

ENZIMATSKA AKTIVNOST U PRIOBALNIM PODRUČJIMA POD UTJECAJEM ANTROPOGENOG OPTEREĆENJA ORGANSKOM TVARI

Kukoleča, Lena

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:120426>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

LENA KUKOLEČA

**ENZIMATSKA AKTIVNOST U PRIOBALNIM PODRUČJIMA
POD UTJECajem ANTROPOGENOG OPTEREĆENJA
ORGANSKOM TVARI**

ZAVRŠNI RAD

Rovinj, 2015.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

LENA KUKOLEČA

**ENZIMATSKA AKTIVNOST U PRIOBALNIM PODRUČJIMA
POD UTJECajem ANTROPOGENOG OPTEREĆENJA
ORGANSKOM TVARI**

ZAVRŠNI RAD

JMBAG: 70-ZM

Status: Redovni student

Kolegij: Ciklus hranjivih soli

Mentor: dr. sc. Ingrid Ivančić

Rovinj, 2015.

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Lena Kukoleča, kandidatkinja za prvostupnicu (baccalaurea) „Znanosti o moru“ ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava.

Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student: Lena Kukoleča

U Puli, 21. rujna. 2015.

Završni rad završetak je preddiplomskog studija „Znanost o moru“ pri Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli. Praktični dio rada je napravljen u Laboratoriju za morsku mikrobnu ekologiju Centra za istraživanje mora Instituta "Ruđer Bošković" u Rovinju.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija "Znanost o moru" imenovao je mentora završnog rada.

Mentor: dr.sc. Ingrid Ivančić

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: dr. sc. Mirjana Najdek

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Član: dr. sc. Tamara Đakovac

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Član: dr. sc. Maria Blažina

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Datum i mjesto obrane završnog rada: 21. rujna. 2015.; Centar za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju.

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Lena Kukoleča

ZAHVALA

Završni rad je izrađen u Laboratoriju za morsku mikrobnu ekologiju Centra za istraživanje mora Instituta „Ruđer Bošković“ u Rovinju.

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Ingrid Ivančić na prihvaćanju mentorstva, posvećenom vremenu i velikom trudu prilikom izrade završnog rada. Veliko hvala na strpljenju i stručnoj pomoći.

Zahvaljujem se svojim kolegama na pomoći tijekom studiranja, te prijateljima na potpori, podršci i razumijevanju.

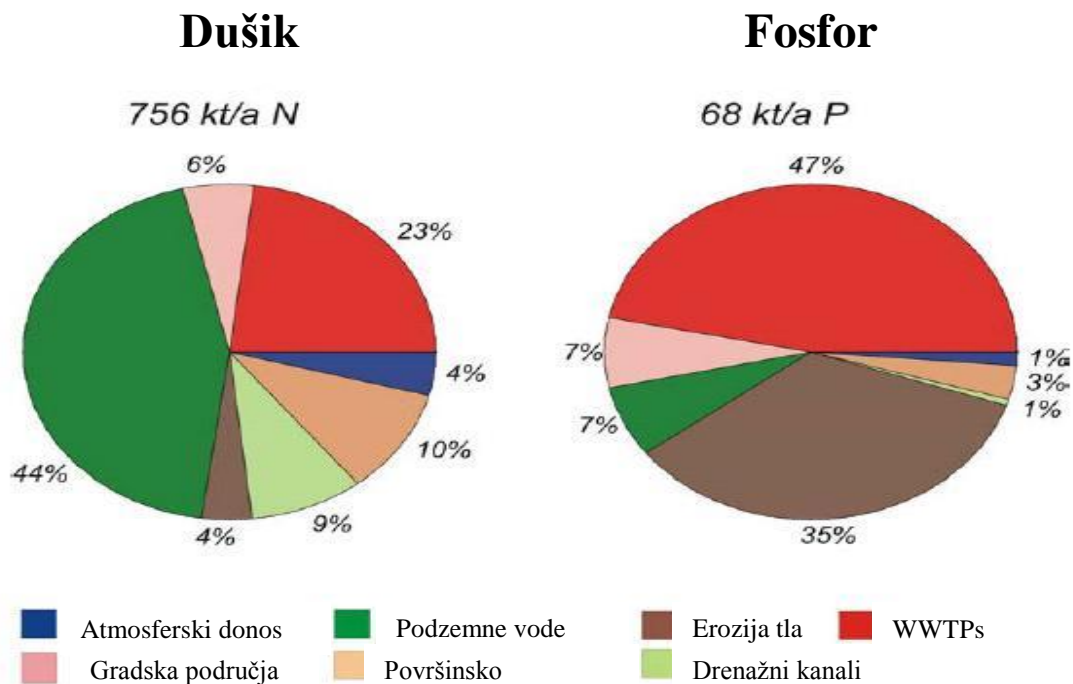
Iskreno hvala mojoj obitelji na strpljenju, podršci i neprestanom poticaju tijekom godina.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Unos organske tvari u ekosustav | 3 |
| 1.2. Enzimatska razgradnja organske tvari | 3 |
| 2. Metodika rada..... | 6 |
| 2.1. Lokacije i termini mjerenja..... | 6 |
| 2.1.1. Uvala Cuvi..... | 6 |
| 2.1.2. Uvala Valdibora | 7 |
| 2.2. Parametri istraživanja i metode | 8 |
| 3. REZULTATI I DISKUSIJA | 14 |
| 3.1. Uvala Cuvi..... | 14 |
| 3.2. Uvala Valdibora..... | 18 |
| 4. ZAKLJUČAK | 22 |
| 5. LITERATURA..... | 23 |
| 6. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | 29 |
| 7. BASIC DOCUMENTATION CARD | 30 |

1. UVOD

Priobalna područja izložena su velikom broju utjecaja, kako prirodnih tako i antropogenih. Ljudi također mogu drastično utjecati na ciklus dva vrlo važna elementa: dušika (N) i fosfora (P). Kroz razne aktivnosti, udvostručila se količina reaktivnog dušika koji kruži biosferom (Galloway et al., 2003; Hanke i Stroum 2010). Dok se fosfor nalazi u tlu u sastavu minerala. Raznim procesima kao što su korištenjem prirodnih rezervi, erozija tla, ispuštanje gradskog otpada te ispiranje poljoprivrednih površina i farma za uzgoj životinja, utrošena je količina unosa spojeva fosfora i dušika (Smil, 2000.).



Slika 1. Primjer unosa hranjivih soli iz različitih izvora na području rijeke Dunav (1998.-2000.)

