

Le mucillagini nel Mar Adriatico: ruolo dei possibili agenti causali e dei fattori ambientali

Maura MANGANELLI (a) e Enzo FUNARI (b)

(a) Istituto Superiore di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro, Monteporzio Catone, Roma

(b) Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Il fenomeno delle mucillagini è rappresentato dalla comparsa sporadica di materiale gelatinoso sospeso nell'acqua marina o galleggiante in superficie. Nell'Adriatico centro-settentrionale, questo fenomeno si è verificato nell'ultimo ventennio con frequenza ed estensioni del tutto particolari, causando notevoli danni ecologici, con pesanti ripercussioni sull'economia. Dopo una sintesi aggiornata delle attuali conoscenze e la rassegna delle principali ipotesi, che considerano di volta in volta gli organismi produttori, le caratteristiche idrodinamiche del bacino Nord Adriatico, la concentrazione dei nutrienti, viene presentata la recente teoria proposta da Azam *et al.* che inquadra la formazione della mucillagine all'interno delle complesse interazioni fra gli organismi del *microbial loop* e il pool di sostanza organica. Da questa prospettiva, vengono indicate future linee di ricerca necessarie alla comprensione del fenomeno.

Parole chiave: mucillagini, essudati, microbial loop.

Summary (*Mucilage in Adriatic Sea: role of possible causal agents and environmental factors*). -The massive accumulation of gelatinous material at and below the seawater surface occurred in Northern Adriatic, at a frequency and with such an extension to cause serious environmental and economic damages. The present review describes the updated knowledge and considers the main hypotheses on mucilage formation. They focus, in turn, on organisms that produce mucilage, on the particular hydrodynamic of the North Adriatic basin, on the role of nutrients, but the trigger mechanism has not yet been really understood. Finally, the theoretical framework recently proposed by Azam *et al.* is presented. In the organic matter *continuum* view, organisms of the microbial loop just represent a part of the whole picture from which specific mechanisms of interactions are examined and few important pathways are outlined for future research.

Key words: mucilage, exudates, microbial loop.

Introduzione

Il fenomeno delle mucillagini è rappresentato dalla comparsa di materiale gelatinoso sospeso nell'acqua marina o galleggiante in superficie. Questo materiale viene trasportato orizzontalmente dalle correnti ed è soggetto a movimenti verticali dovuti ai cambiamenti di temperatura dell'acqua.

La formazione di mucillagini è stata osservata nelle aree costiere greche, dalmate, del Tirreno e della Sicilia [1]. Nell'Adriatico centro-settentrionale, dove è noto fin dal 18° secolo [2], questo fenomeno assume tuttavia dimensioni del tutto particolari, ed è caratterizzato talvolta da quantità enormi di ammassi mucilluginosi. Ha raggiunto la massima intensità nelle estati del 1988, 1989 e 1991. Nel 1989 il materiale mucilluginoso interessò una superficie di mare di 9000 km², raggiungendo anche le aree costiere [3].

Si è ripresentato nelle estati del 1997, del 2000 e, in misura ridotta, del 2001.

Il fenomeno della formazione massiva di mucillagini nell'Adriatico centro-settentrionale ha avuto notevoli ripercussioni sulle attività turistiche; inoltre ha avuto ripercussioni fortemente negative sulle attività di pesca ed ha causato anche seri danni ecologici, soprattutto nei confronti degli organismi bentonici, a causa delle estese condizioni di ipossia determinatesi a seguito della copertura del fondo o per il consumo di ossigeno durante la decomposizione del materiale mucilluginoso.

Numerosi sono i gruppi italiani e internazionali impegnati in attività di ricerca su questo fenomeno, che è stato anche oggetto di due workshop internazionali, a Cesenatico nel 1992 e a Trieste nel 1997 [4, 5]. Sfortunatamente le fasi operative di un importante programma di ricerca nazionale e ben tre

progetti europei si sono svolte nel periodo in cui il fenomeno non si è verificato, nei primi anni del 1990.

Attualmente diversi gruppi di ricerca sono impegnati in un progetto nazionale sulle mucillagini nel Mar Adriatico e nel Mar Tirreno (ICRAM, progetto MAT) e in un progetto internazionale (in ambito GOOS), attraverso una cooperazione con il National Science Foundation e i paesi europei che si affacciano sul mar adriatico (Croazia, Slovenia).

In questo articolo vengono presentate le attuali conoscenze sul fenomeno delle mucillagini e le principali ipotesi scientifiche formulate.

Fenomeni di mucillagine in mari diversi

Fenomeni rilevanti di comparsa di aggregati gelatinosi macroscopici sono stati osservati nel Mare del Nord, in diverse parti del Mediterraneo, nel Canale della Manica.

Nel Mare del Nord, ogni primavera, in giorni particolarmente ventosi, compare, lungo le coste, un impressionante strato di schiuma marroncina e appiccicosa, prodotta da fioriture di *Phaeocystis* sp. Lancelot [6] descrive estesamente questi eventi e la particolare ecologia di queste alghe. La successione del bloom di *Phaeocystis* procede rapidamente da colonie piccole sferiche, a colonie molto più grandi, non più controllate dalla predazione del mesozooplankton. La matrice mucillaginosa che avvolge le cellule nella fase coloniale, che genera la schiuma che compare sulle spiagge, è formata dalla condensazione di catene polisaccaridiche carbossilate e sulfonate, promossa da ponti di calcio e magnesio. Il 90% di questi polisaccaridi poveri di nutrienti è costituito da polimeri di glucosio. La produzione di questa matrice mucillaginosa sembra importante sia come riserva energetica che per la possibilità di raccogliere e concentrare nutrienti presenti in concentrazioni molto basse ed elementi in traccia (manganese). Inoltre la matrice idratata ha una funzione importante per il galleggiamento, avendo una densità simile a quella del mezzo. Le fioriture di notevole entità sono favorite dall'aumento di nitrati, che *Phaeocystis*, contrariamente alle altre specie algali, può utilizzare come fonte di azoto. L'aumentata efficienza degli impianti di trattamento dei reflui sarebbe la causa di questo squilibrio nutritivo e, paradossalmente, la causa ultima delle mucillagini [6].

La concentrazione relativa dei monomeri che compongono i polisaccaridi, diversa da ceppo a ceppo, conferisce caratteristiche di degradabilità diversa al muco prodotto [7]. In generale, la degradabilità sembra alta ed è legata a fattori come la disponibilità di nutrienti, la presenza di agenti inibitori, e la composizione della comunità batterica [8].

Nel Canale della Manica, i fenomeni di mucillagine che si sono verificati sono stati ricondotti alle abbondanti fioriture di una diatomea introdotta (*Coscinodiscus wailesii*), che ha trovato delle condizioni ambientali particolarmente favorevoli. Le cellule rilasciano una sostanza mucillaginosa che, durante la precipitazione sul fondo, raccoglie e ingloba dall'acqua circostante scheletri insolubili di altri organismi planctonici e particelle minerali, aumentando il proprio volume e la propria densità. La copertura del fondo da parte di questo muco grigiastro ha causato importanti danni alla pesca, ostruendo o rompendo le reti da strascico [9]. Nel 1987 questa specie di diatomea era ancora presente nelle acque inglesi e rappresentava addirittura una delle specie maggiori della comunità invernale di fitoplancton [10].

Anche in diverse aree del Tirreno nel 1991 sono state avvistate grandi quantità di mucillagine. La descrizione del fenomeno e le possibili cause sono state descritte da Innamorati [11]. Nonostante la carenza di dati temporali sistematici, sembra che questo fenomeno, pur con estensioni molto ridotte rispetto al 1991, sia conosciuto da molto tempo nel Tirreno. Sono stati descritti due tipi di mucillagini, caratterizzati da dislocazione e comunità microbiche diverse. Il primo tipo, bentonico, sembra caratterizzato dalla presenza di alghe filamentose coloniali (*Tribonema marinum* e *Acinetospora crinita*), che non sono mai state trovate in Adriatico; il secondo tipo, pelagico, presenta una comunità microbica poco ricca, caratterizzata dalla presenza delle diatomee *Nitzschia* sp.

Vari elementi fanno pensare che il muco sia prodotto dagli organismi trovati al suo interno. La biocenosi all'interno dei fiocchi di mucillagine è diversa da quella dell'acqua circostante. Nel primo caso, è di tipo invernale-primaverile e non varia con il passare delle stagioni, mentre nella colonna d'acqua si osserva l'usuale successione di specie, molto differenti fra una stagione e l'altra. Il muco rappresenta un microhabitat particolare e ospita una concentrazione di cellule fino a tre ordini di grandezza superiore rispetto all'acqua circostante. Tramite autoradiografia, è stato osservato che le specie all'interno della matrice mucillaginosa producono il muco stesso che le avvolge. In coincidenza del fenomeno di mucillagine, è stato osservato un elevato rapporto N/P, che indica una ridotta concentrazione di fosforo, contrariamente ai valori che caratterizzano solitamente il mar Tirreno. Poiché all'aumentare di tale rapporto alcune specie di fitoplancton in coltura aumentano la produzione di essudati [12, 13], si ritiene che questa sia una condizione necessaria, anche se non sufficiente, perché si formino le mucillagini nel Tirreno [11]. La temperatura e la densità non risultano neanche indirettamente correlate con il fenomeno della mucillagine.

In varie zone della Grecia sono stati osservati fenomeni di “mare sporco” [14], ma i dati disponibili non sono sufficienti a trarre alcuna conclusione o a proporre alcun confronto con altri casi.

Fenomeno di mucillagine in Adriatico

Nel Mar Adriatico, masse di mucillagini consistenti si sono sviluppate nel 1988, 1989, 1991, 1992, 1997, 1998, 2000 e 2001. La prima descrizione sistematica della successione di 5 stadi caratterizzati da “quantità” e “consistenza” diverse delle mucillagini, da piccoli a via via più grandi aggregati marini, fino alla formazione massiva di mucillagini, risale a Stachowitsch [15].

I 5 stadi, individuati durante i fenomeni del 1988 e 1989, sono i seguenti.

Macroflocs

Sono particelle genericamente definite come “neve marina” o, specificamente in Adriatico, “neve planctonica” [15]. Si tratta di aggregati subsferici, irregolari, biancastri, di diametro in genere inferiore ad 1 cm. Possono essere presenti in qualunque periodo dell'anno ma sono più abbondanti nella tarda primavera/inizio dell'estate. Le più alte densità vengono raggiunte nel periodo più caldo estivo e nei mesi autunnali.

I macroflocchi sono sempre presenti nel Mar Adriatico e non sono direttamente legati al successivo sviluppo di mucillagini. L'analisi degli organismi “inglobati” nei flocchi ha evidenziato, sia negli anni precedenti che in quelli della mucillagine ('88-'89), una comunità eterogenea, dominata in media da diatomee pelagiche, in particolare da *Nitzschia closterium*, *delicatissima* e *seriata*, anche se nel 1986-87 alcuni gruppi di dinoflagellati erano presenti in modo significativo. E' sempre presente una percentuale di flocchi priva di organismi vitali, costituita solo da detrito.

I macroflocchi possono essere trasportati orizzontalmente e verticalmente, accumulano al picnoclino e sedimentano sul fondale.

Passando dalla colonna d'acqua ai sedimenti possono cambiare colore, da quello iniziale biancastro a marrone e infine a grigio scuro. Durante questo processo di “invecchiamento” sembra che diminuiscano le cellule fitoplanctoniche e aumentino batteri e organismi eterotrofi.

Stringers

Sono aggregati sottili e allungati, che misurano circa 1-25 cm. E' possibile distinguere una forma tipica di comete con testa e coda, che le posiziona nella colonna d'acqua secondo un angolo, con la testa

rivolta verso il basso e la coda diretta verso l'alto nella direzione della corrente. A volte possono trovarsi anche dei filamenti privi della testa. Sono spesso presenti insieme ai macroflocchi e raggiungono le più alte densità in estate e in autunno.

Clouds

Comprendono un ampio intervallo di grandi aggregati, che nel passato è stato nominato in vari modi: “palle di muco simili a nuvole” e “scie di muco” [15]. Le dimensioni variano da 5-10 cm a 3 m. Possono essere separate o formare una rete continua, galleggiare e risalire. Possono sedimentare in grande quantità, depositandosi come ragnatele su tutte le strutture bentoniche sporgenti, come le foglie delle praterie di piante superiori, spugne, gorgonie, ecc. La sedimentazione di tali nubi, pur non provocando fenomeni di anossia totale sul fondo, ha provocato morie di organismi bentonici sessili o poco mobili, come molluschi, celenterati e crostacei, per soffocamento [16]. Il passaggio da neve marina a stringers e infine a nubi può essere graduale (può durare anche mesi) ma può anche essere molto rapido, come durante il 1991 [16]. Le condizioni meteorologiche e le condizioni del mare regolano la durata dei vari stadi.

