 °C ($n = 16$)

V primerjavi z neželatinoznimi organizmi ima lahko velik delež vode v tkivu želatinoznih organizmov kar nekaj prednosti. Glavna prednost je v tem, da lahko dosežejo večje velikosti z relativno malo vnosa ogljika. Njihov metabolizem je relativno počasen v povezavi z velikostjo in rast je lahko zelo hitra, če je hrana bogata z ogljikom (Gerritsen in Strickler, 1977). Zaradi nizke energijske gostote na mokro maso pa so meduze in drugi želatinozni organizmi precej neprivlačni za predatorje in parazite, čeprav je v zadnjem času vse več literaturnih podatkov o organizmih, ki so se sposobni dlje časa prehranjevati z njimi (Doyle in sod., 2007). Poleg tega jim večja velikost omogoča prehranjevanje z večjimi velikostnimi razredi plena, kot tudi močno poveča možnosti, da pride v stik s plenom (Gerritsen in Strickler, 1977). Larson (1986) predvideva, da so se meduze in drugi želatinozni organizmi s spremenjeno kemijsko sestavo, bolj prilagodili morskemu ekosistemu od ostalih vrst zooplanktona.

4.2.2 Testiranje metodološkega postopka za določitev koncentracije proteinov v tkivu meduze

Koncentracije proteinov v tkivih meduz smo določali pri treh različnih klobučnjaških meduzah. Pri tem smo testirali dve kolorimetrični metodi (BCA in Bradford) in različne postopke predpriprave vzorca. S testiranjem smo skušali doseči optimalne pogoje priprave vzorca, izboljšati ponovljivost in občutljivost metod pred določitvijo koncentracije proteinov v tkivih meduz. Zanimalo nas je, kakšen je vpliv ekstrakcijskega sredstva na sprostitve netopnih proteinov v tkivih in v ta namen smo preizkusili tri različne pufre za ekstrakcijo proteinov. Meritve koncentracije proteinov v tkivih meduz smo preizkusili na nedializiranih in dializiranih vzorcih z dvema kolorimetričnima metodama (BCA in Bradford). S primerjavo rezultatov smo poskušali določiti najbolj ugodno metodo analize vzorca, ki smo jo privzeli za vse nadaljnje meritve. Večina metodoloških analiz je potekala na testnih vzorcih uhatnega klobučnjaka meduze AA15 in AA17.

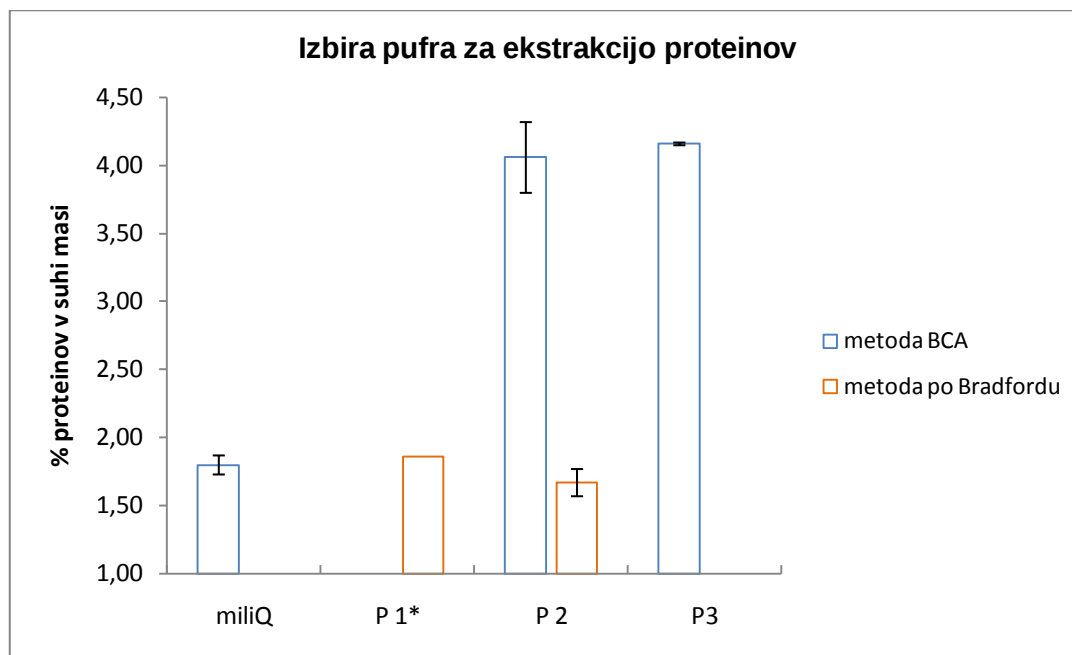
4.2.2.1 Izbira pufra za ekstrakcijo proteinov

V celicah in tkivih obstaja več tisoč različnih proteinov. Da bi lahko vsaj nekatere izločili, se poslužujemo tehnik razbijanja tkiv in raztapljanja proteinov v ekstrakcijskih sredstvih. Uspešna izolacija proteinov je odvisna predvsem od topnosti proteina v določenem mediju, ionske jakosti elektrolitov, pH-ja in temperature.

Ekstrakcijo proteinov smo preizkusili na nedializiranih vzorcih uhatnega klobučnjaka AA15 v štirih različnih medijih (glej sestava puferskih raztopin, poglavje 3.1.2). Zanimalo nas je, s katerim ekstrakcijskim sredstvom lahko dosežemo najvišjo topnost proteinov v tkivih meduz. Za preverjanje učinkovitosti ekstrakcije s pufrom smo vzorec meduze raztopili tudi v deionizirani miliQ vodi, kjer se izločijo samo vodotopni proteini. Vzoredno smo želeli preveriti, ali obstajajo razlike pri določanju koncentracije proteinov z metodo BCA in Bradfordovo metodo.

Rezultati analiz vsebnosti proteinov raztopljenih v štirih različnih medijih (deionizirani vodi MiliQ in pufrih P1, P2 in P3) in določenih z metodo BCA in Bradfordovo metodo so prikazani na sliki 6. Dobljeni rezultati kažejo, da je bila najvišja vsebnost proteinov v vzorcih, ki so bili raztopljeni v pufru za lizo P2 (4,1 % proteinov v suhi masi) in pufru za lizo P3 (4,2 % proteinov), določena po metodi BCA. Medtem ko je bila vsebnost proteinov v vzorcu, prav tako raztopljenem v P2, določena po Bradfordovi metodi za 2,4-krat manjša in je znašala 1,7 % proteinov v suhi masi vzorca. Vzorcu, ki smo ga raztopili v pufru za lizo P1, smo koncentracijo proteinov merili samo po Bradfordovi metodi, ker prisotnost detergenta DTT v pufru ni primerna za metodo BCA, saj onemogoči redukcijo bakrovih ionov. Vsebnost proteinov v vzorcu raztopljenem v P1 je znašala 1,9 %. Pri raztapljanju vzorca v deionizirani miliQ vodi so se izločili samo vodotopni proteini. Delež vodotopnih proteinov, določenih po metodi BCA, je znašal 1,8 % suhe mase vzorca. S primerjavo vsebnosti proteinov v vzorcih, raztopljenih v P2 in P3, določenih z metodo BCA, smo potrdili uspešnost izolacije netopnih proteinov v pufrih.

Na podlagi naših rezultatov smo zaključili, da je glede na podobno vsebnost proteinov v vzorcih raztopljenih v P2 in P3, ki se v osnovi razlikujeta samo v različni koncentraciji prisotnega detergenta Triton X-100, zaradi ekonomičnosti testa bolj smiselno večjo koncentracijo detergenta (5 %), nadomestiti z manjšo (0,1 %) in smo tako pri nadaljnjih analizah vzorce raztapljali v pufru za lizo P2.



Slika 6: Povprečne vrednosti in standardni odklon deležev proteinov v suhi masi vzorca, raztopljenega v štirih različnih medijih (deionizirani vodi MiliQ, pufru P1, P2 in P3), določenih z metodo BCA in Bradfordovo metodo. Vrednosti so povprečja treh meritev znotraj istega vzorca (*opravljena je bila le ena meritev).

S testiranjem različnih metod za določanje koncentracije proteinov, smo ugotovili, da so bile koncentracije proteinov v vzorcih, izmerjenih po metodi BCA, višje od koncentracij proteinov v vzorcih, izmerjenih po Bradfordovi metodi. Razlog za nižje koncentracije proteinov določene po Bradfordovi metodi je lahko v slabši občutljivosti metode za določanje proteinov v tkivu meduze. Metoda BCA se v primerjavi z Bradfordovo odziva bolj enotno pri različnih vzorcih in dopušča prisotnost višjih koncentracij detergenta v vzorcu (Smith in sod., 1985).