Opterećenje sustava hranjivim tvarima dovelo je do širokog upropaštavanja obalnih ekosustava, s teškim dugoročnim posljedicama. Točnije, antropogenim unosom N i P u morski ekosustav često vodi ka stvaranju sluzavih nakupina „Cvjetanje mora“ ili povećanju stope proizvodnje ugljika i nakupljanja ugljika u morskim ekosistemima (Nixon, 1995.; Rabalais, 2004.). Osim toga, također može doći do gubitka podvodne vegetacije, cvjetanja štetnih algi, pomankanju kisika i stvaranju mrtvih zona (Diaz i Rosenberg, 2008.), pomoru bentičkih organizama te gubitka bioraznolikosti (Rabalais i Turner, 2001.). Nažalost, čak i nakon intervencija ne možemo biti

sigurni u povratak prvobitnog stanja ekosustava zbog konkurentnih promjena uključujući pomake u koncentraciji hranjivih tvari, promjeni iskoristivosti tla te lokalnih i globalnih socioekonomskih pritisaka (Duarte et al., 2009.). Na pojavu eutrofikacije u ekosustavu utječu razni čimbenici poput klimatskih promjena, neuravnotežnih smanjenja N i P te posljedice promjena u hranidbenom lancu, stoga se moraju poduzeti određene mjere opreza.

Na području Jadrana je, kao i na cijelom Mediteranu, u posljednjim desetljećima deterioracija priobalnog mora ljudskom djelatnošću postala globalni problem zbog rastuće urbanizacije koja je dovela do unosa zagađivala i opterećenja okoliša organskom tvari (Galois et al., 2000; Medeiros et al., 2005; Cornelissen et al., 2008). Na području grada Rovinja uvala Cuvi je pod utjecajem antropogenog onečišćenja porijeklom iz obližnjeg kolektora gradske kanalizacije. Uređaj za pročišćavanje u uvali Cuvi sagrađen je 1984 godine i prihvaća kanalizacijske i oborinske vode te vode iz septičkih jama iz većeg dijela rovinjskog područja. Otpadne vode prolaze kroz primarni stupanj obrade gdje se odstranjuju krutine, masti i pijesak. Zatim tretirane vode prolaze kroz retencijski bazen gdje dolazi do njihove aeracije prije nego što se ispuste u more na dubini od 27 m putem podmorske cijevi dužine 830 m. Tijekom zimskih mjeseci se u ovu plitku uvalu površine oko 2 km² slijeva oko 110 000 m³ otpadnih urbanih voda, dok u ljetnim mjesecima, zbog turističkih aktivnosti, dotok u prosjeku poraste do 180 000 m³. Uz unos teških metala i ostalih toksičnih tvari jedan od glavnih problema vezano uz ispušt otpadnih voda je prekomjeran unos organske tvari. Uvala Valdibora, smještena na sjevernoj strani grada Rovinja, proteže se od starogradske jezgre do ortopedske bolnice "Martin Horvat". Površina uvale iznosi oko 1,3 km² a dubine se kreću između 10 m i 18 m u većem dijelu uvale. Morsko dno je relativno homogeno, sastavljeno uglavnom od pijeska, s iznimkom istočne strane gdje su prisutne stijene većih dimenzija. Dubina uvale postepeno i ravnomjerno se povećava prema zapadu do najdublje točke na 23 m. Uvala Valdibora je izložena raznim vjetrovima, pogotovo buri, prema kojoj je dobila i ime, i jugozapadnjaku. Zbog toga ne koristi se kontinuirano za sidrene brodova. U uvali postoji nekoliko izvora kanalizacijskih voda. Najveća količina otpadnih voda (od 15 000 do 20 000 m³/mjesечно) dolazi iz tvornice za preradu ribe koja je smještena u jugoistočnom dijelu uvale. Na sjevernoj strani uvale, na oko 70 m od obale, nalazi se jedan od glavnih gradskih kanalizacijskih ispusta koji prima otpadne vode iz bolnice i bolničkog naselja te pridonosi oko 1000 m³ neobrađenih otpadnih voda mjesечно. Na istočnoj strani uvale nalazi se kanal kroz koji se dio oborinskih voda grada slijeva u more, dok u južnom dijelu uvale kraj gradske tržnice postoje nekoliko manjih ispusta kanalizacije.

1.1. Unos organske tvari u ekosustav

Otopljena organska tvar (DOM) predstavlja jednu od najvećih zaliha organskog ugljika na Zemlji (cca 700 Gt C) te ima ključnu biogeokemijsku ulogu u morskom ekosustavu (Hedges, 1992.). To je glavni izvor energije (ugljik) za heterotrofne bakterije (Carlson, 2002). DOM je složena smjesa molekula koja potječe iz raznovrsnih izvora kao što su izlučevine primarnih proizvođača, fitoplanktona, fotosintetskih makroalgi i bakterija, izlučevine tijekom njihove predacije, otpuštanje virusnom lizom stanica, donos sa kopna otpanjem i ispiranjem tla, te otpuštanjem iz sedimenta (Nagata, 2000.). Također može biti u velikoj mjeri unešena sa raznim antropogenim zagađivačima kao što su policiklički aromatski ugljikovodici (PAH-ovi), metali i pesticidi, što utječe na njihovu biodostupnost, transport i sudbinu u ekosustavu (Hirose, 2007.). Zbog njene kompleksnosti, samo 25% DOM-a je identificirano na molekularnoj razini (Benner, 2002.).

Unos prekomjerne količine organske tvari može modificirati ekosustav, kako u smislu povećanja produktivnosti, tako i u smislu promjena u odnosima unutar prehranbenog lanca (McLusky i Elliott, 2004). Zbog toga je na tom području od velike važnosti poznavanje efikasnosti razgradnje i recikliranja organske tvari.

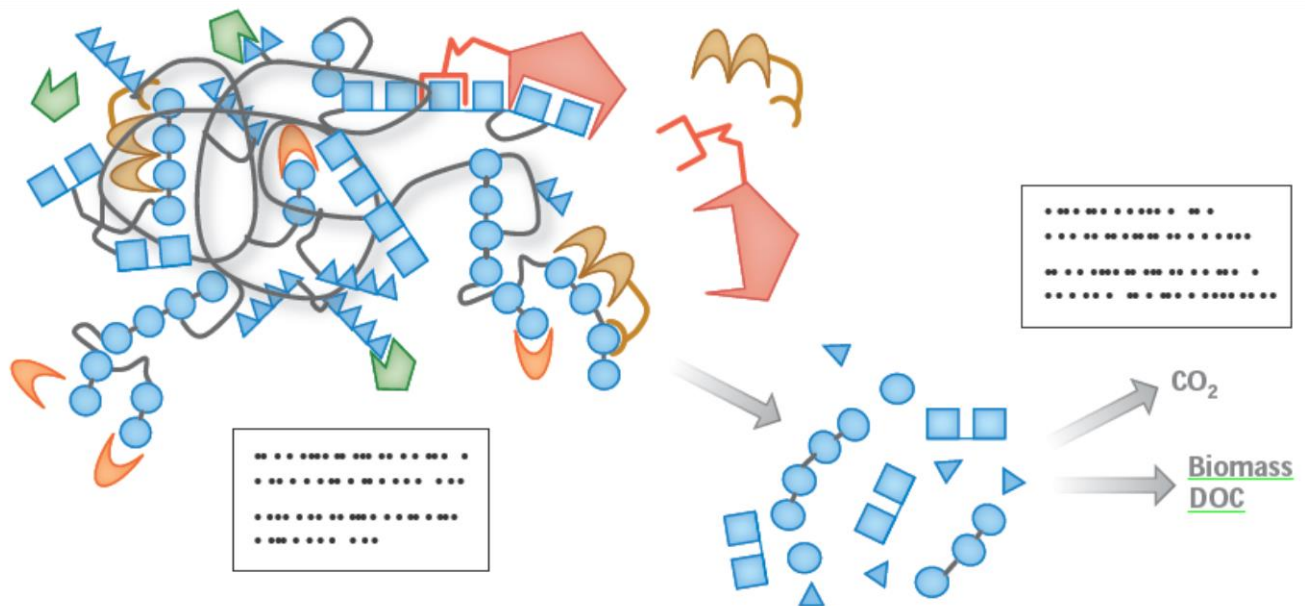
1.2. Enzimatska razgradnja organske tvari