Creamy surface layer

Una volta che la mucillagine ha raggiunto lo stadio di nuvole, può successivamente essere visibile in superficie, formando o una massa di consistenza cremosa, dispersa (*creamy surface layer*) o gelatinosa (*gelatinous surface layer*, vedi par. successivo) con uno spessore anche di 15 cm. Questo tipo di consistenza è in parte dovuto all'inclusione di bollicine gassose. E' chiara, biancastra quando è fresca. Durante l'evento del 1988, una notevole quantità di questo materiale è stato osservato lungo le coste continentali e delle isole, in Croazia e in Italia. Il materiale si accumulava giornalmente lungo le coste con lo stesso meccanismo: lungo la colonna d'acqua si poteva osservare la formazione di mucillagine, dalla tarda mattinata fino a circa mezzogiorno. Questo processo andava avanti finché nel primo pomeriggio si formava il tipico strato “cremoso”. Nel tardo pomeriggio questo strato si trovava lungo le coste, trasportato dai venti dal mare, lasciando pulita e chiara l'acqua sottostante. Queste bande strette, che si accumulavano lungo le coste di giorno, generalmente non erano poi presenti durante la notte [15].

Gelatinous surface layer

Differisce dalla fase precedente in quanto è costituito da uno strato fermo e gelatinoso. La densa inclusione di bollicine di gas gli conferisce una consistenza

spugnosa. Il materiale è giallastro o marrone piuttosto che biancastro. Può essere costituito di unità che mantengono la loro forma una volta rimosse dall'acqua. Si situa in superficie ma può anche galleggiare. Nel 1989, mucillagini di questo tipo si sono spinte fino ad Ancona, dove sono state infine disgregate dall'azione delle onde verso metà agosto [15].

Anche in questa forma si verifica una periodicità giornaliera di comparsa e scomparsa. Le bollicine incluse nella mucillagine funzionano da idrostatato in funzione della temperatura: le variazioni di temperatura nell'arco delle 24 ore aumentano e riducono il volume delle bollicine, portando al galleggiamento diurno e alla sedimentazione notturna delle nuvole. I gas provengono molto probabilmente dai processi di produzione fitoplanctonica (rilascio di ossigeno) e fermentazione all'interno dei fiocchi [16]. Tale periodicità sembra essere una caratteristica tipica della mucillagine, infatti, un comportamento simile è stato osservato anche durante l'evento del 1991 [16] e del 2001, lungo le coste croate.

Come già accennato precedentemente, nel Tirreno non si osservano questi fenomeni, probabilmente a causa delle differenze strutturali dei due mari. Infatti nelle acque poco profonde del Nord Adriatico, in estate si forma un termoclino molto netto, dovuto ad una stratificazione di acque a salinità e densità diverse, con un grado di miscibilità verticale molto ridotto. La mucillagine si concentra preferenzialmente lungo il termoclino, creando addirittura un falso bentos [15]. Dal termoclino, le bolle all'interno della mucillagine ne causerebbero la risalita come strati uniformi verso la superficie.

Durante la mucillagine del 1997 è stato utilizzato il sistema di rilevamento satellitare, per determinare la distribuzione della mucillagine lungo la colonna d'acqua. Dai dati raccolti, è risultato che la mucillagine si distribuisce lungo un gradiente di densità, quando questa varia di soli due o tre punti [17], come sostenuto in precedenza da Alldredge e Crocker [18]. Tuttavia, i dati disponibili sulle differenze rilevabili fra acqua non interessata dalla mucillagine e strati di mucillagini sono ancora pochi e la variabilità delle proprietà dell'acqua è ancora troppo alta per non nascondere presumibilmente dei dati che si riferiscono a mucillagine piuttosto che ad acqua [17].

Caratterizzazione della mucillagine, organismi produttori di muco

La struttura molecolare della mucillagine non è ancora stata determinata. D'altra parte, la sostanza organica particolata e disciolta, dalla quale, a seconda delle ipotesi, hanno origine le mucillagini, è stata caratterizzata a livello molecolare solo per circa un

quarto [19, 20]. È noto che circa il 97% della massa gelatinosa è composta di acqua; il resto è una miscela di carboidrati, proteine, acidi grassi, e composti non caratterizzati presenti in percentuali variabili, anche in funzione dell'età dei campioni analizzati.

Campioni di mucillagini del 1991, prelevati a varie profondità di fronte alla costa di Senigallia, presentavano un contenuto di C fra 40 e 10% (peso secco desalinizzato), di N fra 7,6 e 1,1% e P fra 0,50 e 0,12% [21]. Dai rapporti atomici dei vari elementi, normalizzati rispetto al fosforo (C:N:P:Si:S=242:28,2:1:17,9:4,1), la concentrazione di carbonio, silicio e zolfo risultava più elevata rispetto a quanto si osserva in organismi fito- e zooplanctonici [22]. Risultava inoltre un contributo minerale elevato. Il rapporto medio C/N (9,4) è consistente con quelli osservati in neve marina [23]. L'andamento dei rapporti C/N (variabile) e N/P (costante) nei vari campioni, indica che i campioni più vecchi, con un C/N più elevato, contengono più composti organici poveri di azoto e fosforo [21].

L'analisi qualitativa di campioni dello stesso anno (1991) provenienti dall'area est del golfo di Trieste, condotta tramite l'uso di Con-A FITC (lecitina specifica per residui di glucosio e mannosio), ha evidenziato un'elevata componente polisaccaridica, sia all'interno degli organismi inclusi nella matrice (sotto forma di granuli intracellulari: IPS) che nella matrice stessa, in forma di filamenti che si estendevano dalle cellule verso l'esterno (EPS) [24].

In campioni di mucillagine del 1989, prelevati di fronte a Cesenatico, il contenuto in carboidrati totali variava fra 1,0 e 6,9% (peso secco), in funzione della modalità di estrazione della frazione analizzata. La composizione in monosaccaridi (GC-MS dei rispettivi alditoli-acetati) indicava una elevata concentrazione di glucosio (9,7-48,0%), insieme a ramnosio, arabinosio, xilosio, mannosio e galattosio, in concentrazioni più basse [25].

La concentrazione di carboidrati in macroaggregati raccolti nel Golfo di Trieste, 1988-'89, era superiore rispetto ai campioni di Cesenatico, rappresentando il 12-34% della sostanza totale contro il 5% circa presente nella sostanza particolata sospesa [26]; erano composti nell'ordine da glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, fucosio, arabinosio, ribosio e xilosio [27]. L'elevata concentrazione di glucosio (circa il 60%) fa pensare che il grosso della mucillagine fosse composto da materiale di riserva delle diatomee, probabilmente glucano, che è un polimero del glucosio [26]. Concentrazioni simili di carboidrati totali sono state osservate in campioni di varie zone dell'Adriatico e del Tirreno nel 1997, (fra 20,5 e 30,2% in Adriatico e fra 15,5 e 35,5% nel Tirreno). La percentuale di zuccheri semplici neutri è compresa fra il 14,1 e 19,0 in Adriatico e il 7-20,4% in Tirreno [28].

Su alcuni campioni del 1988 è stato analizzato il contenuto in lipidi totali (1,1% peso secco) e in silicio (6,4%) ed è stato determinato il profilo di acidi grassi, utile come bioindicatore [29]. I dati sulla composizione degli acidi grassi, insieme all'osservazione diretta dei campioni, alla concentrazione di clorofilla a, b e c e alla concentrazione di silicio, hanno fatto ritenere che le diatomee planctoniche dominanti nelle fioriture primaverili dello stesso anno potessero essere le principali responsabili del muco analizzato [29].

Recentemente, con tecniche di rivelazione all'infrarosso (IR) e tramite risonanza magnetica nucleare (NMR) è stato analizzato il contenuto in gruppi funzionali di mucillagini provenienti dal Tirreno e dall'Adriatico [28, 30].

L'analisi degli spettri NMR di campioni di mucillagine del 1991 del Golfo di Trieste ha evidenziato la presenza di eteropolisaccaridi, lunghe catene polimetilate e gruppi carbossilici [30]. Diversi autori ritengono che queste catene rappresentino la rete di sostanza refrattaria, che si trova comunemente nei biopolimeri resistenti delle alghe [31, 32], che hanno origine, come i polisaccaridi strutturali, dalle pareti cellulari di alghe fitoplanctoniche. Anche se si tratta di polimeri molto resistenti, la degradazione fotochimica sembra rappresentare un'importante via di degradazione. In esperimenti di laboratorio, infatti, circa il 40% di macroaggregati si degradava in 30 ore di esposizione alla luce [30].

Lo stesso tipo di struttura macromolecolare costituita da carboidrati, acetati e lipidi è stato proposto per il DOM dell'acqua di mare superficiale proveniente da diverse parti del mondo [33], indicando una costanza di composizione e di refrattarietà alla decomposizione.

L'analisi all'infrarosso ha evidenziato una presenza significativa nella mucillagine di carboidrati, proteine, composti contenenti zolfo e composti aromatici [28]. Campioni provenienti dal Tirreno hanno mostrato una concentrazione maggiore di composti con zolfo, presenti probabilmente come zuccheri esteri solfati, come già osservato in altri campioni [34]. La presenza di composti aromatici spiegherebbe le caratteristiche di fluorescenza osservate in precedenza [35]. La somiglianza fra frazioni di proteine, polisaccaridi e fenoli delle mucillagini e sostanze umiche e fulviche del sedimento, e il fatto che la presenza di ioni Ca^{++} e Mg^{++} dà luogo a legami covalenti, suggeriscono che le mucillagini possono classificarsi come composti uminici (lo stadio finale e insolubile dei composti umici) [28].

Nelle mucillagini si trovano intrappolati numerosi organismi (vivi e morti), che costituiscono generalmente comunità diverse da quelle della colonna d'acqua; campioni di mucillagine provenienti da siti diversi, a loro volta, contengono popolamenti differenti. I campioni di mucillagine di Senigallia (1991) con-

tenevano una comunità dominata da *Cylindrotheca closterium*, mentre nella colonna d'acqua si aveva una dominanza di nanoflagellati (60-70%), con presenza di diatomee (10-30%) e dinoflagellate (7-20%) [21]. Nei campioni di Trieste (1991), oltre alla stessa specie dominante, erano presenti in modo significativo anche cianobatteri e batteri eterotrofi [24].

Produzione di essudati da parte delle alghe

Sono stati fatti molti studi sulla composizione degli essudati algali per confrontarne la composizione con i campioni di mucillagine e individuare le eventuali specie produttrici.

Hama e Yanagi [36], concordemente con Posedel e Faganeli [26], sostengono che gli essudati algali che contengono molto glucosio sono costituiti probabilmente da polisaccaridi e non da monosaccaridi e che il glucosio viene escreto come glucano. Il glucosio rappresenta sempre il principale zucchero dei carboidrati intra e extracellulari, ma normalmente è mantenuto quasi tutto all'interno delle cellule e solo una piccola parte è escreta nella forma disciolta [36]. Al contrario, i cosiddetti "eteropolisaccaridi" composti da ramnosio, fucosio, xilosio, mannosio e galattosio vengono più facilmente escreti come materiale extracellulare (EPS) e sono quelli che contribuiscono maggiormente ai polisaccaridi escreti con DOM, al contrario di glucosio, ribosio e arabinosio, che pure sono presenti in concentrazioni simili agli altri. Hanno un ruolo nella formazione di colonie, nella stabilizzazione dell'habitat e così via [37, 38]. Poiché gli eteropolisaccaridi sono più difficilmente degradati dall'attività batterica, la bioattività del DOM rilasciato durante un bloom fitoplanctonico è legata alla percentuale relativa di glucano e di eteropolisaccaridi rilasciata dalle alghe; quest'ultima è a sua volta condizionata da fattori come la biomassa fitoplanctonica e la concentrazione di nutrienti [36].