Vzrok za razlike v rezultatih bi lahko pripisali tudi nehomogenosti vzorca. Pri posamezni meritvi smo namreč 2 mg podvzorca raztopili v 10 mL pufru in je lahko v primeru slabo homogeniziranega vzorca, zaradi premajhne zatehte, prišlo do velikih odstopanj med meritvami. Vzorca AA15 ni bilo dovolj, da bi lahko opravili triplikat zatehte, zato smo v nadaljevanju testiranj v izogib tovrstnih napak, zatehtali večjo količino vzorca in opravili vsaj tri neodvisne meritve za posamezno metodo.

4.2.2.2 Vpliv soli na določanje koncentracij proteinov

V nadaljevanju smo koncentracije proteinov določali v vzorcih, ki niso vsebovali soli (dializirani vzorci) in vzorcih brez predhodnega odstranjevanja soli (nedializirani vzorci) uhatga klobučnjaka AA17. Vzorec uhatga klobučnjaka smo razdelili na dva dela in en del dializirali v MilliQ vodi, dokler nismo odstranili sol iz liofiliziranega vzorca meduz. Nato smo izmerili proteine v vzorcih, po obeh metodah, da bi ugotovili, če so rezultati primerljivi.

Preglednica 11 prikazuje deleže proteinov v suhi masi nedializiranih vzorcev AA17, določenih po metodi BCA in Bradfordovi metodi. Povprečni delež proteinov v suhi masi, izmerjen po metodi BCA je znašal $1,32 \pm 0,09$, po Bradfordovi metodi pa $1,45 \pm 0,11$.

Preglednica 11: Povprečne vrednosti in standardni odkloni deležev proteinov v suhi masi nedializiranih vzorcev uhatga klobučnjaka AA17, določenih po metodi BCA in Bradfordovi metodi

Količina nedializiranega vzorca AA17	Metoda BCA (% proteinov)	Bradfordova metoda (% proteinov)
4 mg (1)	$1,32 \pm 0,09$	$1,35 \pm 0,12$
4 mg (2)	$1,38 \pm 0,19$	$1,42 \pm 0,28$
4 mg (3)	$1,29 \pm 0,17$	$1,57 \pm 0,35$
Povprečje ($\pm$ SD)	$1,33 \pm 0,05$	$1,45 \pm 0,11$

Statistična analiza ni pokazala značilnih razlik med metodama za določanje vsebnosti proteinov v suhi masi meduz (preglednica 12). Vrednosti so pri obeh metodah približno enakomerno razporejene okoli povprečja. Na podlagi teh rezultatov smo zaključili, da sta obe metodi primerni za določanje proteinov v nedializiranih vzorcih.

Preglednica 12: Test dvofaktorske analize variance med metodama za določanje vsebnosti proteinov v suhi masi meduz (df = število prostostnih stopenj, F = F -razmerje, p = verjetnost)

	df	F	p
Metoda	1	1,406	0,259
Zatehta	2	0,750	0,493
Metoda : zatehta	2	0,775	0,483

Statistična značilnost: $p < 0,05$

Zaradi majhnih deležev proteinov izmerjenih v nedializiranih vzorcih, smo v nadaljevanju koncentracijo proteinov v suhi masi izmerili na dializiranih vzorcih AA17. Predvidevamo namreč, da zaradi velikega deleža soli in majhnega organskega deleža v suhi masi vzorca, prihaja do velike variabilnosti rezultatov. Želeli smo ugotoviti, kakšni so deleži proteinov v vzorcih brez prisotnosti soli.

V preglednici 13 so prikazani deleži proteinov v suhi masi dializiranih vzorcev AA17, določenih po metodi BCA in Bradfordovi metodi. Povprečni delež proteinov izmerjen po metodi BCA ($15,91 \pm 4,79$) je bil večji v primerjavi z deležem, izmerjenim po Bradfordovi metodi ($10,57 \pm 2,70$), vendar so bile vrednosti pri obeh metodah precej neenakomerno razporejene okoli povprečja.

Preglednica 13: Povprečne vrednosti in standardni odkloni deležev proteinov v suhi masi dializiranih vzorcev uhataga klobučnjaka AA17, določenih po metodi BCA in Bradfordovi metodi

Količina dializiranega vzorca AA17	Metoda BCA (% proteinov)	Bradfordova metoda (% proteinov)
0,4 mg (1)	$13,97 \pm 6,86$	$8,74 \pm 0,95$
0,4 mg (2)	$12,40 \pm 1,18$	$9,30 \pm 1,65$
0,4 mg (3)	$21,36 \pm 4,05$	$13,67 \pm 0,75$
Povprečje ($\pm$ SD)	$15,91 \pm 4,79$	$10,57 \pm 2,70$

V preglednici 14 so rezultati ANOVA testa, s katerim smo potrdili statistično značilno razliko med uporabljenima metodama za določanje vsebnosti proteinov v suhi masi meduz.

Preglednica 14: Test dvofaktorske analize variance med metodama za določanje vsebnosti proteinov v suhi masi meduz (df = število prostostnih stopenj, F = F -razmerje, p = verjetnost)

	df	F	p
Metoda	1	11,903	0,005
Zatehta	2	9,781	0,003
Metoda : zatehta	2	0,823	0,462

Statistična značilnost: $p < 0,01$

Glavni razlog za takšne razlike smo pripisali premajhni količini uporabljenega dializiranega vzorca. Do napak lahko pride že med samim tehtanjem, lahko so pa variacije med paralelkami istih analiznih vzorcev posledica nekoliko slabše homogenizacije dializiranih vzorcev.

Da bi preverili ali obstajajo napake zaradi majhne količine zatehte, smo po enakem postopku pripravili zatehto 10 mg dializiranega vzorca, ki smo ga raztopili v pufru do končnega volumna 10 ml.

V preglednici 15 so prikazani deleži proteinov v suhi masi dializiranih vzorcev AA17, določenih po metodi BCA. Dobljeni rezultati kažejo, da z večjo zatehto vzorca (10 mg) dosežemo večjo ponovljivost rezultatov med posameznimi meritvami ($21,39 \pm 0,29 \%$). Istočasno smo s podaljšanjem časa centrifugiranja (15 min), dosegli večjo ponovljivost meritev znotraj posameznega vzorca, kar se kaže v manjšem standardnem odklonu.

Preglednica 15: *Povprečne vrednosti in standardni odkloni deležev proteinov v suhi masi dializiranih vzorcev uhatega klobučnjaka AA17, določenih po BCA metodi*

Količina dializiranega vzorca AA17	% proteinov v suhi masi (metoda BCA)
10 mg	$19,98 \pm 1,11$
10 mg (1)	$21,19 \pm 0,50$
10 mg (2)	$21,60 \pm 0,21$
Povprečje ($\pm$ SD)	$21,39 \pm 0,29$

S tako optimizirano pripravo dializiranih vzorcev, smo v nadaljevanju določili delež proteinov v treh različnih klobučnjaških meduzah. Na podlagi testiranj smo zaključili, da je Bradfordova metoda, v primerjavi z metodo BCA, nekoliko manj občutljiva za določanje koncentracije proteinov v tkivih meduz, zato smo nadaljnje analize določali z metodo BCA.

4.2.3 Vsebnost proteinov v klobučnjaških meduzah

Vsebnost proteinov smo določali s kolorimetrično metodo BCA v dializiranih vzorcih klobučnjaških meduz, za katero smo se odločili na podlagi predhodnih testiranj, pri katerih smo določili optimalne pogoje priprave vzorca in tako izboljšali občutljivost in ponovljivost metode. Primerjali smo vsebnost proteinov v treh različnih klobučnjaških meduzah (uhati klobučnjak, mesečinka in morski klobuk), vzorčenih v Tržaškem zalivu. Preverili smo tudi, kakšen je vpliv različnega načina sušenja na koncentracijo proteinov v tkivu meduze. Vzoredno smo želeli ugotoviti, ali obstajajo razlike v deležu proteinov iste vrste meduze, vzorčene na različnih lokacijah. V ta namen smo analizirali tudi uhate klobučnjake iz Mljeta.

Vse vzorce klobučnjakov meduz smo analizirali v treh paralelkah, kar pomeni, da smo pripravili tri raztopine z zatehtami istega vzorca. Prav tako smo znotraj vsake paralelke, koncentracijo proteinov izmerili najmanj trikrat.