Biološko recikliranje organske tvari započinje njezinim korištenjem i razgradnjom od strane mikroorganizama. U morskim ekosustavima je veliki dio organske tvari podložan bakterijskoj razgradnji, ali je većinom kompleksnog sastava, prevelikih molekula da bi ga bakterije izravno koristile, već prije toga dolazi do razgradnje makromolekula enzimima smještenim na vanjskoj opni stanice mikroorganizama (izvanstanični ili ekstracelularni enzimi). Zbog toga je izvanstanična razgradnja organskih polimera važan prvi korak u korištenju organske tvari te je važno poznavati kinetiku kao i sastav enzima koji u tome sudjeluju.

Ekstracelularni enzimi imaju glavnu ulogu u heterotrofnom mikrobnom kruženju ugljika. Upravo ti enzimi kataliziraju prvi korak u konverziji visokomolekularne tvari u supstrate koji su dovoljno mali (cca. 600 Da) (Weiss et al. 1991.) kako bi mogli biti transportirani u stanicu za daljnje korištenje. Dio ugljika je uključen u biomasu organizma, drugi dio je pretvoren

u obliku CO₂, dok treći dio ugljika biva obično izlučen u obliku DOCa (otopljeni organski ugljik) kao metabolički proizvod.

Aktivnost specifičnih mikrobnih izvanstaničnih enzima stoga utječe na sudbinu velikog dijela organske tvari proizvedene u morskim sistemima, odlučujući koji su supstrati spremni za pretvorbu i proces razgradnje te koji supstrati prolaze netaknuti kroz vodeni stupac i sediment.



Slika 2. Hidroliza visokomolekularne organske tvari (plavo) u mono- i oligomere slijedom izvanstaničnih enzima (narančasto, zeleno, zlatno, crveno)

Unatoč važnosti mikrobnja enzimatska razgradnja je do sada slabo istražena i vrlo ograničena (Gasol i sur., 1998; La Ferla i sur., 2001; Van Wambeke i sur., 2009.). Počevši od 1995., većina istraživanja provedena u Mediteranskim vodama fokusirale su se na određivanje aktivnosti tri enzima među najraširenijim u morskim okolišima, odnosno leucin aminopeptidaza (LAP), β-glukozidaza (β-GLU) i alkalna fosfataza (AP). LAP i β-GLU su uključene u razgradnju proteina i polisaharida stoga i u ciklusu ugljika. LAP, vrlo raširen enzim u morskim vodama, koji sintetiziraju bakterije, cijanobakterije, fitoplankton i zooplankton; uključen je u razgradnju određene tvari sastavljene od živućih organizama ili neživih materijala, kao što se fekalni peleti, itd. (Zancone i sur., 2002; Obayashi i sur., 2008.). Visoke razine aktivnosti aminopeptidaze su obično zabilježene na površinskim slojevima, uglavnom radi zaliha labilnih, svježe proizvedenih, organskih supstrata (Caruso i sur., 2000.). Čestice koje sadržavaju proteine obilne su u moru,

posebno u obalnim vodama jer su proteini ogromni dio biogene organske tvari (Long, R.A., 1996.) β -GLU je enzim specifičan za hidrolizu celobioze, sadržane u polimerima kao što su celuloza i mukopolisaharidi, β -GLU vrijednosti su često povezane s biomasom stanica i partikularnim organskim ugljikom (POC), koji su supstrati za te enzime (Zancone i sur., 2002. i 2004.). Taj enzim se često povezuje s heterotrofnim bakterijama, iako zooplankton također posjeduje takvu aktivnost (Chrost, R. J., 1990.). Alkalna fosfataza je enzim koji hidrolizira estersku vezu između fosfata i organske molekule, te pretvara organski fosfor u fosfat koji je dostupan stanicama za asimilaciju (Cembella et al., 1984a). Ima značajnu ulogu u recikliranju organskog fosfora. AP predstavlja ključni enzim u prirodnom okolišu, budući da obnavlja P kao otopljeni anorganski ortofosfat iz fosfoestera (Jones, R. D., 1997.). Uz bakterije i fitoplankton, fototrofni prokarioti i protozoa također mogu doprinijeti slobodno otopljenoj AP u moru (Hoppe, H. G., 2003.). AP je obično inducibilan enzim, sintetiziran pri niskim razinama PO_4 i potisnut kada je PO_4 dostupan. Međutim, bakterije također mogu koristiti AP i za opskrbu organskim ugljikom kao odgovor na nedostatnu dostupnost koncentracije organskog ugljika (Hoppe, H.G., 1999.).

Uz navedeno efikasno recikliranje organskog ugljika, zašto je važno razumjeti specifičnost mikrobnih izvanstaničnih enzima? Enzimatska hidroliza je početni korak ka remineralizaciji, hidrolizi. Osim što utječe na sastav remineralizirane organske tvari utječe na raspodjelu hranjivih tvari kao i na biodostupnost supstrata ugljika iz drugih organizama. Vrijeme razgradnje dobiveno iz enzimatskih aktivnosti smatra se mjerom recikliranja i dostupnosti organske tvari za mikrobijalne potrebe (Manini i sur., 2003; Caruso i sur., 2005), te njen daljnji prijenos kroz trofički lanac i govori nam o sposobnosti promatranog ekosustava da apsorbira unesenu tvar. Poznavanje tih procesa ključno je jer kontrolira potrošnju kisika i regeneraciju hranjivih soli (Goñi i sur., 2003), procesa koji izravno utječu na pojave kao što su eutrofikacija i promjene u sastavu životnih zajednica u plitkim priobalnim područjima (Boyes i Elliott, 2006).

2. Metodika rada

2.1. Lokacije i termini mjerenja

2.1.1. Uvala Cuvi

U ovoj studiji procijenjen je utjecaj otpadnih voda na obalno područje koje se koristi za rekreacijske i turističke aktivnosti u akvatoriju grada Rovinja. U tu svrhu su tijekom 2013.-2014. godine provedena istraživanja na tri postaje (Slika 2.):

C0: postaja direktno izložena otpadnim vodama koja predstavlja jako onečišćeno područje i mjeru količine unesene organske tvari u ekosustav akvatorija.

C5_{NW}: postaja 500 m sjeverozapadno od ispusta (prema obali) koja služi za procjenu utjecaja otpadne vode na akvatorij u bližem području obale koje se koristi za rekreacijske i turističke aktivnosti.