Numerosi studi hanno dimostrato che la composizione in zuccheri del DOM è comparabile con la composizione in zuccheri degli essudati algali [39-44]. D'altra parte, la composizione relativa in monosaccaridi degli eteropolisaccaridi rilasciati dalle alghe è strettamente dipendente dalla specie. Aluwihare e Repeta [44] hanno analizzato la struttura degli EPS rilasciati da tre specie algali, una diatomea *Thalassiosira weissflogii*, una coccolitoforide, *Emiliana huxleyi* e una primnesiofita, *Phaeocystis* sp. Gli zuccheri più importanti sono mannosio (34%), galattosio (30%) e xilosio (15%) nella diatomea; galattosio (30%) e arabinosio (27%) in *E. huxleyi*; glucosio (40%), mannosio (30%) e ramnosio (21%) nella terza specie. È interessante notare che la struttura del 20-30% degli essudati di *T. weissflogii* e di *E. huxleyi* sia simile ai polisaccaridi acilati, che rappresentano circa il 50% del carbonio

nella sostanza organica isolata dalle acque superficiali, indicando che il fitoplancton è una fonte importante di carbonio organico disciolto [44].

Myklestad [45] confrontando *Prasinococcus capsulatus* e *Chrysochromulina polylepis* ha dimostrato che non sono solo le diatomee che rilasciano EPS durante le varie fasi del proprio ciclo vitale; ha mostrato, inoltre, una composizione percentuale in zuccheri diversa, essendo galattosio e glucosio (circa il 70%) e l'acido galatturonico (8%) i monomeri più importanti nella prima e glucosio, mannosio, galattosio e xilosio quelli più importanti nella seconda.

Gli essudati di due specie di diatomee dominanti trovate all'interno delle mucillagini sono stati studiati da De Angelis *et al.* [25], per confrontarne la composizione in monomeri con quella del muco. Gli essudati di *Amphora coffeaeformis* contengono solo glucosio, mentre quelli di *Cylindrotheca fusiformis*, contengono, ramnosio, arabinosio, xilosio, mannosio e galattosio. La combinazione di questi due escreti presentava una concentrazione relativa dei vari monomeri simile a quella osservata nel muco [25].

In un lavoro molto recente su macroaggregati dell'estate del 1997, Kovac *et al.* [46] hanno confrontato la composizione macromolecolare della mucillagine e degli essudati di *Skeletonema costatum*, normalmente presente nel Golfo di Trieste. Secondo le analisi all'infrarosso e all'NMR, le due matrici presentano un rapporto fra composti alifatici e carboidrati molto simile; gli autori suggeriscono, quindi, che le mucillagini abbiano origine principalmente da essudati algali. Nelle mucillagini, il rapporto fra i due polimeri diminuisce con il tempo (campionamenti effettuati fra inizio luglio e settembre), indicando un ruolo dei composti alifatici nella persistenza dei macroaggregati. Un'elevata concentrazione di composti organo-minerali (principalmente organo-silicati) e la loro crescente importanza relativa nel tempo, suggeriscono infine un loro ruolo sia nei processi di aggregazione che nel mantenimento della struttura mucillaginosa.

Biersmith e Benner [47] hanno analizzato la composizione in carboidrati e aldosi della componente strutturale intracellulare, della componente intracellulare idrosolubile insieme agli EPS e della componente rilasciata nei terreni di coltura di peso molecolare >1000 Da (UDOM), su 4 diverse specie di fitoplancton (*Phaeocystis* sp. Prymnesiofite, *Emiliana huxleyi*, Cocolitoforidi, *Synechococcus bacillaris*, Cianobatteri, e *Skeletonema costatum* Diatomee). Anche in questo caso, i profili degli zuccheri della componente intracellulare e di quella rilasciata all'esterno sono differenti, e mostrano che la componente escreta è composta da eteropolisaccaridi. Anche questo studio ha evidenziato la somiglianza fra la sostanza organica disciolta che si trova nella superficie degli oceani di varie località e i profili degli essudati delle alghe studiate.

Sono stati ottenuti dati discordanti a proposito della percentuale di polimeri o monomeri che vengono rilasciati all'esterno dalle alghe. In alcuni studi su *Phaeocystis*, è stato rilevato che fra il 70 e l'80% degli essudati è rappresentato da polisaccaridi [12, 13, 48, 49], mentre in altri i principali prodotti essudati sono risultati essere a basso peso molecolare (< 700 Da) [50]. E' stato anche osservato che i prodotti a basso peso molecolare rappresentano il 69-100% prima e il 39-56% dopo una fioritura algale [51].

Produzione di essudati da parte dei batteri

E' noto che alcune specie batteriche producono polimeri polisaccaridici trasportati all'esterno della cellula, dove possono rimanere ancorati alla parete batterica e formare una capsula (CPS) oppure essere rilasciati e formare una matrice intorno alla cellula, destinata a disperdersi nel mezzo circostante (EPS) [52]. Questi polisaccaridi possono avere la funzione di migliorare l'adesione alle superfici, proteggere dalla predazione e dall'essiccamento; possono svolgere un ruolo nelle interazioni ioniche, come stabilizzatori degli enzimi localizzati sulla superficie cellulare, come concentratori, come materiali di riserva, o come emulsionanti per liberare i batteri dalle superfici già utilizzate [53, 54]. La possibilità di assolvere numerosi ruoli, è legata alla loro notevole eterogeneità strutturale specie-specifica. A partire dal semplice destrano (un polimero del glucosio non ramificato, con legami a 1,4) si passa a polimeri con catene eteropolisaccaridiche ramificate estremamente complesse, sostituite con diversi gruppi (piruvato, solfato, acetato, ecc.), nelle quali due zuccheri identici possono legarsi per formare fino ad 11 disaccaridi diversi. Inoltre, gli EPS contengono spesso diversi monomeri (eteropolisaccaridi), e possono essere legati a gruppi non saccaridici, come proteine, acidi grassi, ecc. Molti EPS sono anionici e possono pertanto concentrare i cationi fino a 10000 volte, formando legami fra i gruppi carbossilici dei polisaccaridi acidi e i metalli (per una rassegna, vedi [55]). In alcuni ceppi, la produzione di muco dipende dalle condizioni ambientali [56-59] o dallo stadio vitale [60].

In un caso, ceppo *Hyphomonas* MHS-3, è stato dimostrato che la produzione di EPS per la formazione di una capsula adesiva per passare da uno stadio natante a uno stadio sessile è governato temporalmente da un ciclo vitale obbligato [61], mentre in generale questa produzione è regolata dai fattori nutritivi [57, 59] o ambientali [56]. La capsula di questi ceppi è stata osservata solo nelle fasi sessili [60] e ne sono state dimostrate le proprietà adesive [60-62]. Il principale polimero che la compone è stato purificato e parzialmente caratterizzato; uno dei suoi principali componenti è la galattosammina, che sembra essere acetilata [63].

I pochi studi sul destino degli essudati batterici nell'ambiente marino indicano che sono prodotti poco labili e pertanto poco utilizzati come fonte di carbonio [64]; alcune frazioni di questi composti possono persistere più di un anno [65]. Nel suolo e negli acquiferi la loro decomposizione è regolata da diversi fattori. È stato osservato che, di regola, i microrganismi non degradano i propri polimeri [58, 66]. Sono tuttavia capaci di degradare quelli di specie diverse, anche se a velocità inferiori rispetto ai monomeri o alle molecole più semplici [67]. La velocità di degradazione dipende da fattori come il microorganismo produttore e il microorganismo degradatore [68, 69], o la presenza o meno di metalli che si legano al polimero rallentandone il tasso di decomposizione [67].

Ipotesi sulla formazione delle mucillagini

Dinamica dell'Adriatico settentrionale

L'Adriatico settentrionale, chiuso per tre lati da terraferma e poco profondo (ha una profondità massima di ca 50 m lungo il transetto fra Senigallia e le isole Susak, lungo le coste croate) presenta caratteristiche idrodinamiche particolari, che possono essere determinanti per la formazione delle mucillagini.

In Adriatico si possono individuare 3 zone caratterizzate da tre differenti livelli di trofia, determinate dalla particolare circolazione della zona. In generale, il bacino si può considerare oligotrofo, ma gli apporti fluviali notevoli rendono eutrofiche o addirittura distrofiche alcune zone. Il Po contribuisce per circa il 50% degli apporti di acqua dolce nel bacino nord adriatico [70] e scorrendo in una delle zone agricole più produttive del nord Italia, contribuisce anche per circa il 50% degli apporti di nutrienti [71, 72]. Gli scarichi annuali medi del fiume Po sono stati stimati, da dati recenti, in $25,5 \times 10^4$, $15,5 \times 10^4$ e $5,8 \times 10^3$ t/anno per carbonio, azoto e fosforo organico totale e in $11,6 \times 10^4$, $13,6 \times 10^4$ e $3,3 \times 10^3$ t/anno per i rispettivi composti in fase disciolta [72, 73]. L'acqua dolce in entrata, proveniente principalmente dal Po, scorre verso sud, lungo la costa occidentale, rendendo questa fascia altamente produttiva, in modo correlabile alla quantità di acqua dolce (zona distrofica, $178 \text{ gC/m}^2/\text{anno}$); ad est, verso la parte centrale del bacino, si osservano una fascia eutrofica, con un minor apporto di acqua dolce e una produzione primaria conseguentemente inferiore ($\sim 85 \text{ gC/m}^2/\text{anno}$) e una fascia ancora più interna, decisamente oligotrofica ($\sim 56 \text{ gC/m}^2/\text{anno}$) [74].

Lo stato di trofia, determinato dalla concentrazione di nutrienti, è indirettamente legato, a sua volta, alla circolazione delle acque, che determina la proporzione di effluenti che viene esportata o trattenuta all'interno

del bacino. La circolazione dell'Adriatico settentrionale è determinata principalmente da due correnti termoaline (determinate dalla temperatura e dalla salinità), una positiva e una negativa, e in secondo luogo dal vento. La corrente termoalina positiva è caratterizzata dallo spostamento lungo la costa adriatica italiana dell'acqua dolce superficiale, introdotta dai numerosi influenti del bacino; questa corrente trascina con sé anche parte delle acque costiere, causando un'uscita d'acqua dal bacino maggiore dell'entrata. Queste acque vengono sostituite da un flusso proveniente dal bacino adriatico medio. La quantità media annuale di acqua sostituita è $2500 \text{ km}^3/\text{anno}$, che indica un tempo medio di rinnovo di circa 3,5 mesi. Le acque fredde dense che si formano in inverno scorrono sul fondo lungo le coste occidentali durante la primavera e l'estate secondo una circolazione termoalina negativa. La corrente che si determina (DWOC) varia stagionalmente, con un massimo in primavera, e nei diversi anni, in funzione della rigidità dell'inverno [75]. Fattori che determinano un ricambio ridotto nel bacino sono: a) un inverno mite (ridotta produzione di acque dense, ridotta circolazione termoalina negativa); b) poche precipitazioni (riduzione della circolazione termoalina positiva); c) temperature elevate che causano un'espansione termica delle acque superficiali riducendo l'entrata di acque dalla zona sud del bacino e allungando i tempi di ritenzione delle acque dolci superficiali. Nonostante questo pattern di circolazione, grazie al quale circa l'84% dell'acqua dolce viene esportato lungo le coste italiane, i nutrienti vengono esportati in misura molto minore. Uno studio sul bilancio dell'azoto, nell'anno 1994, ha dimostrato che solo il 16% dell'apporto totale viene esportato tal quale, mentre il 67% viene utilizzato nella zona distrofica e poi esportato nella forma organica nelle fasce più interne, evidenziando pertanto una notevole importanza dei processi biologici nel trasferimento dei nutrienti. Un'importante conseguenza di questa situazione è che in caso di fattori fisici che riducano fortemente il ricambio delle acque del bacino, si possono avere delle forti ripercussioni sulla componente biologica in tempi molto brevi (scala stagionale), oltre ad un rinnovo incompleto delle acque del bacino su una scala annuale [74].

Condizioni meteorologiche

Come è stato ricordato nel paragrafo precedente, le condizioni meteorologiche (riduzione della piovosità con conseguente riduzione di immissione di acqua dolce) possono condizionare il ricambio d'acqua del bacino settentrionale [74]. Questo è quanto è successo durante gli anni 1988/90, anni di inverni miti.

Nel 1991, anche se l'inverno è stato particolarmente duro e piovoso, si è avuto all'inizio dell'estate un

tempo molto calmo, senza vento, con una ridotta circolazione che ha portato all'affioramento delle mucillagini formatesi in precedenza sul fondo [16].