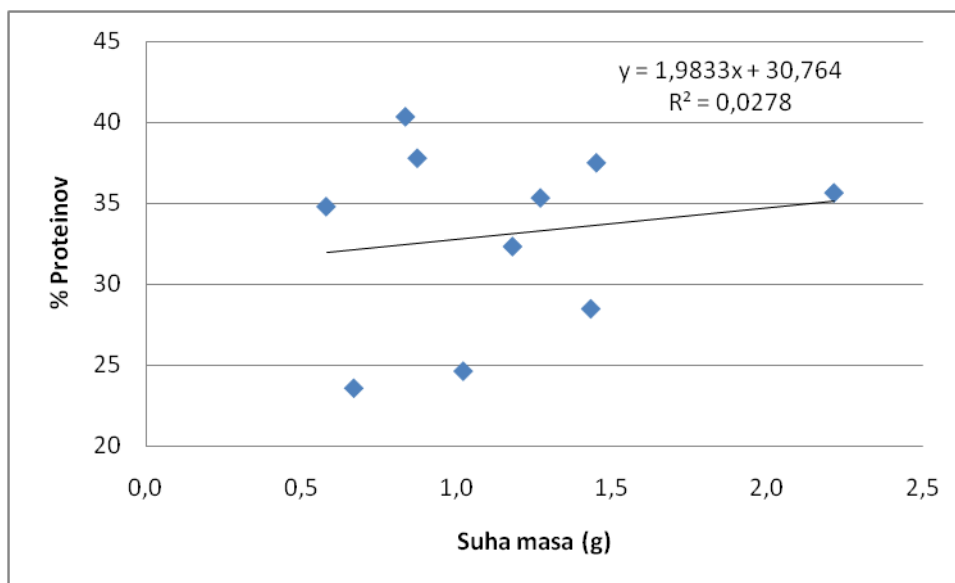
4.2.3.1 Delež proteinov pri klobučnjaških meduzah Tržaškega zaliva

Pri desetih osebkih mesečinke (*Pelagia noctiluca*), vzorčene oktobra 2006, smo določili delež proteinov v suhi masi. Deleži proteinov so znašali od minimalno 23,60 do maksimalno 40,34 % suhe mase, s povprečno vrednostjo $33,18 \pm 5,69$ %. Rezultati deležev proteinov v posameznih osebkih so prikazani v spodnji preglednici.

Vsebnost proteinov smo primerjali z nekaterimi biometričnimi podatki, in sicer: suho maso ($R^2 = 0,0278$), mokro maso ($R^2 = 0,0378$) in premerom klobuka ($R^2 = 0,0126$). Primerjava je pokazala, da se s povečanjem biometričnih parametrov delež proteinov ne spreminja statistično značilno. Prikaz korelacije med povprečnimi deleži proteinov in suho maso je na sliki 7.

Preglednica 16: Povprečni deleži proteinov v posameznih osebkih mesečinke, vzorčenih oktobra 2006. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator)

Vzorec	Način sušenja	% proteinov v suhi masi
PN4	L	32,34
PN37	L	29,12
PN68	L	34,80
PN14	L	36,00
PN23	L	37,79
PN10	L	23,60
PN9	L	37,86
PN61	L	40,34
PN44	L	35,34
PN63	L	24,65
Povprečje ($\pm$ SD)		33,18 $\pm$ 5,69



Slika 7: Povprečni deleži proteinov določenih v dializiranih vzorcih mesečinke glede na suho maso meduze ($n = 10$)

Rezultati meritev deležev proteinov v vzorcih morskega klobuka so prikazani v preglednici 17. Morski klobuki (*Rhizostoma pulmo*) so zelo velike meduze, zato smo koncentracijo proteinov določali v izoliranih tkivih ustnih ramen in klobuka. Izolirana tkiva so bila posušena na dva različna načina (liofilizator, sušilnik pri 60 °C).

Preglednica 17: Povprečni deleži proteinov v posameznih vzorcih morskega klobuka, vzorčenih januarja in februarja 2007. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator, S = sušilnik pri 60 °C)

Vzorec	Način sušenja	% proteinov	
		ustna ramena	klobuk
RH1	L	31,61 ± 0,41	21,47 ± 0,45
RH2	L	30,39 ± 0,61	22,18 ± 0,67
RH11	L	32,66 ± 0,96	31,59 ± 1,22
Povprečje (± SD)		31,55 ± 1,14	25,08 ± 5,65
RH11	S	20,53 ± 0,12	17,72 ± 0,22
RH10	S	15,65 ± 0,20	7,80 ± 0,44

Delež proteinov v tkivu ustnih ramen morskega klobuka je znašal 31,61 ± 0,41 % suhe mase, medtem ko je bil delež proteinov v tkivu klobuka za približno 10 % nižji (21,47 ± 0,45 %). Podoben trend se je pokazal pri ostalih dveh osebkih vzorčenih februarja, kjer je bila vsebnost proteinov v tkivih ustnih ramen višja, kot v klobuku. Vendar so bili deleži proteinov v osebku, katerih tkiva so bila posušena v liofilizatorju, precej višji (30,39 ± 0,61 % ustna ramena; 22,18 ± 0,67 % klobuk) v primerjavi z deleži proteinov v tkivih, posušeni v sušilniku pri 60 °C (15,65 ± 0,20 % ustna ramena; 7,80 ± 0,44 % klobuk).

Glede na velike razlike deležev proteinov v tkivih, posušenih na različen način, smo preverili vpliv sušenja tkiv na istem osebk (RH11). Delež proteinov v tkivih, sušenih v liofilizatorju je znašal $32,66 \pm 0,96$ % v ustnih ramenih in $31,59 \pm 1,22$ % v klobuku, medtem ko so bili deleži proteinov istega osebk v tkivih, sušenih v sušilniku pri 60 °C precej nižji in so znašali $20,53 \pm 0,12$ % v ustnih ramenih in $17,72 \pm 0,22$ % v klobuku (preglednica 17).

Na podlagi deležev proteinov v tkivih istega osebk morskega klobuka, posušenega na dva različna načina, lahko zaključimo, da je sušenje v liofilizatorju primernejša metoda, saj omogoča bolj natančno določitev količine proteinov v suhi masi. Delež proteinov se razlikuje relativno na suho maso, ki je večja pri sušenju v sušilniku, zaradi ostanka vode, kar smo statistično potrdili pri določanju suhe mase v meduzah uhatih klobučnjakov (preglednica 10). Da bi lahko z gotovostjo potrdili sklep, bi bilo potrebno analizirati večje število osebkov, posušenih na oba načina.

Podobne razlike v koncentracijah proteinov smo dobili, tudi ko smo testirali liofilizirane in neliofilizirane vzorce uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.). Iz preglednice 18 je razvidno, da se deleži proteinov v liofiliziranih vzorcih uhatih klobučnjakov precej razlikujejo od deležev proteinov v klobučnjaki, sušenih v sušilniku. Tovrstni rezultati deležev proteinov v tkivih sušenih na različen način, kažejo da rezultati niso primerljivi med sabo. Statistično značilne razlike v deležih proteinov v meduzah, sušenih na različen način, smo podkrepili z ANOVA testom (preglednica 19).

Preglednica 18: Povprečni deleži proteinov v posameznih osebkih uhatega klobučnjaka, vzorčenih marca in aprila 2007. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator, S = sušilnik pri 60 °C)

Vzorec	Vzorčenje	Način sušenja	% proteinov
AA23	marec	L	19,63
AA28	marec	L	13,36
AA48	marec	L	14,18
AA49	marec	L	13,78
Povprečje (± SD)	15,24 ± 2,95		
AA52	april	S	7,19
AA55	april	S	8,07
AA47	april	S	8,71
AA38	april	S	6,47
AA54	april	S	8,89
AA41	april	S	5,79
AA35	april	S	7,00
AA49	april	S	10,76
AA46	april	S	9,77
AA45	april	S	13,79
Povprečje (± SD)	8,64 ± 2,37		

Preglednica 19: Test enofaktorske analize variance med povprečnimi deleži proteinov v meduzah, sušenih na različen način (df = število prostostnih stopenj, F = F -razmerje, p = verjetnost)

	df	F	p
Med skupinami	1	33,5226	0,0001
Znotraj skupin	11	-	-

Statistična značilnost: $p < 0,01$

Pri analizah uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.), vzorčenega marca 2007 v Tržaškem zalivu, so bile meduze srednjega velikostnega razreda, s premerom klobuka od 8,5 do 15,5 cm. Deleži proteinov so znašali od minimalno 13,36 do maksimalno 19,63 % suhe mase, s povprečno vrednostjo $15,24 \pm 2,95$ %. Meduze uhatega klobučnjaka, vzorčene v aprilu, so bile nekoliko večjega velikostnega razreda, s premerom klobuka od 15 do 23 cm, posušene v sušilniku pri 60 °C. Deleži proteinov so znašali od minimalno 7 do maksimalno 13,79 % suhe mase, s povprečno vrednostjo $8,64 \pm 2,37$ %.

Poleg tega smo analizirali vzorce meduz uhatega klobučnjaka z Mljeta. Pri osebkih, vzorčenih v marcu, je delež proteinov v povprečju znašal $15,42 \pm 1,03$ % suhe mase. Povprečni delež proteinov pri uhatih klobučnjakih, vzorčenih oktobra, je bil nekoliko višji in je znašal $20,84 \pm 2,44$ %. Rezultati deležev proteinov v posameznih osebkih so prikazani v preglednici 20 in 21.