RV001: referentna postaja koja nije pod direktnim utjecajem gradskog fekalnog onečišćenja, i služi da bi se procijenili prirodni uvjeti u akvatoriju Rovinja.



Slika 3. Područje istraživanja s označenim postajama uzorkovanja tijekom 2013.-2014. godine.

2.1.2. Uvala Valdibora

Uvala Valdibora, smještena na sjevernoj strani grada Rovinja, proteže se od starogradske jezgre do ortopedске bolnice "Martin Horvat". Površina uvale iznosi oko 1,3 km² a dubine se kreću između 10 m i 18 m u većem dijelu uvale. U uvali postoji nekoliko izvora kanalizacijskih voda

„Bolnica“ - (Postaje B0, B1, B2 BP) Na sjevernoj strani uvale, na oko 70 m od obale nalazi se jedan od glavnih gradskih kanalizacijskih ispusta koji prima otpadne vode iz bolnice i bolničkog naselja te pridonosi oko 1000 m³ neobrađenih otpadnih voda mjesečno.

„Oborinske vode“ – (Postaje OB, VB) Na istočnoj strani uvale nalazi se kanal kroz koji se dio oborinskih voda slijeva u more.

„Mirna“ – (Postaje M0, M1, M2) Iz tvornice za preradu ribe koja je smještena u jugoistočnom dijelu uvale ulazi u morski ekosustav najveća količina otpadnih voda (15 000-2000 m³/mjesečno).

„Tržnica“ – (Postaje G0, G1, G2) U južnom dijelu uvale kraj gradske tržnice postoje nekoliko manjih ispusta kanalizacije.



Slika 4. Područje istraživanja s označenim postajama tijekom kolovoza 2014. i veljače 2015.

2.2. Parametri istraživanja i metode

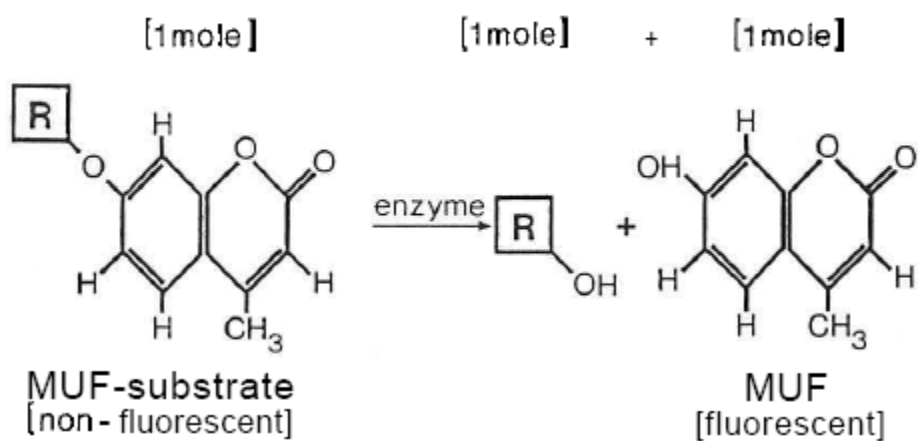
Temperatura, salinitet i zasićenje kisikom su određivani pomoću sonde SBE. Morska voda uzorkovana je Niskinovim crpcima.

Otopljeni organski ugljik (DOC; mjera otopljene organske tvari). Uzorci za određivanje otopljenog organskog ugljika (mjera otopljene organske tvari) filtrirani su kroz Whatman GF/F filtre (promjer pora 0.7 μm) žarene na 400 °C (da bi se uklonila organska tvar). Uzorci za analizu otopljenog organskog ugljika (DOC) konzervirani su do mjerenja dodatkom HgCl_2 (0.1ml koncentracije 2g l⁻¹ u 22 ml filtrata) i mjereni unutar mjesec dana.

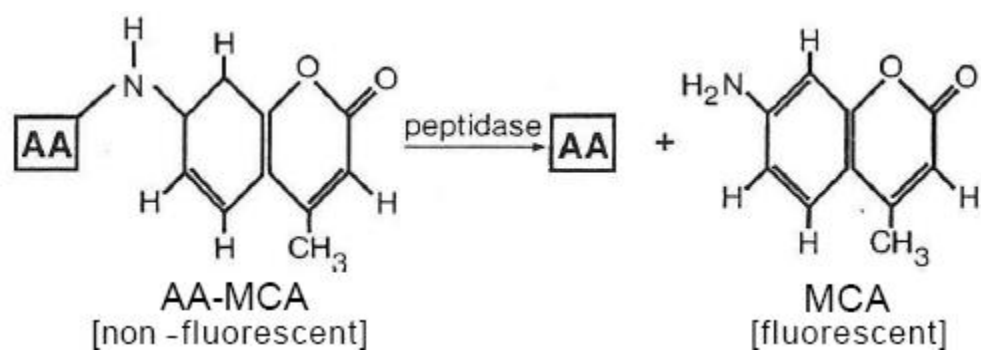
POC je određen pomoću TOC-VCPH (Shimadzu) carbon analyzer-a s platinskim i silicijevim katalizatorom, uz nedisperzivni infracrveni (NDIR) detektor za određivanje CO_2 .

Partikulatni organski ugljik (POC; mjera partikularne organske tvari). Za određivanje partikulatne organske tvari filtrirana je 1 l uzorka na žarenim Whatman GF/F filtrima (da bi se uklonila organska tvar) koji su do analize čuvani na -80°C. **POC** je određen pomoću čvrstog modula SSM-5000A priključenog na Shimadzu TOC-VCPH carbon analyzer, kalibriranog s glukozom.

Enzimatske aktivnosti određivane su fluorimetrijski pomoću fluorogenih supstrata pri koncentracijama zasićenja prema metodama Hoppe (1983) i Hoppe i sur. (1988). Za određivanje **aktivnosti alkalne fosfataze** (APA; razgrađuje organske fosforne spojeve) korišten je metillumbeliferil fosfat završne koncentracije u uzorku 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$. **Aktivnosti α -D i β -D glukozi daze** (α - i β - Glu; razgrađuju polisaharide) određivane su pomoću 4-metillumbeliferil- α -D-glukozid i 4- metillumbeliferil - β -D-glukozid završne koncentracije 25 $\mu\text{mol l}^{-1}$. **Aktivnosti aminopeptidaze** (AMA; razgrađuje proteine) određivane su pomoću L-leucin-4-metilkumarinil-7-amid završne koncentracije 250 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Otopine svih supstrata su pripremljene u celosolvu u sterilnim epruvetama i do upotrebe čuvane na -30°C. Neposredno prije upotrebe supstrati su razrijeđeni vodom na potrebnu koncentraciju. Mjerenja se temelje na činjenici da supstrat za pojedine enzime na daje mjerljivu fluorescenciju, dok produkt koji nastaje uslijed enzimatske aktivnosti fluoresceira (Slika 5.).