L'influenza delle attività solari è stata esclusa dalla mancanza di correlazioni significative fra queste e la frequenza delle mucillagini. Sono state però osservate covarianze fra variazioni della pressione atmosferica e la comparsa delle mucillagini: periodi di massime variazioni in pressione atmosferica corrispondono a eventi di mucillagini nei passati 100 anni (1872-1989). Casi di anossia dei fondali in aree molto estese si sono verificati in corrispondenza di periodi di pressione estremamente bassa (1977) ed estremamente alta (1989) [76]. Oltre alla pressione, anche i movimenti delle onde sono stati chiamati in causa come necessari, se non concause degli eventi di mucillagini [77]. Una corrispondenza è stata osservata fra periodi pluriennali di portate ridotte e superiori alla media del fiume Po. I fenomeni di mucillagini negli anni 1928, 1951, 1988, 1989, 1991, 1997 si sono verificati infatti approssimativamente alla fine dei periodi primaverili degli anni con portate eccezionali, succeduti ad anni con portate al di sotto della minima media [78].

Neve marina

Con il termine "neve marina" si definiscono genericamente le particelle di diametro pari a 0,5 mm o superiore, che si trovano dovunque negli oceani, ed hanno origine attraverso due processi principali (per una rassegna vedi Alldredge e Silver [23]). Nel primo caso, lo zooplancton produce direttamente aggregati, con l'escrezione di fecal pellets o attraverso il rilascio della frazione di cibo non ingerita durante la predazione, avvolta in una matrice mucosa. Nel secondo caso, la formazione di aggregati avviene in seguito alla collisione e conseguente adesione di particelle più piccole presenti nell'acqua, particolarmente quelle nel range da decine a centinaia di micron. La possibilità di formazione di neve dipende dalla concentrazione delle particelle, dalla probabilità di adesione in seguito alla collisione, dalla turbolenza e dalla velocità di sedimentazione [79]. In questo caso, la composizione della neve marina riflette la concentrazione e il tipo di particelle presenti nella colonna d'acqua. Se è presente un numero elevato di diatomee senescenti, gli aggregati saranno dominati da questi organismi.

La presenza nei campioni di mucillagini dell'Adriatico e del Tirreno di molte diatomee, suggerisce che il nucleo originale di formazione della mucillagine possa essere neve marina formata a partire da questi organismi. Tuttavia, un aspetto fondamentale perché la neve marina possa formare aggregati più grossi fino a formazioni mucillaginosi è che deve galleggiare per accumularsi nella colonna d'acqua, fenomeno che normalmente non avviene, in quanto gli aggregati sedimentano molto rapidamente [80].

Allredge e Crocker [18] hanno proposto un modello che può spiegare come questo fenomeno sia probabile in un sistema come il nord Adriatico. Il modello, basato sulla porosità, densità, percentuale in volume di muco contenuto e tasso di sedimentazione del particolato, predice degli accumuli di particolato significativi, lungo gradienti di densità verticali confrontabili con quelli osservati in Adriatico alla profondità di accumulo degli aggregati. In presenza di una leggera stratificazione, tanto più in presenza di un picnoclino netto, come accade in Adriatico, la formazione di aggregati di diatomee nella zona di acque miste, al di sopra del picnoclino, causa il trasporto di acqua superficiale, meno densa, verso il fondale. Quest'acqua viene trattenuta dagli essudati che costituiscono la matrice degli aggregati e non viene rilasciata durante la sedimentazione delle particelle attraverso un'acqua a maggiore densità; questa situazione comporterebbe pertanto un rallentamento se non addirittura un arresto della sedimentazione, favorendo i processi di aggregazione. Le caratteristiche chimiche e l'abbondanza degli essudati rappresentano fattori importanti per la formazione degli aggregati [18].

In Adriatico, quando particolari condizioni ambientali favoriscono un'abbondante crescita di specie come *Cylindrotheca closterium* e altri taxa, come *Chaetoceros* e *Nitzschia*, vengono prodotte grandi quantità di essudati, conosciuti anche come TEP (*transparent exopolymer particles* [81]), che si aggregano insieme alle cellule produttrici e sedimentano fino al picnoclino, dove galleggiano. Poiché gli essudati sono particolarmente resistenti alla decomposizione, possono accumulare per molte settimane; inoltre, in condizioni di tempo calmo e assoluto, che portano ad una forte stratificazione, i processi di aggregazione sono ulteriormente facilitati e favoriti. Infine, le mucillagini così formate salgono in superficie per la formazione di bolle in seguito al metabolismo degli organismi che si trovano al loro interno [82].

Concentrazione dei nutrienti

La situazione relativa alla distribuzione e concentrazione dei nutrienti negli ultimi 20 anni è piuttosto complessa. Alla fine degli anni ottanta, in seguito alla riduzione dei fosfati nei detersivi in Italia, la concentrazione degli ortofosfati nel Po è diminuita, mentre la concentrazione di nitrati è rimasta la stessa. Conseguentemente, la stessa situazione si è verificata nelle zone costiere dell'Adriatico dove la biomassa di fitoplancton (concentrazione di clorofilla a) ha iniziato a diminuire in modo marcato dal 1988. Tuttavia, negli anni ottanta e novanta la produzione e la concentrazione di clorofilla sono state più alte rispetto ai primi settanta, nonostante la riduzione di fosfati [83] probabilmente grazie a condizioni meteorologiche partico-

larmente favorevoli [76]. In quegli anni, la temperatura superficiale è stata più alta della media, particolarmente in primavera ed estate. Queste variazioni nelle portate del Po e conseguentemente nella concentrazione dei nutrienti rispetto alle medie pluriennali, possono aver causato le variazioni osservate nella composizione della comunità fitoplanctonica. In particolare, fioriture ricorrenti di due specie di diatomee *Nitzschia delicatissima* e *Chaetoceros socialis*, prima quasi assenti dall'Adriatico, hanno rappresentato la maggiore variazione nella composizione delle fioriture primaverili [78, 84]. Queste specie hanno sostituito alcune specie di diatomee e dinoflagellate che prima rappresentavano le popolazioni dominanti delle fioriture primaverili negli anni sessanta e settanta, sotto l'influenza del Po, lasciando invariata la biomassa totale (come clorofilla a).

Oltre a modificare la composizione in specie, la concentrazione dei nutrienti determina anche variazioni nella produzione e rilascio di essudati da parte di alcune specie algali. Specie come *N. delicatissima*, *Skeletonema costatum* e *Chaetoceros* sp. in laboratorio producono e rilasciano notevoli quantità di carboidrati ad alto peso molecolare nella fase di crescita esponenziale e stazionaria se in condizioni di fosforo limitante; i polisaccaridi escreti sembrerebbero anche ridurre l'appetibilità delle alghe per i predatori [85]. E' sulla base di queste osservazioni che è stata avanzata l'ipotesi che la formazione di mucillagini sarebbe dovuta ad un'iperproduzione di essudati da parte di microalghe, soprattutto diatomee, in condizioni di limitazione di fosforo [4, 86].

La carenza di nutrienti può inoltre ridurre l'attività batterica eterotrofica, responsabile dell'utilizzazione del DOM, favorendo l'accumulo di grandi quantità di sostanza organica. In un esperimento in laboratorio con acqua dal golfo di Trieste, l'attività glucosidasi batterica veniva fortemente inibita in carenza di fosforo, causando un accumulo di DOC, costituito al 90% circa di carboidrati [87]. Poiché i carboidrati svolgono un ruolo molto importante nell'aggregazione delle cellule e nei processi di coagulazione delle macromolecole, in condizioni di mare stabile, la mancata degradazione del carbonio prodotto durante il bloom può favorire la formazione di aggregati mucilluginosi.

E' stato, inoltre, osservato che condizioni di limitazione di fosforo, oltre ad incrementare il rilascio di essudati, favorirebbero la produzione di essudati meno degradabili, in grado dunque di accumulare nella colonna d'acqua [88].

Thornton *et al.* [89] riassumono quelle che sembrano essere concause dello sviluppo di aggregati mucilluginosi, portando l'attenzione sui processi di condensazione che avvengono in presenza di Ca^{++} e Mg^{++} . Secondo gli autori, sono tre le condizioni neces-

sarie perché si verificano episodi di mucillagine: 1) la presenza di una grossa biomassa algale che produca grosse quantità di polisaccaridi extracellulari; 2) un flusso ridotto del Po e una conseguente riduzione dell'apporto di nutrienti, che induca la produzione di grosse quantità di essudati nel fitoplancton; 3) un fronte del delta del Po non netto, in modo che il fitoplancton cresciuto in acque limitate da nutrienti con un basso contenuto di calcio, si mescoli con acqua di mare a concentrazioni di calcio più elevate. L'elevata produzione di EPS in condizioni di limitazione di nutrienti, insieme ad un'elevata concentrazione di calcio, darebbe origine alle mucillagini.

Produzione di muco da parte di Cyanobacteria

I cianobatteri possono contribuire in modo significativo alla produzione costiera in acque temperate, particolarmente in condizioni di stratificazione estiva, quando la loro produzione supera quella eucariota. Inoltre, i tassi di produzione dei cianobatteri aumentano quando le cellule sono immerse in matrici gelatinose, contribuendo a loro volta, alla produzione del muco. Poiché in Adriatico si verificano spesso condizioni di stratificazione termica estiva e ridotta turbolenza, Kaltenbock e Herndl [90] hanno indicato la possibilità che i cianobatteri siano fra gli organismi significativamente implicati nella produzione di mucillagine.

Zeoliti

In seguito all'accertamento di condizioni di grave eutrofizzazione del Nord Adriatico negli anni '80, come sopra menzionato, il contenuto in fosforo dei detergenti è passato dall'iniziale 7-8% all'1%. In sostituzione del fosforo è stata utilizzata la zeolite A sintetica, insieme ad una più elevata concentrazione di acidi policarbossilici (PCA) (fino al 4-5% del formulato). Pettine *et al.* [91] suggeriscono che la comparsa di mucillagini con frequenze ed estensioni molto superiori rispetto al passato, in concomitanza con un'accresciuta concentrazione di zeolite A possa non essere casuale. Il complesso zeolite-PCA ha un comportamento simile al complesso argille-acidi umici/fulvici e può funzionare come nucleo di aggregazione per colloidali sospesi. Oltre ad aumentare la concentrazione di particellato fine (maggior numero di nuclei di aggregazione), il complesso zeoliti-PCA può dar luogo alla formazione di aggregati meno densi, che possono pertanto distribuirsi lungo la colonna d'acqua e galleggiare, per due motivi legati alla loro struttura cristallina, tuttora da verificarsi sperimentalmente: a) una minore densità della zeolite A rispetto alle argille; b) la possibilità di originare flocculi caratterizzati da una maggiore porosità e pertanto meno densi [91]. I risultati di uno studio speri-

mentale condotto sugli essudati della diatomea *Cylindrotheca closterium*, una delle specie più abbondanti nel muco raccolto nel golfo di Trieste e capace di produrre elevate concentrazioni di aggregati mucosi in condizioni di stress da nutrienti non hanno confermato tuttavia questa ipotesi [92].

Ruolo dello zooplancton

Lo zooplancton sembra contribuire direttamente ed indirettamente alla produzione e all'accumulo di sostanza organica.

La predazione di protisti sulle popolazioni batteriche del microbial loop rappresenta un'importante fonte diretta di produzione di tensioattivi [93] sostanze molto importanti, implicate in diversi processi degli strati superficiali degli oceani, come processi di adesione cellulare, coagulazione di piccoli colloidali e scambi gassosi all'interfaccia acqua-aria. Possono essere proteine, lipidi, carboidrati, ma in maggioranza sono composti polisaccaridici [94, 95]. In un esperimento con tre differenti protozoi, un ciliato e due flagellati, nutriti con lo stesso ceppo batterico, Kujavinski *et al.* [93] hanno osservato una produzione di tensioattivi significativamente superiore rispetto al controllo con i soli batteri, comparabile con i tassi di produzione osservati per il fitoplancton in condizioni di bloom.

Lo zooplancton esercita generalmente un controllo sulla densità algale. E' probabile che durante le fioriture algali primaverili, le popolazioni di copepodi non crescano abbastanza velocemente per controllare l'improvviso aumento di biomassa e mantenere, quindi, bassa la concentrazione del fitoplancton. La pressione predatoria potrebbe essere ulteriormente ridotta a causa dell'elevata produzione di essudati durante le fasi di crescita esponenziale e stazionaria delle alghe, che aumentano la viscosità del mezzo e rendono più difficile il movimento degli organismi predatori, limitando le probabilità di incontro. Inoltre, alcune delle sostanze rilasciate dalle alghe sembrano tossiche o repellenti nei confronti dello zooplancton. In questo modo la popolazione algale può continuare a crescere e a rilasciare essudati [85]. Le specie di copepodi del Nord Adriatico non sembrano in grado di predare il fitoplancton associato alla neve marina [96], come è stato confermato dall'analisi degli acidi grassi dello zooplancton durante un fenomeno di mucillagine nel 1991, che indicava una condizione di forte denutrizione, con conseguente consumo delle proprie riserve di grassi [97].