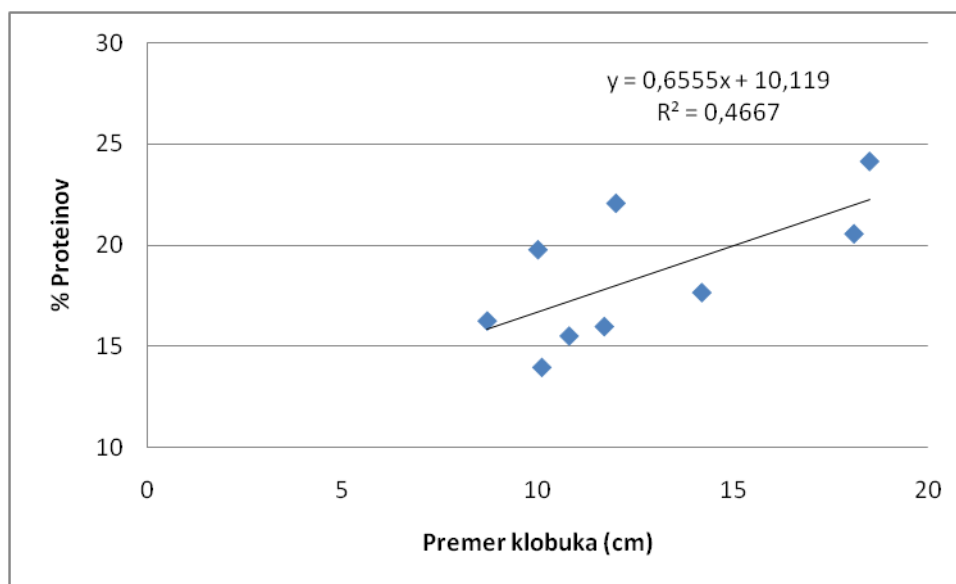
Preglednica 20: Povprečni deleži proteinov v posameznih osebkih uhatega klobučnjaka, vzorčenih marca 2006. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator)

Vzorec	Način sušenja	% proteinov
AA16	L	15,97
AA38	L	16,25
AA43	L	13,95
AA48	L	15,50
Povprečje ($\pm$ SD)		15,42 $\pm$ 1,03

Preglednica 21: Povprečni deleži proteinov v posameznih osebkih uhatega klobučnjaka, vzorčenih oktobra 2006. Vsebnost proteinov je izražena kot % suhe mase dializata. (L = liofilizator)

Vzorec	Način sušenja	% proteinov
AA56	L	24,14
AA67	L	22,07
AA69	L	20,56
AA70	L	17,65
AA73	L	19,77
Povprečje ($\pm$ SD)		20,84 $\pm$ 2,44

Dobljeni rezultati deležev proteinov določenih v vseh vzorcih uhatega klobučnjaka iz Mljeta glede na velikostni razred meduze so prikazani na sliki 8. Korelacija med vsebnostjo proteinov v uhatih klobučnjakih in velikostjo osebkov je statistično značilna ($R^2 = 0,4667$). Velikost meduze namreč vpliva na iniciacijo spolnega zorenja in izkupiček produkcije spolnih celic, v katerih je večja vsebnost proteinov. Lucas (1994) je s preučevanjem biokemične sestave v različnih delih uhatega klobučnjaka ugotovila, da je vsebnost proteinov najvišja v tkivih gonad in ustnih ramen. Za potrditev naše domneve, bi bilo v takšnih primerih bolj smiselno določanje deležev proteinov v izoliranih tkivih gonad, da bi preverili ali je delež proteinov pogojen s spolno zrelostjo meduze.



Slika 8: Povprečni deleži proteinov določenih v dializiranih vzorcih uhatih klobučnjakov glede na velikostni razred meduze ($n = 9$)

Statistično značilne korelacije med vsebnostjo proteinov v tkivih meduz in njihovimi biometričnimi značilnostmi smo želeli poiskati tudi znotraj drugih posameznih vrst klobučnjaških meduz vendar jih nismo dobili (slika 7). To smo pripisali premajhnemu številu vzorcev in neenakomerni porazdelitvi starosti med osebki. Večina osebkov znotraj posamezne vrste je bila približno enakih starosti s podobnimi biometričnimi karakteristikami, zato je bilo težko sklepati o kakršnihkoli odnosih. Za opazovanje najrazličnejših razmerij med deleži proteinov in biometričnimi parametri znotraj vrste, bi morali imeti na razpolago večje število osebkov, predvsem pa bi morali biti osebki zastopani v različnih starostih. Optimalno bi bilo, če bi bili osebki zastopani od najmlajših (efire) pa do najstarejših spolno zrelih osebkov, vendar je to realno zelo težko izvedljivo.

Da bi ugotovili, ali obstajajo razlike v biokemični sestavi iste vrste meduze vzorčene na različnih lokacijah, smo zaradi podobnih biometričnih značilnosti med sabo primerjali deleže proteinov v uhatih klobučnjakih vzorčenih marca na Mljetu in v Tržaškem zalivu (preglednica 18 in 20). Z ANOVA testom smo pokazali, da med populacijama ni statistično značilnih razlik (preglednica 22). Rezultati deležev proteinov v uhatih klobučnjakih vzorčenih na Mljetu ($15,42 \pm 1,03$ %) so bili primerljivi z rezultati v uhatih klobučnjakih v Tržaškem zalivu ($15,24 \pm 2,95$ %). Na podlagi dobljenih rezultatov, bi lahko sklepali, da se vsebnost proteinov znotraj iste vrste uhatega klobučnjaka

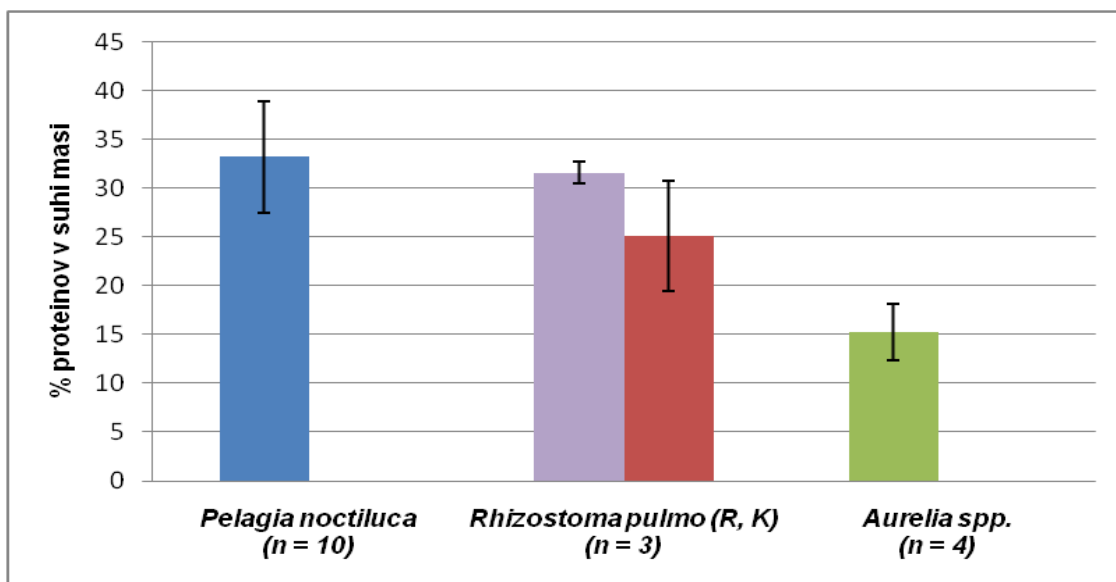
vzorčenega na različnih lokacijah ne spreminja. Da bi lahko z gotovostjo potrdili sklep, bi bilo potrebno analizirati večje število osebkov in opraviti pogostejša vzorčenja.

Preglednica 22: Test enofaktorske analize variance med povprečnimi deleži proteinov v meduzah, vzorčenih na različnih lokacijah (*df* = število prostostnih stopenj, *F* = *F*-razmerje, *p* = verjetnost)

	df	F	p
Med skupinami	1	0,009	0,926
Znotraj skupin	6	-	-

Statistična značilnost: $p < 0,05$

Na sliki 9 so zbrani rezultati vseh analiz povprečnih deležev proteinov v različnih klobučnjaških meduzah iz Tržaškega zaliva, sušenih v liofilizatorju. Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da je največji delež proteinov zastopan v mesečinki ($33,18 \pm 5,69 \%$). Velik delež proteinov je prav tako v ustnih ramenih morskega klobuka ($31,55 \pm 1,14 \%$), medtem ko je vsebnost proteinov v tkivih klobuka nekoliko nižja ($25,08 \pm 5,65 \%$). Deleži proteinov so v uhatih klobučnjakih najmanjši in predstavljajo $15,24 \pm 2,95 \%$ suhe mase.