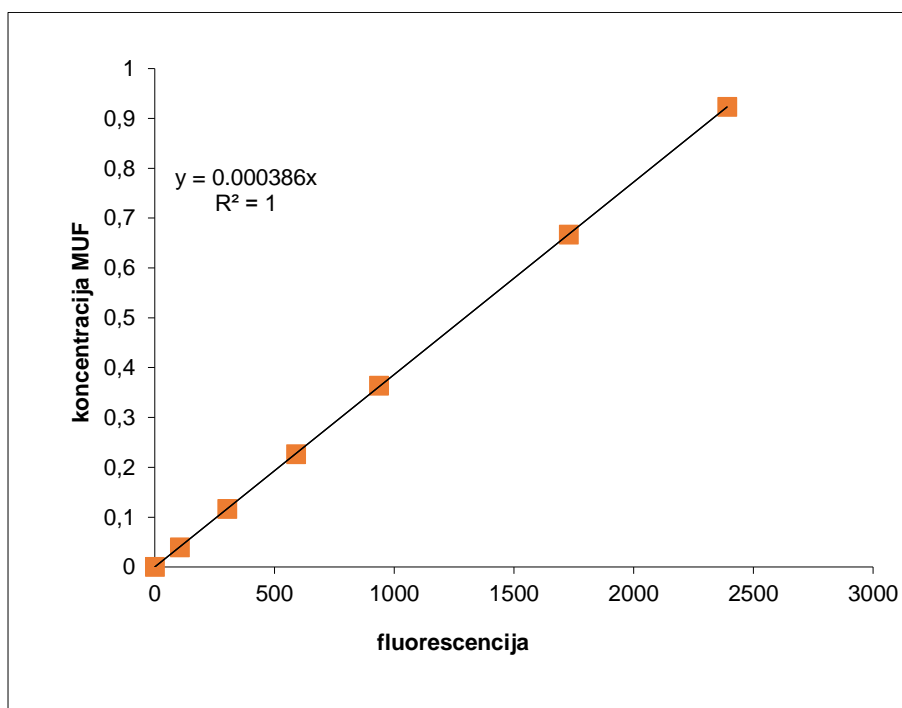
R=PO₄, α- i β- α -D-glukozid



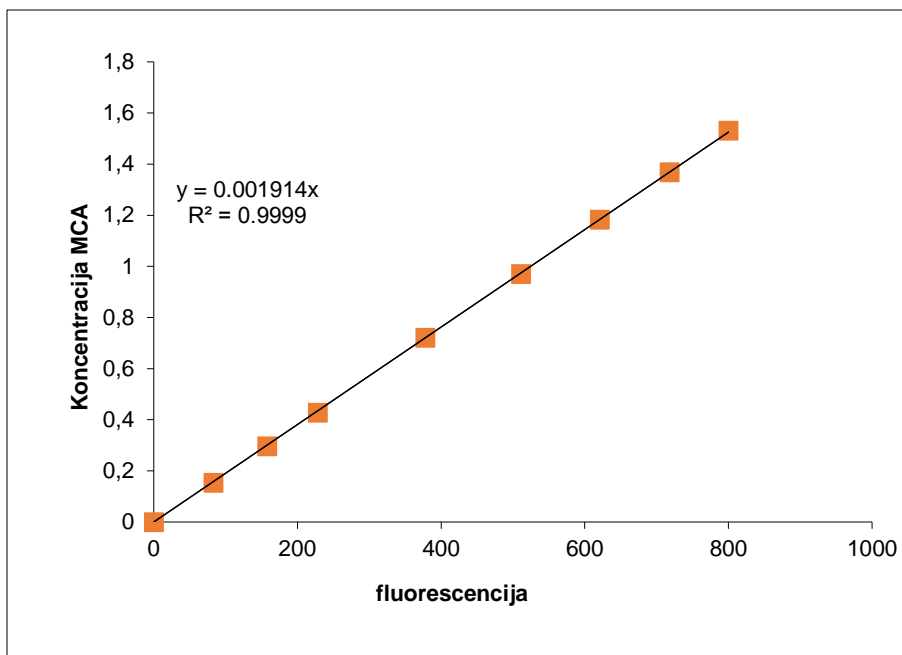
AA-protein

Slika 5. Enzimatska razgradnja supstrata za određivanje

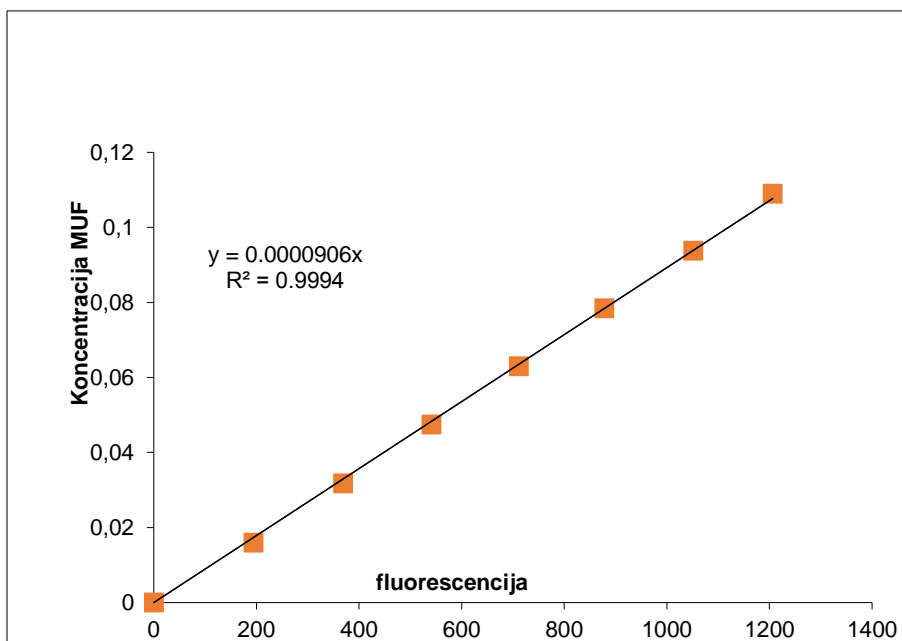
Enzimatske aktivnosti su određivane odmah nakon prikupljanja uzoraka. Prije određivanja uzorci su profiltrirani kroz mrežicu od 200 μm da bi se uklonio zooplankton i onemogućila predacija fitoplanktona i bakterija. Svo suđe upotrijebljeno za određivanje enzima je sterilizirano u autoklavu. Za određivanje svih enzimatskih aktivnosti pipetom s sterilnim tipsom uzet je alikvot od 5 ml uzorka i stavljen u sterilnu kivetu, dodano je 200 μl substrata slijedećih koncentracija: za APA 1.3 mmol l^{-1} , za α - i β - Glu 0.65 mmol l^{-1} ; za AMA 2.60 mmol l^{-1} , da bi se dobile gore navedene završne koncentracije. Uzorci su nakon dodatka supstrata inkubirani (oko 0.30-3 h) u mraku na *in situ* temperaturi i pH. Fluorescencija je mjerena na TDR fluorimetru odmah nakon dodatka supstrata, te nakon inkubacije. Za određivanje APA i α - i β - Glu korištena je ekscitacija od 365 nm i emisija na 460 nm, dok je za AMA korištena ekscitacija od 380 nm i emisija na 440 nm. Za svaki enzim je fluorimetar kalibriran u različitom rasponu vrijednosti. Aktivnost enzima izračunata je iz razlike fluorescencije prije i poslije inkubacije podijeljenom s vremenom inkubacije i pomnoženom s faktorom konverzije. Faktor konverzije izračunat je pomoću različitih koncentracija završnog razgradnog produkta supstrata (MUF-4- metilumbeliferon; za APA, α - i β - Glu) i MCA- 4- metilkumarinil7-amid; za AMA). Kalibracione krivulje za pojedine enzime prikazane su na slikama.