Un altro effetto indiretto dello zooplancton è legato al controllo dell'abbondanza batterica. Uno studio sulla mucillagine del 1997 ha mostrato che l'abbondanza batterica sui fiocchi di mucillagine era significativamente inferiore rispetto all'abbondanza

dei batteri liberi (nella colonna d'acqua circostante), mentre il metabolismo (produzione, respirazione, attività ectoenzimatica) era significativamente superiore, grazie alla ricchezza in sostanza organica e nutrienti dei fiocchi [98]. Poiché il rapporto virus/batteri delle popolazioni dei fiocchi e di quelle libere non era diverso, è stato ipotizzato che fosse la predazione da parte di organismi eterotrofi a mantenere bassa l'abbondanza batterica sui fiocchi di mucillagine, riducendo pertanto l'utilizzazione e la degradazione della mucillagine [98].

Un ulteriore aspetto da considerare è la predazione selettiva dei flagellati sulle specie batteriche. In uno studio in mesocosmi sulla dinamica della struttura della comunità batterica durante una fioritura algale, è stata osservata una significativa variazione delle specie presenti sul particolato, corrispondente a variazioni nel metabolismo batterico (produzione, attività enzimatica) [99]. Gli autori di questo studio suggeriscono che, oltre ad un processo di successione in specie di batteri che colonizzano il particolato e alle conseguenti variazioni nelle caratteristiche del substrato, la predazione di eterotrofi flagellati possa avere un impatto significativo sulla composizione in specie della comunità, influenzando quindi i tassi di ciclizzazione di sostanza organica mediati dai batteri.

Attacchi virali

In uno studio è stato messo in evidenza il ruolo di attacchi virali al fitoplancton che libererebbe i polisaccaridi di riserva interni alle cellule [100]. Sfortunatamente l'importanza di questo processo non è facile da valutare per problemi riguardanti la conservazione dei campioni di mucillagini esaminati. Inoltre, le analisi effettuate tramite sonde molecolari non hanno fornito indicazioni univoche, anche a causa dell'elevata impurità dei campioni e della presenza abbondante di polisaccaridi che rende difficile l'estrazione del DNA [100]. Studi condotti con la microscopia confocale e con lecitine marcate con FITC che si legano a residui polisaccaridici specifici hanno evidenziato la presenza di cellule lisate all'interno del muco [24]. L'importanza della lisi fitoplanctonica, tuttavia, contribuirebbe alla concentrazione di polisaccaridi con elevate percentuali di glucano (molecola di riserva del fitoplancton) che risulta più degradabile degli eteropolisaccaridi attivamente rilasciati all'esterno della cellula [36].

Interazioni fra comunità planctonica e caratteristiche fisiche degli aggregati

Casi di formazione di mucillagine in Adriatico sono stati preceduti dall'abbondante presenza di aggregati fluidi con attività tensioattiva lungo tutta la colonna

d'acqua al di sopra del termocline. Sulla base di misurazioni elettrochimiche a lungo termine dell'attività tensioattiva in superficie durante varie stagioni, dell'abbondanza degli aggregati fluidi con attività tensioattiva e la caratterizzazione degli aggregati giganti delle estati 1991 e 1997 è stato proposto un possibile scenario, che comprende le interazioni fra proprietà chimico-fisiche e l'attività batterica [101].

L'abbondante produzione algale legata all'eutrofizzazione del Nord Adriatico porta all'accumulo di quantità di macromolecole essudate (principalmente polisaccaridi) come sospensioni colloidali nello strato eufotico, al di sopra del picnocline. I batteri possono intervenire direttamente nella produzione di polimeri ma più significativamente controllano l'estensione e la durata delle fioriture, regolando la disponibilità dei nutrienti e limitando i fenomeni di aggregazione del fitoplancton. Con lunghi tempi di residenza, le sospensioni colloidali si aggregano in particelle di dimensioni di 1-100 μm e alla concentrazione critica stimata in circa 5×10^7 particelle per litro, formano un gel, con un'attività tensioattiva fino a 50 volte superiore rispetto all'acqua circostante.

Questi aggregati contengono meno di 1 ppm di carbonio organico (principalmente polisaccaridi) e sono sede di un'intensa attività batterica. La transizione fase gel-sol è quasi istantanea ed è determinata dall'idrodinamica locale (turbolenza e attrito), dalla vicinanza alla superficie e dalla densità della colonna d'acqua. Il galleggiamento degli aggregati dipende dall'attività batterica sugli aggregati stessi. La persistenza e la stabilità degli aggregati dipende da: 1) transizione da gel a sol, che provoca la sedimentazione delle particelle; 2) processi fisici su larga scala, come forti venti e correnti, che causano la disaggregazione fisica e il trasporto all'esterno del bacino.

Una nuova ipotesi sulla formazione della mucillagine

Una nuova teoria è stata proposta recentemente da Azam *et al.* [102]. Il controllo della produzione dei polisaccaridi, del loro accumulo e della loro flocculazione, secondo questa teoria, sarebbe dovuto ad una serie complessa di interazioni che coinvolge gli organismi del *microbial loop*, compreso il fitoplancton, e il pool di sostanza organica ed inorganica.

Nonostante sia ormai accettata una nuova visione della natura fisica del pool di sostanza organica [101, 103-106] e sia riconosciuto il ruolo dei batteri sul controllo del ciclo del carbonio [107, 108], i modelli finora proposti non avevano tenuto conto di questi nuovi concetti.

Continuum organico negli oceani

L'idea del *continuum* di materia organica, secondo la quale il mare è un gel costituito da colloidali e polimeri organici *cross-linked*, è stata suggerita da studi di ecologia microbica [105].

Non è più appropriato distinguere fra particolato e disciolto, ma si deve considerare una distribuzione del particolato lungo uno spettro dimensionale continuo, entro il quale un'importante frazione è rappresentata dai "colloidali" (dimensioni, almeno lungo una direzione, comprese fra 1 nm e 1 μm). Questa frazione è estremamente dinamica ed eterogenea, essendo costituita da organismi, detriti, macromolecole organiche, minerali, argille e ossidi ed è continuamente generata, rimossa e trasformata da numerosi processi chimico-fisici e biologici [109].

Un decisivo contributo a questa visione è stato fornito negli ultimi 10 anni, grazie all'applicazione di metodologie diverse dalle usuali routine oceanografiche [81, 110-112]. L'uso di contatori di particelle elettronici ed elettrochimici, della microscopia elettronica e di tecniche istologiche di colorazione dei tessuti ha infatti mostrato l'esistenza di una frazione di particolato, fluida e flessibile, nel range dimensionale che va da pochi nanometri a centinaia di micrometri. La loro area di interfaccia nella colonna d'acqua sorpassa di alcuni ordini di grandezza l'area della superficie del mare [112]. La struttura dell'interfaccia, la funzione e la chimica di queste particelle marine si rivelano ad una risoluzione vicina a 0,001 μm [101]. In Tab. 1 è riportata una loro definizione operativa, in funzione del metodo di indagine.

Tramite un elettrodo a mercurio in immersione, sono state individuate particelle tensioattive in campioni non filtrati di acque estuarine [119] e di mare [120]. La maggiore abbondanza di queste particelle, di dimensioni fra 1 e 100 μm , è stata trovata nella zona di mescolanza di estuari e alla superficie del mare [119]. Le macromolecole che danno origine a questi aggregati (polisaccaridi, proteine, lipidi) possono essere il prodotto dell'escrezione e/o della decomposizione di fitoplancton [95, 101]; tuttavia anche molti batteri contribuiscono in modo significativo alla produzione di tensioattivi, che possono essere escreti all'esterno della cellula o rimanere parzialmente attaccati [121]. Queste macromolecole inoltre possono essere prodotte dall'attività predatoria dello zooplancton sui batteri [93]. È stato osservato che specie diverse producono essudati diversi [95].

Koike *et al.* [110] hanno individuato una categoria di particelle organiche submicrometriche nel range 0,38-1,0 μm , che comprende virus, batteri, cianobatteri e piccoli eucarioti. Queste particelle, che arrivano a concentrazioni di 10^{10} per litro, sono per il 95% non viventi, sono molto fragili e scompaiono con la sonicazione.

Tabella 1. - Le maggiori classi di particelle non viventi presenti nello strato superficiale del mare (zona eufotica)*

Tipo	Dimensioni	Provenienza	Metodo d'analisi	Concentrazione (n/l)
Piccoli colloidali [111, 113, 114]	5-200 nm	Bacino di Santa Monica Nord Atlantico Pacifico nord-occidentale	TEM	10^7 - 11^{12} max al termocline
Particelle submicrometriche [110,115]	0,38-1 μ m	Pacifico del nord (Giappone) Atlantico nord-occidentale	Conta particelle Coulter	5×10^{10} - 8×10^{10} nei primi 40 m, < 10^9 sotto i 200 m
Aggregati fluidi tensioattivi [116, 119, 120]	1-100 μ m	Mediterraneo	Adesività all' elettrodo al Hg	10^5 - 5×10^7 max all'alocline
Particelle esopolimeriche trasparenti (TEP) [81, 117]	3-100 μ m	Costa della California	Microscopia dopo colorazione Alcian blue	3×10^4 - 5×10^6
Particelle contenenti proteine (colorate con Comassie), CSP [112]	2-500 μ m	Costa della California	Microscopia dopo colorazione Comassie blue	10^6 - 10^8
Aggregati giganti (mucillagini) [15, 34, 118]	>1 m	Episodici, Adriatico settentrionale	Prelievo con sommozzatori	0-10 in 100 m ³ sopra il termocline (circa 20 m)

* Definite sperimentalmente secondo le tecniche di misurazione utilizzate.

La scoperta di una grande popolazione di particelle organiche più piccole di 120 nm, raccolte per ultracentrifugazione direttamente sulle griglie per l'osservazione al microscopio elettronico [111], ha dimostrato l'esistenza di un continuum di particelle colloidali, da pochi nanometri a particelle più larghe, che alla fine rimuove la sostanza organica dalla colonna d'acqua per sedimentazione. Questi colloidali raggiungono una densità di 10^{12} per litro, con una superficie totale dell'ordine di 10 m^2 per metro cubo [101]. La composizione di queste particelle non è dissimile da quella della sostanza disciolta e particellata, si può pertanto pensare ad una origine comune.

Chin *et al.* [106] hanno dimostrato sperimentalmente che i polimeri, carboidrati, proteine e lipidi, presenti nell'acqua di mare possono aggregarsi spontaneamente e formare un gel polimerico, con dimensioni fra 2 e 200 nm. L'equilibrio delle dimensioni del gel così assemblato dipende dalla concentrazione di polimeri liberi. Nell'oceano, con una possibilità virtualmente infinita di fonti di polimeri, i gel possono raggiungere potenzialmente dimensioni molto grandi. Il meccanismo principale di formazione dei gel sembra essere la formazione di ponti calcio e magnesio. Un'altra caratteristica importante è che rimuovendo il gel appena formato si forma nuovo gel, con l'implicazione biogeochimica che la formazione di colloidali nell'oceano sarebbe influenzata dal tasso di rimozione del particolato.

Infine, l'applicazione di tecniche di colorazione istologiche ha consentito di evidenziare la presenza delle TEP (*transparent exopolymer particles*), particelle larghe, discrete e trasparenti (vedi paragrafo precedente [81]) e delle CSP (*Comassie staining particles*) [112]. Con la colorazione con Alcian blu che rivela una significativa componente di polisaccaridi, lungo le coste della California sono state trovate TEP in concentrazioni fra 28 e 5000 particelle per ml di acqua di mare, con dimensioni variabili fra 3 e 100 μ m. Le TEP possono anche essere componenti significative di aggregati di dimensioni maggiori e contenere o meno inclusioni visibili. Hanno origine da essudati disciolti polisaccaridici rilasciati da fitoplancton o batteri.

Utilizzando Comassie blu brillante, tipico per la colorazione di proteine, Long e Azam [112] hanno mostrato la presenza di molte particelle proteinaee, chiamate CSP, secondo la tecnica utilizzata. Le TEP possono contenere CSP, ma la maggior parte di queste ultime non contiene carboidrati e sono da 3 a 13 volte più numerose delle TEP. La loro area, in acque costiere, varia da 10^2 a $10^4 \text{ mm}^2 \text{ l}^{-1}$. Inoltre, molte di queste particelle sono colonizzate da batteri [112].