Slika 9: Povprečne vrednosti in standardni odklon deležev proteinov v suhi masi meduz *Pelagia noctiluca*, *Rhizostoma pulmo* (R = ustna ramena, K = klobuk) in *Aurelia spp.* v Tržaškem zalivu

4.2.4 Elementna sestava (C, N) klobučnjaških meduz

Poleg vsebnosti proteinov smo dializiranim vzorcem klobučnjaških meduz določili tudi vsebnost ogljika in dušika s pomočjo elementnega analizatorja. Ugotoviti smo želeli, kakšne so razlike v elementni sestavi pri različnih klobučnjaških meduzah Tržaškega zaliva ter morebitne razlike uhatega klobučnjaka vzorčenega na Mljetu in Tržaškem zalivu. Z določitvijo razmerja med ogljikom in dušikom smo želeli oceniti, kakšen delež organske komponente zastopajo proteini, zato smo dobljene rezultate razmerij C/N primerjali z deleži proteinov v dializiranih vzorcih klobučnjaških meduz, vzorčenih v Tržaškem zalivu.

4.2.4.1 Klobučnjaške meduze iz Tržaškega zaliva

V dializiranih vzorcih mesečinke (*Pelagia noctiluca*) se je delež ogljika gibal od minimalno 47,59 do maksimalno 49,86 %, delež dušika pa od 11,79 do 13,95 % suhe mase. Vrednosti za razmerje C/N so se gibale od 3,39 do 4,66, s povprečno vrednostjo $3,71 \pm 0,47$.

Pri morskem klobuku (*Rhizostoma pulmo*) so se pokazale velike razlike deležev proteinov v tkivih, posušenih na različen način, zato smo elementno sestavo prav tako določali v tkivih, ki so bila predhodno sušena na različna načina (liofilizator, sušilnik pri 60 °C). Delež ogljika je v tkivu ustnih ramen, ki so bila posušena v liofilizatorju, znašal 43,15 %, v tkivu klobuka pa je bil delež nekoliko večji in je znašal 47,42 % suhe mase. Delež dušika je v tkivu ustnih ramen znašal 11,81 %, v tkivu klobuka pa je bil delež 12,38 % suhe mase. Razmerje C/N je v tkivih ustnih ramen znašalo 3,65, medtem ko je bilo razmerje v tkivih klobuka nekoliko večje in je znašalo 3,83. Manjše razmerje C/N v tkivih ustnih ramen se odraža v nekoliko večjem deležu proteinov ($32,66 \pm 0,96$) v primerjavi z deležem proteinov v tkivu klobuka ($31,59 \pm 1,22$).

Delež ogljika je v tkivu ustnih ramen, ki so bila posušena v sušilniku pri 60 °C, znašal 46,88 %, v tkivu klobuka pa je bil delež nekoliko večji in je znašal 48,21 % suhe mase. Delež dušika je v tkivu ustnih ramen znašal 10,56 %, v tkivu klobuka pa je bil delež 11,2 % suhe mase. Razmerje C/N je v tkivih ustnih ramen znašalo 4,44, medtem ko je bilo razmerje v tkivih klobuka nekoliko manjše in je znašalo 4,31. Elementna sestava se v tkivih sušenih v sušilniku razlikuje od tiste sušene v liofilizatorju, saj sta deleža ogljika in dušika izražena relativno na suho maso, ki pa se med metodama sušenja razlikuje.

V dializiranih vzorcih uhatih klobučnjakov (*Aurelia* spp.), vzorčenih marca, se je delež ogljika gibal od 48,89 do 50,67 %, medtem ko je bil delež dušika manjši in je znašal od 11,86 do 12 % suhe mase. Vrednosti za razmerje C/N so se gibale od 4,12 do 4,27, s povprečno vrednostjo $4,19 \pm 0,06$.

Uhati klobučnjaki vzorčeni aprila 2007 so bili sušeni v sušilniku pri 60 °C. V dializiranih vzorcih, se je delež ogljika gibal od 38,88 do 51,86 %, delež dušika pa od 6,15 do 9,76 % suhe mase. Vrednosti za razmerje C/N so se gibale od 4,78 do 6,32, s povprečno vrednostjo $5,53 \pm 0,56$.

V preglednici 23 so prikazane minimalne, maksimalne in povprečne vrednosti za delež ogljika, dušika in razmerja C/N v dializiranih vzorcih klobučnjaških meduz iz Tržaškega zaliva. Primerjava je vključevala samo meduze, ki so bile predhodno sušene v liofilizatorju. Povprečni delež ogljika je bil največji v uhatem klobučnjaku $49,95 \pm 0,8$ %, najnižji pa v tkivu ustnih ramen morskega klobuka ($43,15$ %), medtem ko je bil povprečni delež dušika največji v mesečinki in je znašal $13,12 \pm 0,67$ %. Največje razmerje C/N je bilo določeno v uhatem klobučnjaku $4,19 \pm 0,06$, najmanjše pa v tkivu ustnih ramen morskega klobuka ($3,65$).

Preglednica 23: Primerjava deležev C, N in razmerja C/N v dializiranih osebkih mesečinke (*Pelagia noctiluca*), uhatega klobučnjaka (*Aurelia* spp.) in morskega klobuka (*Rhizostoma pulmo*) iz Tržaškega zaliva, predhodno sušenih v liofilizatorju

Vrsta	Število	% C			% N			Razmerje C/N		
		$\bar{X} (\pm SD)$	Min	Max	$\bar{X} (\pm SD)$	Min	Max	$\bar{X} (\pm SD)$	Min	Max
<i>Pelagia noctiluca</i>	10	48,49 $\pm$ 0,70	47,59	49,86	13,12 $\pm$ 0,67	11,79	13,95	3,71 $\pm$ 0,24	3,41	4,23
<i>Aurelia</i> spp.	4	49,95 $\pm$ 0,80	48,89	50,67	11,91 $\pm$ 0,06	11,86	12,00	4,19 $\pm$ 0,06	4,12	4,27
<i>Rhizostoma pulmo</i> (ustna ramena)	1	43,15			11,81			3,65		
<i>Rhizostoma pulmo</i> (klobuk)	1	47,42			12,38			3,83		

V preglednici 24 smo s primerjavo povprečnih deležev proteinov in razmerij C/N v dializiranih vzorcih različnih klobučnjaških meduz iz Tržaškega zaliva pokazali, da se velika količina proteinov v tkivih odraža v razmeroma nizkem razmerju C/N. V uhatem klobučnjaku (*Aurelia* spp.) je bil delež proteinov najmanjši, kar se odraža v nekoliko višjem razmerju C/N.

Podobne rezultate elementne sestave smo dobili pri analizah vzorcev uhatih klobučnjakov vzorčenih na Mljetu. Vrednosti za razmerje C/N so bile v povprečju $4,14 \pm 0,34$.

Preglednica 24: Primerjava povprečnih deležev proteinov z razmerji C/N v suhi masi dializata različnih klobučnjaških meduzah iz Tržaškega zaliva

Vrsta	Število	% proteinov	C/N razmerje
<i>Pelagia noctiluca</i>	10	$33,18 \pm 5,69$	$3,71 \pm 0,24$
<i>Rhizostoma pulmo</i> (ustna ramena)	1	$32,66 \pm 0,96$	3,65
<i>Rhizostoma pulmo</i> (klobuk)	1	$31,59 \pm 1,22$	3,83
<i>Aurelia</i> spp.	4	$15,24 \pm 2,95$	$4,19 \pm 0,06$

Dobljene ugotovitve smo podkrepili z dognanji avtorjev, ki navajajo, da predstavljajo proteini največji delež organske komponente v telesu skifomeduz (Shimauchi in Uye, 2007 cit. po Schneider, 1988; Pitt in sod., 2009). Proteini se kot encimi, toksini in pigmenti pojavljajo v kapsulah nematocist in v kolagenskih vlaknih mezogleje (Pitt in sod., 2009). Rezultati elementne sestave so zelo pomembni tudi iz vidika razumevanja posledic po kolapsu populacije, saj je bilo ugotovljeno, da so klobučnjaške meduze zelo ugoden substrat za rast morske bakterijske združbe. Bakterije hitro razgradijo beljakovine vezane v tkivu klobučnjaških meduz, pri čemer pride do velikega sproščanja anorganskih hranil (Lavtižar, 2010).

4.2.5 Vpliv biokemične sestave meduz na kroženje organske in anorganske snovi v morju

Znanje o biokemični in elementni sestavi meduz predstavlja osnovo za razumevanje in določanje biomase populacije, kroženja snovi in energije prek prehranjevalne verige ter za oceno doprinosa organske snovi na morskem dnu prek bakterijske razgradnje odmrlih meduz (Percy in Fife, 1981).