Slika 6. Kalibracijski pravac za APA-e

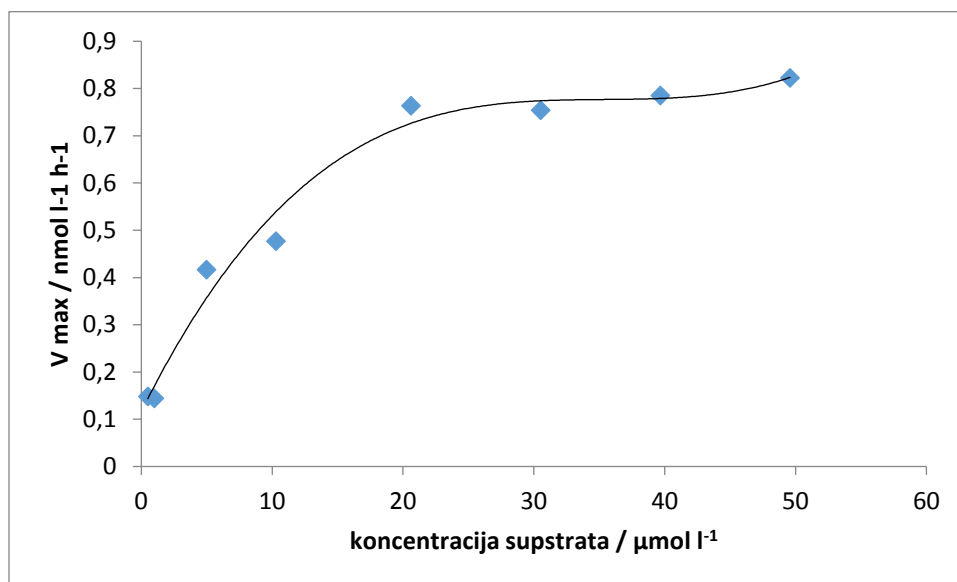


Slika 7. Kalibracijski pravac za AMA-e

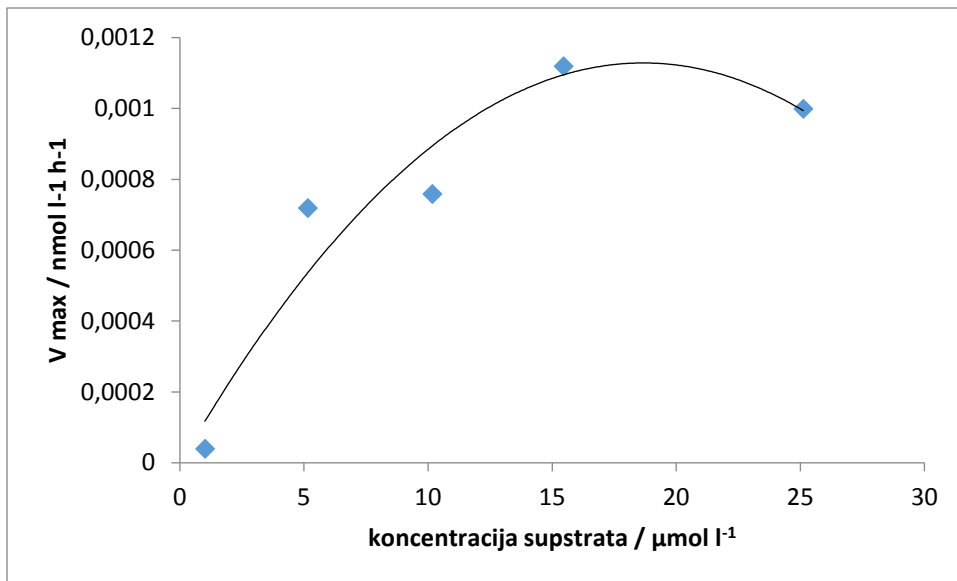


Slika 8. Kalibracijski pravac za Glu

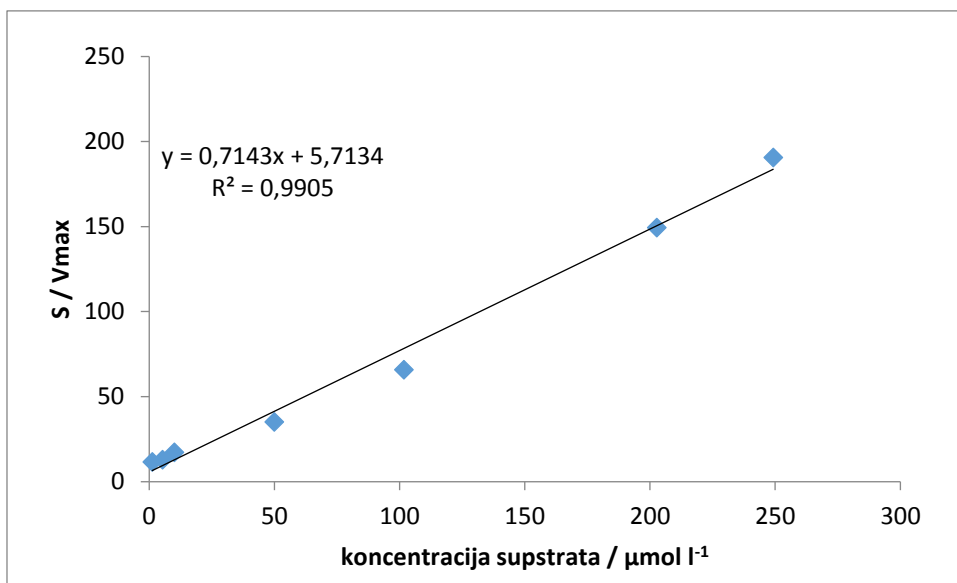
Za izračunavanje **vremena razgradnje** organske tvari mjerenja enzimatskih aktivnosti izvršena su na 6-8 koncentracija supstrata ($0.5-50 \mu\text{mol l}^{-1}$ za APA; $0.5-25 \mu\text{mol l}^{-1}$ za α - i β -GLU, te $1-250 \mu\text{mol l}^{-1}$ za AMA). Polusaturacijska konstanta (K_m) i maksimalna aktivnost (V_{max}) za pojedine enzime izračunati su Michaelis Menton-ove krivulje (Slika 9. I 10.) i Lineweaver–Burk-ovom linearizacijom (Slika 11.). Vrijeme razgradnje (turnover time; T) izračunat je kao K_m / V_{max} (Labry et al. 2005).