Gli organismi, dunque, vivono, "lavorano" e fanno parte di questa matrice tutt'altro che omogenea. I polimeri finora descritti sono prodotti e degradati principalmente dai microrganismi. Il ruolo dei batteri e dei protozoi nel controllo dei flussi di carbonio negli oceani, anticipato da Pomeroy [122] è stato formaliz-

zato nella teoria del *microbial loop* negli anni '80 da Azam *et al.* [107]. I batteri che utilizzano il DOM sono predati dai protozoi, a loro volta utilizzati dai ciliati. Il sistema è stato definito un circuito semi-chiuso (*loop*) perché durante la predazione, parte del carbonio viene perso come perdita predatoria (*sloppy feeding*) o viene escreto, ed è prontamente riutilizzato dai batteri stessi. Si capisce l'importanza del *microbial loop* se si considera che il flusso di carbonio attraverso questa strada può rappresentare da 0 a 100% della produzione primaria locale [123]. La matrice di gel crea un ambiente fisico-chimico strutturato ed eterogeneo entro il quale, e con il quale, avvengono le interazioni microbiche che controllano il ciclo del carbonio [108]. Batteri, Archea, fitoplancton, protozoi e virus sono visti totalmente immersi in questo gel, organizzati come comunità e consorzi ad una microscala spaziale e temporale [105]. Le interazioni microbiche all'interno del gel possono alterare la natura e la densità del gel stesso, formando la mucillagine o inibendone la formazione [102]. Questa eterogeneità origina degli "hot-spots" di produzione primaria, di concentrazione e trasformazione di sostanza organica, così come di cicli di nutrienti, cambiando in modo fondamentale e intensificando e diversificando in modo significativo la biogeochimica del carbonio a livello di microscala.

In questo scenario si possono esplorare le basi meccanicistiche della formazione della mucillagine. Nell'ottica del *continuum*, le superfici cellulari rappresentano regioni di polisaccaridi altamente concentrate (gel più denso) che si mescolano con il gel meno denso nell'acqua circostante e attraverso esso interagiscono con le superfici cellulari di altri microbi. La consistenza di gel dell'acqua di mare è mantenuta in qualche modo da batteri e fitoplancton che rappresentano minuscole frazioni di volume d'acqua (10^{-7} e 10^{-6} rispettivamente). Se i polimeri del gel sono molto resistenti e persistono a lungo, è sufficiente rilasciare poche macromolecole nuove per il mantenimento della struttura. Il condensamento e l'aggregazione in mucillagine richiedono l'accumulo di una sostanziosa quantità di materiale organico resistente.

L'ipotesi formulata si articola nei seguenti punti fondamentali di seguito descritti:

1) Uno degli argomenti centrali è come e da chi venga prodotta la sostanza biorefrattaria: la materia organica che costituisce la mucillagine dell'Adriatico si forma dalla condensazione di polisaccaridi colloidali e polimerici prodotti dall'azione del metabolismo batterico sulla sostanza organica, attraverso un'idrolisi incompleta dei polisaccaridi complessi; dall'interazione dei batteri con gli altri organismi del *microbial loop*; dall'interazione dei batteri con il detrito. Inoltre, è direttamente prodotta dai batteri che utilizzano parte della produzione primaria per la formazione dei polisaccaridi della propria capsula. Come risultato si ha un

accumulo "invisibile" di carbonio organico disciolto (DOC) e carbonio organico colloidale (COC), continuamente trasformati dall'attività microbica.

Interazioni con il fitoplancton. - I batteri, che possiedono enzimi idrolitici sulla propria superficie esterna (fra i quali i più importanti sono le proteasi, le glucosidasi e le fosfatasi) tramite i quali interagiscono con cellule algali e detrito, tendono a clusterizzare nelle vicinanze di alghe o in presenza di gradienti di nutrienti [124, 125]. Con i loro enzimi idrolitici, i batteri sono capaci di attaccare e trasformare la superficie esterna di alghe vive, con numerose conseguenze sull'attività algale. È stato suggerito che la produzione di muco da parte del fitoplancton sia una strategia di difesa nei confronti degli attacchi batterici e virali [126]. È stato inoltre suggerito che l'azione enzimatica batterica medi e controlli il rilascio di fibrille di muco dalla superficie algale [127]. Questo implica che il rilascio di essudati da parte delle alghe, oltre ad essere un processo attivo, ha anche bisogno della mediazione batterica. Un'altra conseguenza di questa interazione è evidente durante le fioriture algali, quando l'idrolisi batterica dei polisaccaridi sulla superficie algale riduce la probabilità di aggregazione delle numerose cellule e quindi ritarda il fenomeno della sedimentazione [127] favorendo un'elevata produzione di sostanza organica che può in seguito accumulare nel sedimento.

Interazioni con il detrito. - I processi di morte non predatoria, che riguardano circa la metà della produzione primaria (autolisi, morte cellulare programmata e attacchi virali) [24, 128] trasferiscono una frazione significativa di produzione primaria nella fase di detrito. Una volta che le alghe sono morte, i batteri possono attaccare e solubilizzare anche i polisaccaridi intracellulari. Le alghe rappresentano quindi una fonte importante di polisaccaridi (indiretta e mediata dal metabolismo batterico) anche senza rilasciare attivamente essudati. L'elevata concentrazione di glucosio trovata in campioni di mucillagini è stata attribuita alla presenza di glucano, sostanza di riserva delle diatomee [26]. Inoltre, le concentrazioni dei polisaccaridi intracellulari sono indipendenti dalla concentrazione di fosforo inorganico nel mezzo acquoso (Pi) [129] che invece influenza la velocità di rilascio di essudati. Ciò implica che per una diffusione elevata di polisaccaridi algali non è necessaria la presenza di specie produttrici di essudati o condizioni di P limitante, ma è sufficiente una mortalità di massa, seguita dall'idrolisi batterica [102]. I tassi di attività delle idrolasi batteriche non sono tutti uguali [130] e questo è stato osservato anche su popolazioni batteriche di fiocchi di mucillagine del 1997 [98]. Le glucosidasi, pur essendo molto attive sugli aggregati, risultano inferiori di 2 o 3 ordini di grandezza rispetto alle proteasi e alle fosfatasi. Pertanto, non appena le cellule muoiono e vengono colonizzate, inizia una solubilizzazione selettiva, che

porta alla formazione di aggregati sempre più poveri di proteine e fosforo organico e più ricchi in carboidrati, che poi precipitano sul fondo [131].

Produzione diretta di muco. - Dati qualitativi [132] e quantitativi [133] confortano l'ipotesi che la produzione dei polisaccaridi batterici di superficie possa rappresentare un'importante fonte di materiale mucillaginoso. Infatti, più del 45% del glucosio utilizzato da batteri pelagici è convertito in materiale polisaccaridico e rilasciato nell'acqua [64]. Questo processo è tanto più importante durante le fioriture primaverili, quando le numerose cellule sfuggite alla predazione rappresentano un importante input di sostanza organica fresca, che può essere rapidamente trasformata dall'attività batterica [102].

Una simulazione descritta da Kiorboe e Jackson [134] dimostra che l'intensa attività batterica su particelle di neve marina che sedimentano crea una scia di sostanza organica parzialmente idrolizzata che è a sua volta velocemente utilizzata dai batteri liberi che si spostano in questa scia. Immersi in questo microhabitat ricco di nutrienti e detrito i batteri hanno un'efficienza di utilizzazione molto più elevata di quelli lontani dalla scia. Quindi una grossa parte di produzione primaria può essere subito trasformata in muco batterico durante la sedimentazione da parte dei molti colonizzatori ($10^8/10^9$ ml⁻¹, [98]) e dai batteri che raggiungono e seguono la scia; la frazione sedimentata è ulteriormente utilizzata dai batteri bentonici, presenti in elevate densità, circa 10^9 cell g⁻¹ sedimento [135]. È importante notare che il muco rilasciato dai batteri è resistente alla degradazione [64, 136].

L'identificazione di componenti cellulari specifiche dei batteri nel DOM [137, 138] indica che i batteri sono importanti produttori di DOM, anche se meno del 25% di questa materia è stato finora identificato e caratterizzato a livello biochimico [19, 20].

2) I precursori della mucillagine nel pool di DOC persistono ("immagazzinamento" di DOC) perché la loro complessità strutturale li rende essenzialmente inaccessibili agli enzimi idrolitici batterici. McCarthy *et al.* [139] hanno trovato che la maggior parte dell'azoto organico ad alto peso molecolare (> 1000 Da) negli oceani esiste nella forma di ammidi. Poiché è improbabile che queste sostanze si formino spontaneamente da altri composti, si suppone che rappresentino la frazione resistente alla degradazione di biomolecole complesse. Queste ultime potrebbero essere amminozuccheri acetilati, che rappresentano il secondo costituente delle biomolecole contenenti ammidi, che si trova frequentemente nei polimeri strutturali delle piante, animali e batteri (per esempio chitina e componenti della parete cellulare batterica, come mureine e lipolisaccaridi). I peptidoglicani in particolare contengono molte strutture inusuali che servono probabilmente a limitare l'idrolisi enzimatica. Alghe e batteri producono un numero notevole di polisaccaridi, adatti

a funzioni specifiche diverse. Azam *et al.* [104] hanno ipotizzato che la diversità strutturale di polisaccaridi complessi è tale che, da un punto di vista evolutivo, i batteri abbiano smesso di cercare di evolvere idrolasi che possano idrolizzarli tutti. Quindi i polisaccaridi tendono a persistere e potrebbero essere i precursori della mucillagine.

3) Nonostante una concentrazione di fosfati estremamente bassa, la produzione primaria in Adriatico è mantenuta ad alti livelli dall'efficiente remineralizzazione sostenuta sugli aggregati dall'elevata attività della fosfatasi alcalina e dalle 5'-nucleotidasi batteriche. Come risultato viene mantenuto ad alti livelli il rifornimento di carbonio fotosinteticamente fissato soggetto al metabolismo batterico nei precursori della mucillagine. L'interazione fra alghe e batteri può produrre microhabitat in cui avviene un'elevata rigenerazione di fosforo inorganico da parte di una fosfatasi batterica che non viene repressa neanche ad alte concentrazioni di fosforo (0,1 mM) [140]. In questo caso, il fosforo utilizzato dal fitoplancton è prontamente rigenerato e non diventa immediatamente limitante; questo implica anche che conoscere la concentrazione di fosforo inorganico non è sufficiente per prevedere il tasso di produzione primaria; inoltre, la rigenerazione di fosforo può essere ulteriormente accentuata in caso di aggregazione algale, a causa di un'intensificata interazione alghe-batteri.

4) I legami incrociati (*cross-linking*) dei polisaccaridi con i ponti Ca²⁺ e Mg²⁺ producono gel e aggregati che formano la mucillagine. La struttura delle comunità batteriche potrebbe rappresentare il "grilletto" per questa formazione poiché i batteri producono polisaccaridi di capacità gelificanti molto diverse.

La capacità gelificante di un polisaccaride prodotto da un organismo dominante e accumulato in gran quantità può essere molto importante. Un polisaccaride con elevate proprietà gelificanti può essere prodotto direttamente o attraverso la modificazione enzimatica di substrati preesistenti. In entrambi i casi, per quanto spiegato nei paragrafi precedenti sulla diversità delle attività enzimatiche e sulla diversità dei polisaccaridi prodotti da diverse specie batteriche, è molto importante la struttura della comunità.

5) L'attività batterica nella matrice gelatinosa produce gas (per esempio CO₂, N₂ and CH₄) che fanno galleggiare la mucillagine in superficie.

Conclusioni

Dopo la presentazione di diverse ipotesi sulla formazione della mucillagine, è stata descritta l'ipotesi formulata da Azam *et al.* [102], che per prima delinea una cornice teorica entro la quale il fenomeno della mucillagine è il risultato dei processi di interazione e

trasformazione degli organismi e della sostanza organica e inorganica, lungo uno spettro dimensionale continuo. In questo contesto, è centrale il ruolo dei batteri, che attraverso le loro attività sono in grado di controllare o quanto meno influenzare l'andamento di numerosi processi. La comprensione dei meccanismi alla base di questi processi permetterà in futuro di svolgere la necessaria attività di controllo e previsionale sui fenomeni della mucillagine.