Ob ugotavljanju posledic masovnih pojavljanj klobučnjakov na ekosistem je potrebno upoštevati vplive še živečih populacij klobučnjakov in učinke ob razgradnji, ko populacije odmrejo. Pitt in sod. (2009) navajajo, da je hitrost sproščanja organskega ogljika ob razgrajevanju meduze za več kot stopnjo višja kot hitrost sproščanja organskega ogljika, ki ga v okolje sprošča živeča meduza. Produkti razgradnje proteinov (amini, proste aminokisline) prispevajo k celotni koncentraciji raztopljenega organskega in anorganskega dušika v okoljski morski vodi, razgradni produkti lipidov (fosfolipidi v celičnih membranah) in nukleinske kisline pa prispevajo k celotni koncentraciji raztopljenega organskega fosforja (Arai, 1997). Poleg velikega recikliranja elementov, pa lahko ob razgradnji odmrle biomase pride do povečane porabe kisika, kar lahko privede do lokalne hipoksije in posledično do sprememb v delovanju ekosistema (Pitt in sod., 2009).

Učinek izločanja hranilnih snovi preko klobučnjaških meduz je še toliko bolj pomemben v oligotrofnih morjih, kamor sodi tudi Tržaški zaliv (Pitt in sod., 2009). Do kolikšne mere pa lahko razgrajevanje meduz ogrozi ekosistem, je odvisno predvsem od gostote odmrlih skifomeduz in mešanja vodnih mas. V Tržaškem zalivu je največja verjetnost večjega kopičenja hranilnih snovi ob razgradnji odmrlih skifomeduz pozno poleti in jeseni v obdobju izotermije, ko je mešanje plasti morske vode šibko (Turk in sod., 2007).

Dobljene rezultate o elementni sestavi in deležu proteinov v uhatem klobučnjaku, mesečinki in morskem klobuku iz Tržaškega zaliva, lahko dopolnimo in podkrepimo z raziskavo Lavtižar (2010), ki je v kontroliranih laboratorijskih pogojih na istih vrstah klobučnjaških meduz, proučevala hitrost bakterijske razgradnje in posledice razgradnje meduz. Proces razgradnje je spremljala z meritvijo koncentracije proteinov in anorganskih hranil v filtratu morske vode s homogenotom različnih vrst meduz. Ugotovila je, da pri razgradnji organskega tkiva meduz, upada koncentracija proteinov in se povečuje koncentracija fosfata in amonija, kateri predstavlja končni produkt pri razgradnji proteinov. Koncentracije hranil so bile povsod najvišje pri vzorcu z mesečinko, nekoliko nižje pri morskem klobuku in najnižje pri uhatem klobučnjaku. Predvidevala je, da je do razlik v koncentracijah sproščenih hranil med posameznimi vrstami skifomeduz prišlo zaradi razlik v kemični sestavi njihovega tkiva, kar tudi potrjujejo rezultati deležev proteinov in elementne sestave naših raziskav.

Do velikega sproščanja hranil in povečane porabe kisika je prihajalo tudi v poskusu raziskovalcev West in sod. (2009), ki so poskus izvedli s klobučnjakom *Catostylus mosaicus*, redu *Rhizostomea*. Ugotovili so, da se je potreba po kisiku na koncu inkubacijskega obdobja z dodano poginulo meduzo povečala za 209 % v primerjavi s kontrolo.

5 ZAKLJUČKI

Masovni pojavi meduz so kratkotrajni, nato pa število osebkov populacije hitro upade, pri čemer pride v zelo kratkem času do velikega kopičenja organske snovi v vodi ali na morskem dnu. Zaloga ogljika v tkivih odmrlih meduz predstavlja zelo ugoden substrat za rast morske bakterijske združbe in lahko pomembno vpliva na procese v prehranjevalni verigi. Za pravilno oceno vpliva razgradnje organske snovi je pomembna kemijska sestava meduz. V ta namen sem v diplomski nalogi preučila kemijsko sestavo treh vrst klobučnjaških meduz, ki se v zadnjih desetih letih v Tržaškem zalivu vse pogosteje in obilneje pojavljajo.

Kemijske analize so vključevale določanje vsebnosti vode v meduzah, ter vsebnost proteinov, ogljika in dušika v suhi masi meduz.

Zamrznjene meduze sem sušila v večji meri v liofilizatorju, nekatere večje meduze uhatega klobučnjaka iz Tržaškega zaliva pa sem sušila v sušilniku na 60 °C, do določene konstantne mase. Iz dobljene suhe mase sem nato preračunala vsebnost vode v meduzah. Vsebnost vode v mesečinkah je v povprečju znašala 96,17 %, v uhatih klobučnjakih pa so se vrednosti gibale od 96,44 do 98,88 %. Rezultati so pokazali, da je vsebnost vode v meduzah večjih velikostnih razredov večja v primerjavi z manjšimi meduzami.

Na podlagi različnega sušenja sem ugotovila, da pri sušenju meduz v sušilniku ne pride do popolne izločitve vode, kar se odraža v precenjenem deležu suhe mase in posledično premajhni vsebnosti vode v meduzi. Nekateri avtorji navajajo, da pri sušenju v sušilniku pri 60 °C, ostane v suhi masi vzorca vezane od 10 do 15 % vode (Ceccaldi in sod., 1976; Madin in sod., 1981).

Ker predstavljajo proteini največji delež organske komponente v meduzah, sem se pri določanju biokemične sestave meduz osredotočila na vsebnost proteinov v tkivih meduz. Na podlagi predhodnih testiranj sem izbrala optimalni ekstrakcijski pufer in zaključila, da je določanje vsebnosti proteinov v dializiranih vzorcih bolj primerno od tistega v nedializiranih, kjer zaradi velikega deleža soli in majhnega organskega deleža v suhi masi vzorca, lahko pride do velike variabilnosti rezultatov. Koncentracijo proteinov sem pri testiranjih določala po metodi BCA in Bradfordovi metodi, v nadaljevanju pa sem koncentracijo proteinov v različnih klobučnjaških meduzah določala samo po metodi BCA.

Vsebnost proteinov se je v različnih vrstah klobučnjaških meduz iz Tržaškega zaliva razlikovala. Najvišjo vsebnost proteinov sem izmerila v dializiranih vzorcih mesečinke (33,18 %), visoka pa je bila tudi v tkivih ustnih ramen morskih klobukov (31,55 %), medtem ko je bila vsebnost v tkivih klobuka nekoliko nižja (25,08 %). Vsebnost proteinov v vzorcih uhatega klobučnjaka je bila v povprečju za več kot 2-krat nižja kot pri mesečinki in je bila primerljiva z deleži proteinov, določenih v uhatih klobučnjakih, vzorčenih istega meseca na Mljetu (15,42 %).

Vpliv različnega sušenja se je pokazal tudi pri določanju proteinov. Deleži proteinov v tkivih istega osebkov morskoga klobuka, posušenih v liofilizatorju so bili večji v primerjavi z deleži proteinov v tkivih, posušenih v sušilniku pri 60 °C. Na podlagi rezultatov lahko zaključim, da je sušenje meduz v liofilizatorju primernejši način sušenja, saj omogoča bolj natančno določitev proteinov v tkivih meduz.

Znotraj vrste uhatega klobučnjaka sem dobila statistično značilne korelacije med vsebnostjo proteinov v tkivih meduz in njihovimi biometričnimi značilnostmi. Rezultati so pokazali, da je vsebnost proteinov v večjih, bolj spolno zrelih meduzah večja. Znotraj vrst mesečinke in morskoga klobuka korelacij nisem dobila. To sem pripisala premajhnemu številu vzorcev in neenakomerni porazdelitvi starosti med osebki. Za opazovanje najrazličnejših razmerij med

deleži proteinov in biometričnimi parametri znotraj vrste, bi morali imeti na razpolago večje število osebkov, predvsem pa bi morali biti osebki zastopani v različnih starostih.

Med analiziranimi klobučnjaki se je pokazala razlika tudi v elementni sestavi. Povprečni delež ogljika je bil največji v uhatem klobučnjaku 49,95 %, najnižji pa v tkivu ustnih ramen morskega klobuka (43,15 %), medtem ko je bil povprečni delež dušika največji v mesečinki in je znašal 13,12 %. Največje razmerje C/N je bilo določeno v uhatem klobučnjaku 4,19, najmanjše pa v tkivu ustnih ramen morskega klobuka (3,65). S primerjavo povprečnih deležev proteinov in razmerij C/N v dializiranih vzorcih različnih klobučnjaških meduz iz Tržaškega zaliva sem pokazala, da se velika količina proteinov v tkivih odraža v razmeroma nizkem razmerju C/N. V uhatem klobučnjaku je bil delež proteinov najmanjši, kar se odraža v nekoliko višjem razmerju C/N v primerjavi z ostalima klobučnjakoma.

Menim, da bi bilo treba z nadaljnjimi raziskavami te tematike postoriti še marsikaj. Predvsem bi bilo smotno opraviti kemijske analize dializne raztopine, v katerih so bile dializirane suhe mase meduz, da bi preverili ali z dializo izgubljam organsko snov in v kakšni meri. Na podlagi ugotovitev bi nato lahko ocenili, kolikšen delež dejanske suhe mase meduze predstavlja dializirana suha masa. Ker so v dosedanjih raziskavah analize biokemične sestave meduz opravljene predvsem na nedializiranih vzorcih, bi lahko s takšnim načinom omogočili primerjavo biokemične sestave meduz, določene na dializiranih vzorcih.