Slika 9. Michaelis-Mentonova krivulja APA-e



Slika 10. Michaelis-Mentonova krivulja L-glu

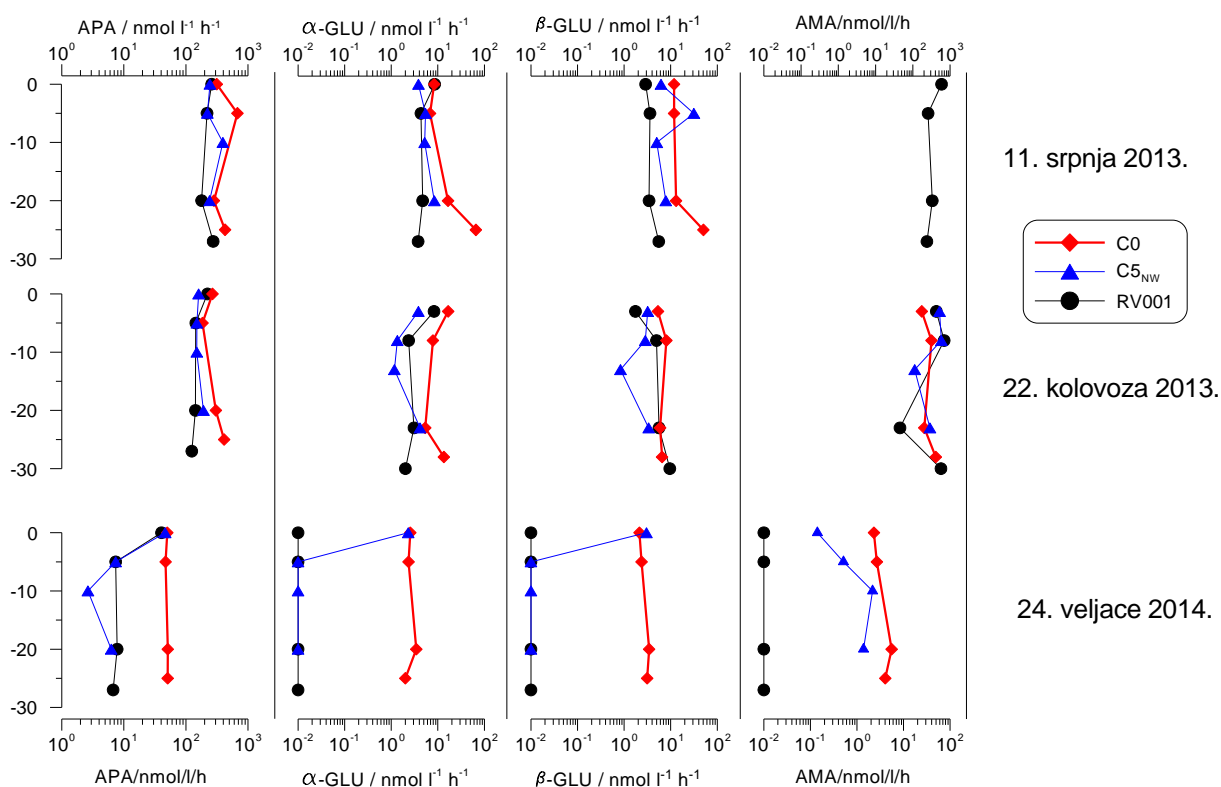


Slika 11. Lineweaver-Burk-ova linearizacija AMA-e

3. REZULTATI I DISKUSIJA

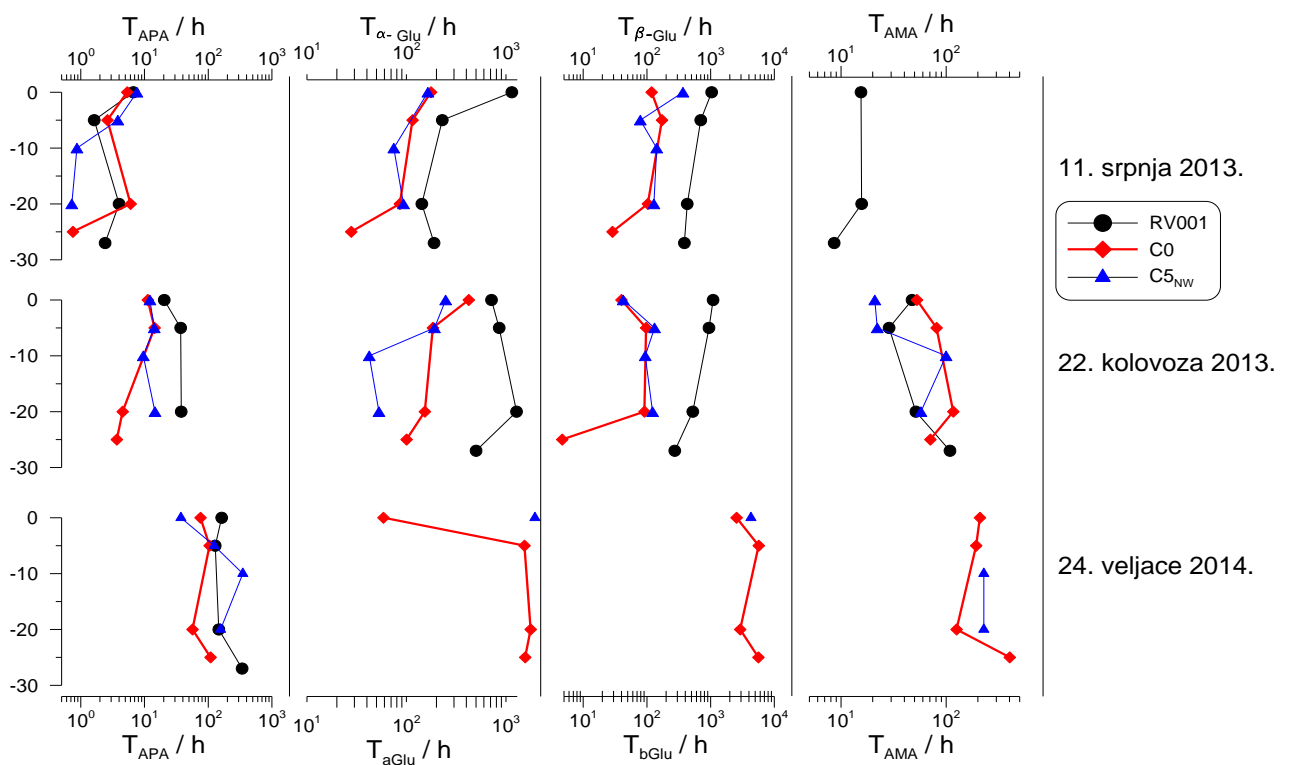
3.1. Uvala Cuvi

Na tom području je izrazito povišenje α - i β -glukozidaze ($16.6-65.9 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$, odnosno $13.0- 50.5 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$) zabilježeno u srpnju ispod termokline, dok su na kontrolnoj postaji vrijednosti bile višestruko niže ($3.8-8.5 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$, odnosno $2.9-5.6 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$). Povišene vrijednosti zabilježene su i za alkalnu fosfatazu ($427.7 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$, u odnosu na kontrolnu postaju $274.6 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$). To ukazuje da je na tom području dolazilo do brze razgradnje unesene organske tvari.