Ringraziamenti

Si ringrazia Raffaele Scenati per il suo contributo nell'elaborazione del manoscritto.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 22 ottobre 2002.

BIBLIOGRAFIA

- De Gobbis D, Malej A, Fonda Umani S. The mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. A critical review of the present scientific hypothesis. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3): 373-82.
- Fonda Umani S, Ghirardelli E, Specchi M. *Gli episodi di "mare sporco" nell'Adriatico dal 1729 ai giorni nostri*. Trieste, Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia: Direzione Regionale dell'Ambiente; 1989. 178 p.
- Marchetti R. The problems of the Emilia Romagna coastal waters: facts and interpretations. In: Vollenweider R, Marchetti R, Viviani R (Ed.) *Proceedings of the international conference on Marine Coastal Eutrophication*. Bologna 21-24 March, 1990. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 21-3.
- Vollenweider RA, Rinaldi A. (Ed.). Marine mucilages, with special reference to mucilage events in the northern Adriatic Sea, the Tyrrhenian Sea and the North Sea. *Sci Tot Environ* 1995;165:1-230.
- Funari E, Azam F, Fonda Umani S, Pagnotta R (Ed.). State of the art and new scientific hypotheses on the phenomenon of mucilages in the Adriatic Sea. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3).
- Lancelot C. The mucilage phenomenon in the continental coastal waters of North Sea. *Sci Tot Environ* 1995;165:83-102.
- van Rijssel M, Janse I, Noordkamp DJB, Gieskes WWC. An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. *J Sea Res* 2000;43:297-306.
- Janse I, van Rijssel M, Ottema A, Gottschal JC. Microbial breakdown of *Phaeocystis mucopolysaccharides*. *Limnol Oceanogr* 1999;44(6):1447-57.
- Boalch GT, Harbour DS. Unusual diatom off the coast of southwest England and its effect on fishing. *Nature* 1977;269:687-8.
- Boalch GT. Changes in the phytoplankton of the western English Channel in recent years. *Br Phycol J* 1987;22:225-35.
- Innamorati M. Hyperproduction of mucilages by micro and macro algae in the Tyrrhenian Sea. *Sci Tot Environ* 1995;165: 65-81.
- Myklestad S. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J Exp Mar Biol Ecol* 1977;29:161-79.
- Myklestad S, Holm-Hansen O, Varum KM, Volcani BE. Rates of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. *J Plankton Res* 1989; 11:763-73.
- Gotsis-Skretas O. Mucilage appearances in Greek waters during 1982-1994. *Sci Tot Environ* 1995;165:229-30.
- Stachowitsch M, Fanuko N, Richter M. Mucus aggregates in the Adriatic Sea: an overview of stages and occurrences. *PSZNI Mar Ecol* 1990; 11(4):327-50.
- Rinaldi A, Vollenweider RA, Montanari G, Ferrari CR, Ghetti A. Mucilages in Italian Seas: the Adriatic and Tyrrhenian Seas, 1988-1991. *Sci Tot Environ* 1995;165:165-83.
- Berthon J-F, Zibordi G, Hooker SB. Marine optical measurements of a mucilage event in the Northern Adriatic Sea. *Limnol Oceanogr* 2000; 45(2):322-7.
- Allredge AL, Crocker KM. Why do sinking mucilage aggregates accumulate in the water column? *Sci Tot Environ* 1995; 64:15-22.
- Wakeham SG, Lee C, Hedges JI, Hernes PJ, Peterson ML. Fate of major biochemicals in water column particles and sediments of the central Equatorial Pacific Ocean. *Geochim Cosm Acta* 1997;61:5363-69.
- Benner R. Cycling of dissolved organic matter in the ocean. In: Hessen DO, Tranvik LJ (Ed.). *Aquatic humic substances: ecology and biogeochemistry*. New York: Springer; 1998, 317-31.
- Pettine M, Puddu A, Totti C, Zoppini A, Artegiani A, Pagnotta R. Caratterizzazione chimica e biologica di mucillagini. *Biol Mar Suppl Notiz SIBM* 1993;1:39-42.
- Faganeli J, Gacic M, Malej A, Smoldaka N. Pelagic organic matter in the Adriatic Sea in relation to winter hydrographic conditions. *J Plankton Res* 1989;11:1129-41.
- Allredge AL, Silver MW. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Progr Oceanogr* 1988; 20:41-82.
- Baldi F, Minacci A, Saliot A, Mejanelle L, Mozetic P, Turk V, Malej A. Cell lysis and release of particulate polysaccharides in extensive marine mucilage assessed by lipid biomarkers and molecular probes. *Mar Ecol Progr Ser* 1997;153:45-57.
- De Angelis F, Barbarulo MV, Bruno M, Volterra L, Nicoletti R. Chemical composition and biological origin of "dirty sea" mucilages. *Phytochem* 1993; 34(2):393-5.
- Posedel N, Faganeli J. Nature and sedimentation of suspended particulate matter during density stratification in shallow coastal waters (Gulf of Trieste, Northern Adriatic). *Mar Ecol Progr Ser* 1991;77:135-45.
- Faganeli J, Kovac N, Leskovsek H, Pezdic J. Sources and fluxes of particulate organic matter in shallow waters characterized by summer macroaggregate formation. *Biogeochem* 1995;29:71-88.

28. Mecozzi M, Acquistucci R, Di Noto V, Pietrantonio E, Amici M, Cardarilli D. Characterization of mucilage aggregates in Adriatic and Tyrrhenian Sea: structure similarities between mucilage samples and the insoluble fractions of marine humic substance. *Chemosphere* 2001; 44:709-20.
29. Viviani R, Boni L, Cattani O, Milandri A, Pirini M, Poletti R, Pompei M. Fatty acids, chlorophylls and total silicon in mucilaginous aggregates collected in a coastal area of the Northern Adriatic Sea facing Emilia-Romagna in August 1988. *Sci Tot Environ* 1995;165:193-201.
30. Kovac N, Faganeli J, Sket B, Bajt O. Characterization of macroaggregates and photodegradation of their water soluble fraction. *Org Geochem* 1998; 29(5-7):1623-34.
31. Zelibor JL Jr, Romankiw L, Hatcher PG, Cowell RR. Comparative analysis of the chemical composition of mixed and pure cultures of green algae and their decomposed residues by ¹³C nuclear resonance spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 1988;56:1051-60.
32. Derenne S, Le Berre F, Largeau C, Hatcher PG, Connan J, Raynaud JF. Formation of ultralaminae in marine kerogens via selective preservation of thin resistant outer walls of microalgae. *Org Geochem* 1992;19:345-50.
33. Aluwihare LI, Repeta DJ, Chen RF. A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface seawater. *Nature* 1997;387:166-9.
34. Leppard GG. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. *Sci Tot Environ* 1995;165:103-31.
35. Mingazzini M, Colombo S, Ferrari GM. Application of spectrofluorimetric techniques to the study of marine mucilages in the Adriatic Sea: preliminary results. *Sci Tot Environ* 1995; 165:133-44.
36. Hama T, Yanagi K. Production and neutral aldose composition of dissolved carbohydrates excreted by natural marine phytoplankton populations. *Limnol Oceanogr* 2001;46(8): 1945-55.
37. Decho AW. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 1990;28:73-153.
38. Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. *J Phicol* 1993;29:537-66.
39. McCarthy M, Hedges J, Benner R. Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in seawater. *Mar Chem* 1996;55:281-97.
40. Rich JH, Ducklow HW, Kirchman DL. Concentrations and uptake of neutral monosaccharides along 140W in the equatorial Pacific: Contribution of glucose to heterotrophic bacterial activity and the DOM flux. *Limnol Oceanogr* 1996;41:595-604.
41. Sigleo AC. Biochemical components in suspended particles and colloids: carbohydrates in the Potomac and Patuxent estuaries. *Org Geochem* 1996;24:83-93.
42. Borch NH, Kirchman DL. Concentration and composition of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in seawater determined by HPLC-PAD. *Mar Chem* 1997;57:85-95.
43. Skoog A, Benner R. Aldoses in various size fractions of marine organic matter: implications for carbon cycling. *Limnol Oceanogr* 1997;42:1803-13.
44. Aluwihare LI, Repeta DJ. A comparison of the chemical characteristics of oceanic DOM and extracellular DOM produced by marine algae. *Mar Ecol Progr Ser* 1999;186:105-17.
45. Mykkestad SM. Phytoplankton extracellular production and leakage with considerations on the polysaccharide accumulation. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3):401-4.
46. Kovac N, Bajt O, Faganeli J, Sket B, Orel B. Study of macroaggregate composition using FT-IR and H-NMR spectroscopy. *Mar Chem* 2002;78: 205-15.
47. Biersmith A, Benner R. Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter. *Mar Chem* 1998; 63:131-44.
48. Ittekkot V, Brockmann U, Michaelis W, Degens ET. Dissolved free and combined carbohydrates during a phytoplankton bloom in the northern North Sea. *Mar Ecol Progr Ser* 1981; 4:299-305.
49. Lancelot C. Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the Southern bight of the North Sea. *Estuar Coast Shelf Sci* 1984; 18:65-77.
50. Sondeergard M, Schierup HH. Release of extracellular organic carbon during a diatom bloom in Lake Mosso: molecular weight fractionation. *Freshwater Biol* 1982;12:313-20.
51. Moller Jensen L. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight composition and bacterial assimilation. *Mar Ecol Progr Ser* 1983;11:39-48.
52. Roberts IS. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50:285-315.
53. Dudman WF. The role of surface polysaccharides in natural environments. In: Sutherland I (Ed.). *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*. London: Academic Press; 1977. p. 357-414.
54. Weiner RM, Langille S, Quintero EJ. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *J Ind Microbiol* 1995;15:339-46.
55. Weiner RM. Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol* 1997;15(10):390-4.
56. Berry A, DeVault JD, Chakrabarty AM. High osmolarity is a signal for enhanced *algD* transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Bacteriol* 1989;171(5):2312-7.
57. Zhan H, Lee CC, Leigh JA. Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J Bacteriol* 1991;173(22): 7391-4.
58. Mian FA, Jarman TR, Righelato RC. Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1978; 134(2):418-22.
59. Jarman TR, Deavin L, Slocombe S, Righelato RC. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol* 1978;107:59-64.