Ne nazadnje bi morali na območju Tržaškega zaliva oceniti dejansko gostoto meduz v času njihovega masovnega pojavljanja, da bi lahko kvantitativno ocenili doprinos organske snovi v okolje na račun številčne populacije. Do kolikšne mere pa lahko razgrajevanje meduz ogrozi ekosistem, je odvisno predvsem od gostote odmrlih meduz in mešanja vodnih mas.

6 VIRI

Arai M.N., Ford J.A., Whyte J.N.C. 1989. Biochemical composition of fed and starved *Aequorea victoria* (Murbach et Shearer, 1902) (Hydromedusa). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 127: 289-299

Arai M.N. 1997. A Functional Biology of Scyphozoa. London, Chapman & Hall: str. 316

Arai M.N. 2001. Pelagic coelenterates and eutrophication: a review. *Hydrobiologia*, 451: 69-87

Arai M.N. 2005. Predation on pelagic coelenterates: a review. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85: 523-536

Bailey T.G., Torres J.J., Youngbluth M.J., Owen G.P. 1994. Effect of decompression on mesopelagic gelatinous zooplankton: a comparison of in situ and shipboard measurements of metabolism. *Marine Ecology-Progress Series*, 113:13-27

Bailey T.G., Youngbluth M.J., Owen G.P. 1995. Chemical composition and metabolic rates of gelatinous zooplankton from midwater and benthic boundary layer environments off Cape Hatteras, North Carolina, USA. *Marine Ecology-Progress Series*, 122: 121-134

Banister D., Campbell D. 1985. Sea Anemones and Jellyfishes. Encyclopedia of Aquatic Life. New York: Fact on File Publications, 176-177

Benović A., Ličić D., Onofri V. 2000. Does change in an Adriatic hydromedusea fauna indicate an early phase of marine ecosystem destruction. P.S.Z.N. *Marine Ecology*, 21: 221-231

Benović A., Lučić D. 2001. Jellyfish outbreaks: natural cycle or stress response effect? V: Gelatinous zooplankton outbreaks: theory and practice. CIESM Workshop Series. Briand F. (ur.). Monaco, 14: 59-62

Billett D.S.M., Bett B.J., Jacobs C.L., Rouse I.P., Wigham B.D. 2006. Mass deposition of jellyfish in the deep Arabian Sea. *Limnology and Oceanography*, 51, 5: 2077-2083

Bio-Rad. Instructions for the Bio-Rad protein assay. 2005. Bio-Rad Laboratories GmbH München: 18 str. (Navodilo za uporabo)

Bishop A., Wood J.B., Valdivia A. 2006. Marine Invertebrates of Bermuda, Moon Jelly (*Aurelia aurita*).
<http://www.thecephalopodpage.org/MarineInvertebrateZoology/Aureliaaurita.html>
(14. mar. 2011)

Bradford M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254

Brodeur R. D., Decker M. B., Ciannelli L., Purcell J. E., Bond N. A., Stabeno P. J., Hunt G. L. Jr., Acuna E. 2008. Rise and fall of jellyfish in the Bering Sea in relation to climate regime shifts. *Progress in Oceanography*, 77: 103-111

Calder D.R. 2000. Assemblages of hydroids (Cnidaria) from three seamounts near Bermuda in the western North Atlantic. *Deep-Sea Research I*, 47: 1125-1139

- Ceccaldi H.J., Kanazawa A., Teshima S. 1976. Chemical composition of some Mediterranean macroplanktonic organisms. *Tethys*, 8: 295-298
- Cheng J.H., Ding F.Y., Li S.F., Yan L.P., Ling J.Z., Li J.S. 2005. A study on the quantity distribution of macro-jellyfish and its relationship to seawater temperature and salinity in the East China Sea Region. *Acta Ecologica Sinica*, 25: 440-445
- Clarke A., Holmes L.J., Gore D.J. 1992. Proximate and elemental composition of gelatinous zooplankton from the Southern Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 155: 55-68
- Childress J.J., Nygaard M.H. 1973. The chemical composition of midwater fishes as a function of depth of occurrence off southern California. *Deep-Sea Research*, 20: 1093-1109
- Childress J.J., Nygaard M.H. 1974. Chemical composition and buoyancy of midwater crustaceans as function of depth of occurrence off southern California. *Marine Biology*, 27: 225-238
- Daskalov G.M., Grishin A.N., Rodionov S., Mihneva V. 2007. Trophic cascades triggered by overfishing reveal possible mechanisms of ecosystem regime shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 10518-10523
- Ding F., Cheng J. 2005. The analysis on fish stock characteristics in the distribution areas of large jellyfish during summer and autumn in the East China Sea region. *Marine Fisheries*, 27: 120-128
- Donnelly J., Shckney D.G., Torres J.J. 1993. Proximate and elemental composition and energy content of mesopelagic crustaceans from the eastern Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 115: 469-480
- Doyle T.K., Houghton J.D.R., Buckley S.M. in sod. 2007. The broad-scale distribution of five jellyfish species across a temperate coastal environment. *Hydrobiologia*, 579: 29-39
- Eiane K., Aksnes D.L., Bagøien E., Kaartvedt S. 1999. Fish or jellies - a question of visibility? *Limnology and Oceanography*, 44: 1352-1357
- Gerritsen J., Strickler J.R. 1977. Encounter probabilities and community structure in zooplankton: a mathematical model. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34: 73-82
- Goy J., Morand P., Etienne M. 1989. Long-term fluctuations of *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphomedusa) in the western Mediterranean Sea. Prediction by climatic variables. *Deep-Sea Research*, 36, 2: 269-279
- Hamner W.M., Dawson M.N. 2009. A review and synthesis on the systematic and evolution of jellyfish blooms: advantageous aggregations and adaptive assemblages. *Hydrobiologia*, 616: 161-191
- Hannson L.J., Norrman B. 1995. Release of dissolved organic carbon (DOC) by the scyphozoan jellyfish *Aurelia aurita* and its potential influence on the production of planctonic bacteria. *Marine Biology*, 121: 527-532
- Hayward P., Nelson-Smith T., Shields C. 1996. Collins pocket guide. Sea shore of Britain and northern Europe. London: HarperCollins.

Hoeger U. 1983. Biochemical composition of ctenophores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 72: 251-261

Ishii H. 2001. The influence of environmental changes upon the coastal plankton ecosystems, with special reference to mass occurrence of jellyfish. *Bulletin of Plankton Society of Japan*, 48: 55-61

Jackson J.B.C., Kirby M.X., Berger W.H., Bjorndal K.A., Botsford L.W., Bourque B.J., Bradbury R.H., Cooke R., Erlandson J., Estes J.A., Hughes T.P., Kidwell S., Lange C.B., Lenihan H.S., Pandolfi J.M., Peterson C.H., Steneck R.S., Tegner M.J., Warner R.R. 2001. Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science*, 293: 629- 638

Kogovšek T., Begunovič B., Malej A. 2009. Periodicity of bloom-forming Scyphomedusae: wavelent analysis of 200-years time series. *Hydrobiologia*, 645(1): 81-96

Kos M. 2009. Vloga naravne morske bakterijske združbe pri razgradnji odmrlega materiala meduze *Aurelia aurita*. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2009. Univerza v Ljubljani.

Lakkis S., Zeidane R. 1987. Les Corycaeidae (Copepoda, Cyclopoidea) des eaux libanaises: observation faunistiques et écologiques. *Journal of Plankton Research*, 9: 15-25

Larson R.J. 1986. Water content, organic content, and carbon and nitrogen composition of medusae from northeast Pacific. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 99: 107-129

Lavtižar V. 2010. Vpliv bakterijske združbe na razgradnjo meduz. Diplomsko delo. Fakulteta za znanosti o okolju. Univerza v Novi Gorici.