60. Quintero EJ, Weiner RM. Evidence for the adhesive function of the exopolysaccharide of *Hyphomonas* Strain MHS-3 in its attachment to surfaces. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1897-903.
61. Quintero EJ, Busch K, Weiner RM. Spatial and temporal deposition of adhesive extracellular polysaccharide capsule and fimbriae by *Hyphomonas* Strain MHS-3. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(4):1246-55.
62. Suci PA, Frolund B, Quintero EJ, Weiner RM, Geesey GG. Adhesive extracellular polymers of *Hyphomonas* MHS-3: interaction of polysaccharides and proteins. *Biofouling* 1995;9:95-114.
63. Quintero EJ, Weiner RM. Physical and chemical characterization of the polysaccharide capsule of the marine bacterium, *Hyphomonas* Strain MHS-3. *J Ind Microbiol* 1995;15:347-51.
64. Stoderegger K, Herndl GJ. Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 1998;43(5):877-84.
65. Ogawa H, Amgai Y, Koike I, Kaiser K, Benner R. Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science* 2001;292:917-20.
66. Williams AG, Wimpenny JWT. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in batch culture. *J Gen Microbiol* 1977;102:13-21.
67. Czajka DR, Lion LW, Shuler ML, Ghiorse WC. Evaluation of the utility of bacterial extracellular polymers for treatment of metal-contaminated soils: polymer persistence, mobility, and the influence of lead. *Wat Res* 1997;31(11):2827-39.
68. Martin JP, Richards SJ. Decomposition and binding action of a polysaccharide from *Chromobacterium violaceum* in soil. *J Bacteriol* 1963;85:1288-94.
69. Martens DA, Frankenberger WT Jr. Decomposition of bacterial polymers in soil and their influence on soil structure. *Biol Fertility Soils* 1992;13(2):65-73.
70. UNESCO. *Proceedings of the meeting of the National Committee for the International Hydrobiological Programme of Mediterranean Countries*. Rome, 9-12 October 1978. Parigi: UNESCO; 1978. (IMP/MED/1).
71. De Gobbis D, Gilmartin M, Revelante N. An annotated nitrogen budget calculation for the Northern Adriatic Sea. *Mar Chem* 1986;20:159-77.
72. Pettine M, Patrolocco L, Camusso M, Crescenzo S. Transport of carbon and nitrogen to the Northern Adriatic Sea by the Po River. *Estuar Coast Shelf Sci* 1998;46:127-42.
73. Tartari G, Milan C, Elli M. Hydrochemistry of the nutrients. In: Atti del Convegno "Quality of the Po River waters during the 1990's". Ferrara 18-20 April. *Quad Ist Ric Acque* 1991;92:6.1-6.29.
74. Hopkins TS. Physical control of the eutrophic response in the northern Adriatic Sea, illustrated by a nitrogen budget from ELNA data. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3):355-63.
75. Gacic M, Artegiani A, Paschini E, Russo A, Scarazzato P. Long term changes of oceanographic conditions in the northern Adriatic. In: Hopkins TS, Artegiani A, Cauwet G, De Gobbis D, Malej A (Ed.). *The Adriatic Sea*. Brussels: European Commission. (Ecosystem Research Report, 32 EUR 18834). 1999.
76. Crisciani F, Ferraro S, Raicich F. Evidence of recent climatic anomalies at Trieste (Italy). *Clim Change* 1994;28:365-74.
77. Marchetti R. Algal blooms and gel production in the Adriatic Sea. In: Bart H, Fegan L (Ed.). *Eutrophication-related phenomena in the Adriatic Sea and in other Mediterranean coastal zones*. Brussels: CEC. *Water Poll Res Rep* 1990;16:21-42.
78. De Gobbis D, Fonda Umani S, Franco P, Malej A, Precali R, Smodlaka N. Changes in the northern Adriatic ecosystem and the hypertrophic appearance of gelatinous aggregates. *Sci Tot Environ* 1995; 165:43-58.
79. Stumm W, Morgan J. *Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. New York: Wiley Interscience; 1981 (2nd ed).
80. Alldredge AL, Gotschalk CC. Direct observations of the mass flocculation of diatom blooms: characteristics, settling velocities and formation of diatom aggregates. *Deep-Sea Res* 1989;36:159-71.
81. Alldredge AL, Passow U, Logan BE. The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Res I* 1993;40:1131.
82. Alldredge AL. The potential role of particulate diatom exudates in forming nuisance mucilaginous scums. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3):397-400.
83. De Gobbis D, Precali R, Ivancic I, Smodlaka N, Fucks D, Kveder S. Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *Int J Environ Poll* 2000;13(1-6):495-533.
84. Fonda Umani S, Franco P, Ghirardelli E, Malej A. Outline of oceanography and the plankton of the Adriatic Sea. In: Colombo G, Ferrari I, Ceccherelli VU, Rossi R (Ed.). *Marine eutrophication and population dynamics*. Fredensborg: Olsen & Olsen; 1992. p. 347-65.
85. Malej A, Harris RP. Inhibition of copepod grazing by diatom exudates: a factor in the development of mucus aggregates? *Mar Ecol Progr Ser* 1993;96:33-42.
86. Malej A. Gelatinous aggregates in the Northern Adriatic Sea. *Bull Inst Oceanogr* 1995;15:149-57.
87. Fajon C, Cauwet G, Lebaron P, Terzic S, Ahel M, Malej A, Mozetic P, Turk V. The accumulation and release of polysaccharides by planktonic cells and the subsequent bacterial response during a controlled experiment. *FEMS Microbiol Ecol* 1999;29:351-63.
88. Obernosterer I, Herndl GJ. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. *Mar Ecol Progr Ser* 1995; 116:247-57.
89. Thornton DCO, Santilli D, Thake B. Prediction of sporadic mucilaginous algal blooms in the Northern Adriatic Sea. *Mar Poll Bull* 1999; 38(10):891-8.
90. Kaltenbock E, Herndl GJ. Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the northern Adriatic Sea. IV. Dissolved nutrients and the autotrophic community associated with marine snow. *Mar Ecol Progr Ser* 1992; 87:147-59.
91. Pettine M, Passino R, Chiaudani G. Le mucillagini nei mari italiani. Dobbiamo ripensare la strategia anti-eutrofizzazione? *Inquinamento* 1992;9:54-64.

92. Monti M, Welker C, Fonda-Umani S. Effects of synthetic zeolite "A" and polycarboxylates on quality and quantity of diatom mucous exudates. *Chemosphere* 1996;32(9):1741-54.
93. Kujawinski EB, Farrington JW, Moffett JW. Evidence for grazing-mediated production of dissolved surface-active material by marine protists. *Mar Chem* 2002;77:133-42.
94. Passow U, Alldredge AL, Logan BE. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. *Deep-Sea Res* 1994;41:335-7.
95. Vojvodic V, Cosovic B. Fractionation of surface active substances on the XAD-8 resin: Adriatic Sea samples and phytoplankton culture media. *Mar Chem* 1996;54:119-33.
96. Bochdansky A, Herndl GJ. Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the Northern Adriatic Sea. V. role of fecal pellets in marine snow. *Mar Ecol Progr Ser* 1992;89:297-303.
97. Najdek M. Unusual changes of zooplankton fatty acid composition in the Northern Adriatic during the 1991 mucilage event. *Mar Ecol Progr Ser* 1997;159:143-50.
98. Long RA, Fandino LB, Steward GF, Del Negro P, Ramani P, Cataletto B, Welker C, Puddu A, Fonda Umani S, Funari E, Azam F. Microbial response to mucilage in the Gulf of Trieste. *EOS, Transact Am Geophys Union* 1998;99(1):63-4.
99. Riemann L, Steward GF, Azam F. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl Environm Microbiol* 2000;66(2):578-87.
100. Baldi F, Malej A, Minacci A, Milanesi C, Vignani R. Is diatom lysis in extensive mucilage of Adriatic Sea due to a viral infection? Abstract from *Algal virus workshop*, Bergen Norway, 14-15 June 1998. <http://www.fou.uib.no/fd/1998/f/414001>.
101. Zutic V, Svetlicic V. Interfacial processes. In: Wangersky P. (Ed.). *The Handbook of Environmental Chemistry* 2000; vol. 5 chap. 6 p.149-65.
102. Azam F, Fonda-Umani S, Funari E. Significance of bacteria in the mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35(3):411-9.
103. Azam F, Smith DC, Carlucci AF. Bacterial transformation and transport of organic matter in the southern California bight. *Progr Oceanogr* 1992;30:151-66.
104. Azam F, Smith DC, Steward GF, Hagstrom A. Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycle. *Microb Ecol* 1993; 28:167-79.
105. Azam F, Smith DC, Long RA, Steward GF. Bacteria in oceanic carbon cycling as a molecular problem. In: Joint I (Ed.). *Molecular ecology of aquatic microbes*. Berlin: Springer Verlag; 1995. (NATO ASI Series) G38. p. 39-54.
106. Chin W-C, Orellana MW, Verdugo P. Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature* 1998;391:568-72.
107. Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Progr Ser* 1983;10:257-63.
108. Azam F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickness. *Science* 1998;280:694-6.
109. Stumm W, Morgan JS. *Aquatic chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1995 (third ed.).
110. Koike I, Hara S, Terauchi K, Kogure K. Role of sub-micrometre particles in the ocean. *Nature* 1990;345:242-4.
111. Wells ML, Goldberg ED. Occurrence of small colloids in sea water. *Nature* 1991;353: 342-4.
112. Long RA, Azam F. Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat Microb Ecol* 1996; 10:213-21.
113. Wells ML, Goldberg ED. Colloids aggregation in seawater. *Mar Chem* 1993;41:353-8.
114. Wells ML, Goldberg ED. The distribution of colloids in the north Atlantic and Southern Ocean. *Limnol Oceanogr* 1994; 39(2):286-302.
115. Longhurst AR, Koike I, Li WKW, Rodriguez J, Dickie P, Kepkay P, Partensky F, Bautista B, Ruiz J, Wells ML, Bird DF. *Deep-Sea Res* 1992;39:1-7.
116. Zutic V, Plese T, Tomaic J, Legovic T. Electrochemical characterization of fluid vesicles in natural waters. *Mol Cryst Liq Cryst* 1984;113:131-45.
117. Logan BE, Passow U, Alldredge AL, Grossart HP, Simon M. Rapid formation and sedimentation of large aggregates is predictable from coagulation rates (half-lives) of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep-Sea Res II* 1995;42(1):203-14.
118. Ivošević N, Svetlicic V, Kovac S, Kraus R, Zutic V, Furic K. Bacterial and biophysical aspects of macroaggregation phenomena in the Northern Adriatic Sea. *Abstract from AGU Ocean Sciences Meeting*. San Diego February 9-13; 1998. <http://www.agu.org/meetings/waisos98.html>.
119. Zutic V, Legovic T. A film of organic matter at the fresh-water/sea-water interface of an estuary. *Nature* 1987;328:612-4.
120. Marty J-C, Zutic V, Precali R, Saliot A, Cosovic B, Smoldlaka N, Cauwet G. Organic matter characterization in the Northern Adriatic Sea with special references to the sea-surface microlayer. *Mar Chem* 1988;25(3):243-64.
121. Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61(1):47-64.
122. Pomeroy LR. The ocean's food web, a changing paradigm. *Biosci* 1974;24:499-504.
123. Pomeroy LR, Wiebe WJ, Deibel D, Thompson RJ, Rowe GY, Pakulski JD. Bacterial responses to temperature and substrate concentration during the Newfoundland spring bloom. *Mar Ecol Progr Ser* 1991;75:143-59.
124. Blackburn N, Fenchel T, Mitchell J. Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria. *Science* 1998;282:2254-6.
125. Bidle KD, Azam F. Accelerated dissolution of diatom silica by marine bacterial assemblages. *Nature* 1999;397:508-12.
126. Azam F, Smith DC. Bacterial influence on the variability in the ocean's biogeochemical state. A mechanistic view. In: Demers S (Ed.). *Particle analysis in oceanography*. Berlin: Springer Verlag; 1991. (NATO ASI Series, G27). p. 231-6.
127. Smith DC, Steward GF, Long RA, Azam F. Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Res II* 1995;42(1):75-97.

128. Brussaard CPD, Riegman R, Noordeloos AAM, Cadee GC, Witte H, Kop AJ, Nieuwland G, Van D'Uyl FC, Bak RPM. Effects of grazing, sedimentation and phytoplankton cell lysis on the structure of a coastal pelagic food web. *Mar Ecol Progr Ser* 1995;123:259-71.
129. Graneli E, Carlsson P, Turner JT, Tester PA, Bechemin C, Dawson R, Funari E. Effects of N:P:Si-ratios and zooplankton grazing on phytoplankton communities in the northern Adriatic Sea. I. Nutrient, phytoplankton biomass, and polysaccharide production. *Aquat Microb Ecol* 1999;18:37-54.
130. Martinez J, Smith DC, Steward GF, Azam F. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat Microb Ecol* 1996;10:223-30.
131. Smith DC, Simon M, Alldredge AL, Azam F. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 1992;359:139-42.
132. Cole JJ, Findlay S, Pace ML. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar Ecol Progr Ser* 1988;43:1-10.
133. Heissenberger A, Leppard GG, Herndl GJ. Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(12):4521-8.
134. Kiorboe T, Jackson GA. Marine snow, organic solute plumes and optimal chemosensory behaviour of bacteria. *Limnol Oceanogr* 2001;46(6):1309-18.
135. Herndl GJ, Faganeli J, Fanuko N, Peduzzi P, Turk V. Role of bacteria in the carbon and nitrogen flow between water-column and sediment in a shallow marine bay (Bay of Piran, northern Adriatic Sea). *PSZNI Mar Ecol* 1987; 8(3):221-36.
136. Manganelli M, Funari E, Scenati R, Azam F. DOC release and utilization by natural bacterial assemblages from Northern Adriatic Sea (Italy). *Abstract from 7th European Marine Microbiology Symposium*. Nordwijkerhout, The Netherlands, 17-22 September 2000. <http://www.nioz.nl/emms/abstracts.pdf>pg140.
137. Tanoue E, Nishiyama S, Kamo M, Tsugita A. Bacterial membranes-possible source of a major dissolved protein in seawater. *Geochim Cosmochim Acta* 1995;59(12):2643-8.
138. McCarthy MD, Hedges JI, Benner R. Major Bacterial Contribution to Marine Dissolved Organic Nitrogen. *Science* 1998; 281:231-4.
139. McCarthy M, Pratum T, Hedges J, Benner R. Chemical composition of dissolved organic nitrogen in the ocean. *Nature* 1997; 390:150-4.
140. Ammerman JW, Azam F. Bacterial 5'-Nucleotidase in aquatic ecosystems: a novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science* 1985;227:1338-40.