Lilley M.K.S., Houghton J.D.R, Hays G.C. 2009. Distribution, extent of inter-annual variability and diet of the bloom-forming jellyfish *Rhizostoma* in European waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89: 39-48

Lotan A., Fine M., Ben-Hillel R. 1994. Synchronization of the life cycle and dispersal pattern of the tropical invader scyphomedusan *Rhopilema nomadica* is temperature dependent. *Marine Ecology-Progress Series*, 109: 59-65

Lucas C.H. 1994. Biochemical composition of *Aurelia aurita* in relation to age and sexual maturity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 183: 179-192

Lucas C.H. 2001. Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment. *Hydrobiologia*, 451: 229-246

Lucas C.H. 2008. Biochemical composition of the mesopelagic coronate jellyfish *Periphylla periphylla* from the Gulf of Mexico. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89: 77-81

Lynam C.P., Gibbons M.J., Axelsen B.E., Sparks C.A.J., Coetzee J., Heywood B.G., Brierley A.S. 2006. Jellyfish overtake fish in a heavily fished ecosystem. *Current Biology*, 16(13): 492-493

Madin L.P, Cetta C.M., McAlister V.L. 1981. Elemental and biochemical composition of salps (Tunicate: Thaliacea). *Marine Biology*, 63: 217-226

- Malej A. 1989. Behaviour and trophic ecology of the jellyfish *Pelagia noctiluca* (Forsskal, 1775). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 126: 259-270
- Malej A., Malej A. 2004. Invasion of the jellyfish *Pelagia noctiluca* in the northern Adriatic: a non-success story. Chapter 16. In: Aquatic invasions in the Black, Caspian and Mediterranean Seas (H. Dumont in sod.). *Kluwer Academic Publication*, Netherlands, 35: 273-285
- Malej A., Turk V., Lučić D., Benović A. 2007. Direct and indirect trophic interactions of *Aurelia* sp. (Scyphozoa) in a stratified marine environment (Mljet Lakes, Adriatic Sea). *Marine Biology*, 151: 827-841
- Mayer A.G. 1910. Medusae of the World, III: the Scyphomedusae. Carnegie Institute, Washington.
- Mills C.E. 2001. Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? *Hydrobiologia*, 451: 55-68
- Nival P., Gorsky G. 2001. Conditions for blooming of pelagic species. V: Gelatinous zooplankton outbreaks: theory and practice. CIESM Workshop Series. Briand F. (ur.). Monaco, 14: 23-27
- Pagés F. 2001. Past and present anthropogenic factors promoting the invasion, colonization and dominance by jellyfish of a Spanish coastal lagoon. In: Gelatinous zooplankton outbreaks: theory and practice. CIESM Workshop Series. Monaco, 14: 69-71
- Pella E. in Colombo B. 1973. Study of carbon, hydrogen and nitrogen by combustion - gas chromatography. *Mikrochim Acta*, 1973: 697-719
- Pella E. in Colombo B. 1978. Simultaneous C-H-N and S microdetermination by combustion and gas chromatography. *Mikrochim Acta*, 1978: 271-286
- Percy J.A. and F.J. Fife. 1981. The biochemical composition and energy content of arctic marine macrozooplankton. *Arctic*, 34(4): 307-313
- Perez-Ruzafa A., Gilabert J., Gutierrez J.M., Fernandez A.I., Marcos C., Sabah S. 2002. Evidence of a planktonic food web response to changes in nutrient input dynamics in the Mar Menor coastal lagoon, Spain. *Hydrobiologia*, 475: 359-369
- Pitt K.A., Koop K., Rissik D. 2005. Contrasting contributions to inorganic nutrient recycling by the co-occurring jellyfishes, *Catostylus mosaicus* and *Phyllorhiza punctata* (Scyphozoa, Rhizostomeae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 315: 71-86
- Pitt K.A., Kingsford M.J., Rissik D., Koop K. 2007. Jellyfish modify the response of planktonic assemblages to nutrient pulses. *Marine Microbiology-Progress Series*, 351: 1-13
- Pitt K.A., Welsh D.T., Condon R.H. 2009. Influence of jellyfish blooms on carbon, nitrogen and phosphorus cycling and plankton production. *Hydrobiologia*, 616: 133-149
- Purcell J.E. 1999a. Jellyfish as competitors and predators of fishes. Annual report. <http://www.evostc.state.ak.us/Files.cfm?doc=/Store/AnnualReports/1998-98163S-Annual.pdf&> (14. mar. 2011)

- Purcell J.E., Malej A., Benovič A. 1999b. Potential links of jellyfish to eutrophication and fisheries. In: Malone T.C., Malej A., Harding L.W. Jr, Smolaka N., Turner R.E. (eds) Ecosystems at the land-sea margin: drainage basin to coastal sea. *Coastal and Estuarine Studies*, 55: 241-263
- Purcell J.E., Arai M.E. 2001a. Interactions of pelagic cnidarians and ctenophores with fish: a review. *Hydrobiologia*, 451: 27-44
- Purcell J.E., Breitburg D.L., Decker M.B., Graham W.M., Youngbluth M.J., Raskoff K.A. 2001b. Pelagic cnidarians and ctenophores in low dissolved oxygen environments: a review. In Rabalais N.N., Turner R.E., (eds), Coastal Hypoxia: Consequences for living resources and ecosystems. American Geophysical Union. *Coastal and Estuarine Studies*, 58: 77-100
- Purcell J.E. in Decker M.B. 2005. Effects of climate on relative predation by scyphomedusae and ctenophores on copepods in Chesapeake Bay during 1987-2000. *Limnology and Oceanography*, 50: 376-387
- Purcell J.E., Uye S., Lo W.T. 2007. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. *Marine Ecology-Progress Series*, 350: 153-174
- Richardson A.J., Bakun A., Hays G.C., Gibbons M.J. 2009. The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 6: 312-322
- Russell F.S. 1970. The Medusae of the British Isles volume II: Pelagic Scyphozoa, with a supplement to the first volume of Hydromedusae. Cambridge University Press, Cambridge.
- Schneider G. 1982. Abundance and chemical composition of the ctenophore *Pleurobrachia pileus* in western Kiel Bight. C. M.-International Council for the Exploration of the Sea, 15: 1-8
- Schneider G., Weisse T. 1985. Metabolism measurements of *Aurelia aurita* planulae larvae, and calculation of maximal survival period of the free swimming stage. *Helgolander Meeresunters*, 39: 43-47
- Schneider G., 1988a. Chemische Zusammensetzung und Biomasseparameter der Ohrenqualle *Aurelia aurita*. *Helgolander Meeresunters*, 42: 319-327
- Schneider G. 1988b. Larvae production of the common jellyfish *Aurelia aurita* in the Western Baltic 1982-1984. *Meeresforsch*, 6: 295-300
- Schneider G. 1989. The common jellyfish *Aurelia aurita*: standing stock, excretion and nutrient regeneration in the Kiel Bight, Western Baltic. *Marine Biology*, 100: 507-514
- Shimauchi H., Uye S. 2007. Excretion and respiration rates of the Scyphomedusa *Aurelia aurita* from the Inland Sea of Japan. *Journal of Oceanography*, 63: 27-34
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Chemistry*, 150: 76-85
- Tinta T., Malej A., Kos M., Turk V. 2010. Degradation of the Adriatic medusa *Aurelia* sp. by ambient bacteria, in: Purcell J.E. in sod. (Ed.) 2010. Jellyfish blooms: New problems and solutions. *Developments in Hydrobiology*, 212: 179-191

Titelman J., Riemann L., Sørnes T.A., Nilsen T., Griekspoor P., Båmstedt U. 2006. Turnover of dead jellyfish: stimulation and retardation of microbial activity. *Marine Ecology-Progress Series*, 325: 43-58

Turk T. 2007. Pod gladino Mediterana. 1. izdaja. Ljubljana, Modrijan založba, d.o.o. str. 590

Turk V., Mozetič P., Malej A. 2007. Overview of eutrophication related events and other irregular episodes in slovenian coastal waters (Gulf of Trieste, Adriatic sea). *Annales*, 17, 2: 197-216

Turk V., Lučić D., Flander-Putrlje V., Malej A. 2008. Feeding of *Aurelia* sp. (Scyphozoa) and links to the microbial food web. *Marine Ecology*, 29: 495-505

Uye S. 2008. Bloom of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*: a threat to the fisheries sustainability of the East Asian Marginal Sea. *Plankton Benthos Research*, 3: 125-131

Uye S., Ueta Y. 2004. Recent increase of jellyfish populations and their nuisance to fisheries in the Inland Sea of Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography*, 68: 9-19

Vasas V., Lancelot C., Rousseau V., Jordán F., 2007. Eutrophication and overfishing in temperate nearshore pelagic food webs: a network perspective. *Marine Ecology-Progress Series*, 336: 1-14

West E.J., Welsh D.T., Pitt K.A. 2009. Influence of decomposing jellyfish on the sediment oxygen demand and nutrient dynamics. *Hydrobiologia*, 616: 151-160

Witt M.J., Broderick A.C, Johns D.J, Martin C., Penrose R., Hoogmoed M.S. and Goodley B.J. 2007. Prey landscapes help identify potential foraging habitats for leatherback turtles in the NE Atlantic. *Marine Ecology-Progress Series*, 337: 231-243

Xian W., Kang B., Liu R. 2005. Jellyfish blooms in the Yangtze Estuary. *Science*, 307: 41

Zavodnik D. 1991. On the food and feeding in the northern Adriatic of *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa). In: UNEP Jellyfish Blooms in the Mediterranean, Proceedings of the II Workshop of Jellyfish Blooms in the Mediterranean Sea. *Mediterranean Action Plan Technical Reports Series*, Athens 47: 212-216