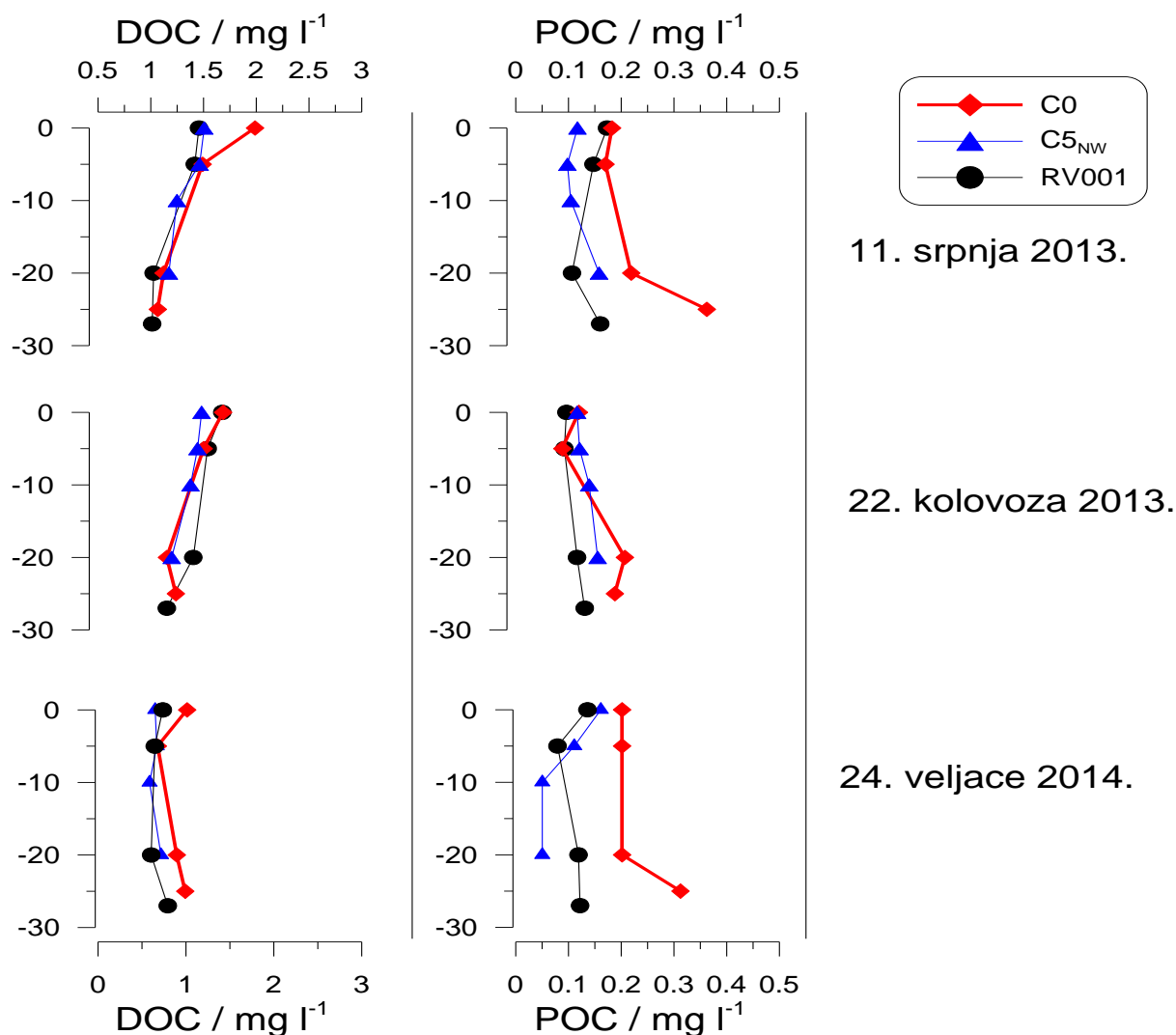
Slika 12. Raspodjela enzimatske aktivnosti (alkalna fosfataza APA; ; α -glukozidaza α -GLU; β -glukozidaza β -GLU i aminopeptidaze AMA) na istraživanim postajama tijekom 2013.-2014.

Na mjestu ispusta je ispod termokline vrijeme razgradnje polisaharida iznosilo oko 28-100 h, dok je na kontrolnoj postaji to vrijeme iznosilo oko 300-1300 h. Vrijeme razgradnje organskog fosfora je bilo vrlo kratko (0.75-6 h). Kratko vrijeme razgradnje organskog fosfora zabilježeno je i na referentnoj postaji, ali iz različitog razloga. Dok je na referentnoj postaji to bilo uzrokovano izrazitom limitacijom mikrobne zajednice fosforom, na području ispusta visoke koncentracije ortofosfata ukazuju da nije bilo limitacije tim elementom, već da je to bila posljedica povećanog dotoka organske tvari.



Slika 13. Vrijeme razgradnje organske tvari putem ekstracelularnih enzima (organskog fosfora T_{APA} ; polisaharida $T_{\alpha-GLU}$ i $T_{\beta-GLU}$; te proteina T_{AMA}) na istraživanim postajama tijekom 2013.-2014.

Na postaji 500 m od ispusta su enzimatske aktivnosti bile niže nego na području ispusta, ali je i na toj postaji vrijeme razgradnje organske tvari bilo znatno kraće nego na kontrolnoj postaji i slično kao na području ispusta, što ukazuje da je i to područje pod djelomičnim utjecajem dotoka organske tvari. U kolovozu su vrijednosti enzimatske aktivnosti na mjestu ispusta bile niže nego u srpnju, jer je zbog djelomičnog miješanja dolazilo do preraspodjele organske tvari u cijeli vodeni stupac. I u tom mjesecu je vrijeme razgradnje organske tvari u uvali Cuvi bilo znatno brže nego na kontrolnoj postaji, te se unesena organska tvar nije nagomilavala u vodenom stupcu tog područja. U veljači su enzimatske aktivnosti na području ispusta bile znatno niže nego ljeti, ali još uvijek značajne, dok su na kontrolnoj postaji bile na granici mjerljivosti metode. Znatno niže aktivnosti nego tijekom ljeta djelomično su posljedica znatno niže temperature (enzimatska aktivnost ovisi o temperaturi), a djelomično preraspodjele organske tvari kroz vodeni stupac zbog miješanja. Naime u veljači su enzimatske aktivnosti bile 2-5 puta niže nego u kolovozu kada je također došlo do preraspodjele organske tvari u vodenom stupcu, što se može pripisati razlici u temperaturi (oko 10 °C). To ukazuje da je enzimatska razgradnja organske tvari važna i tijekom zime.

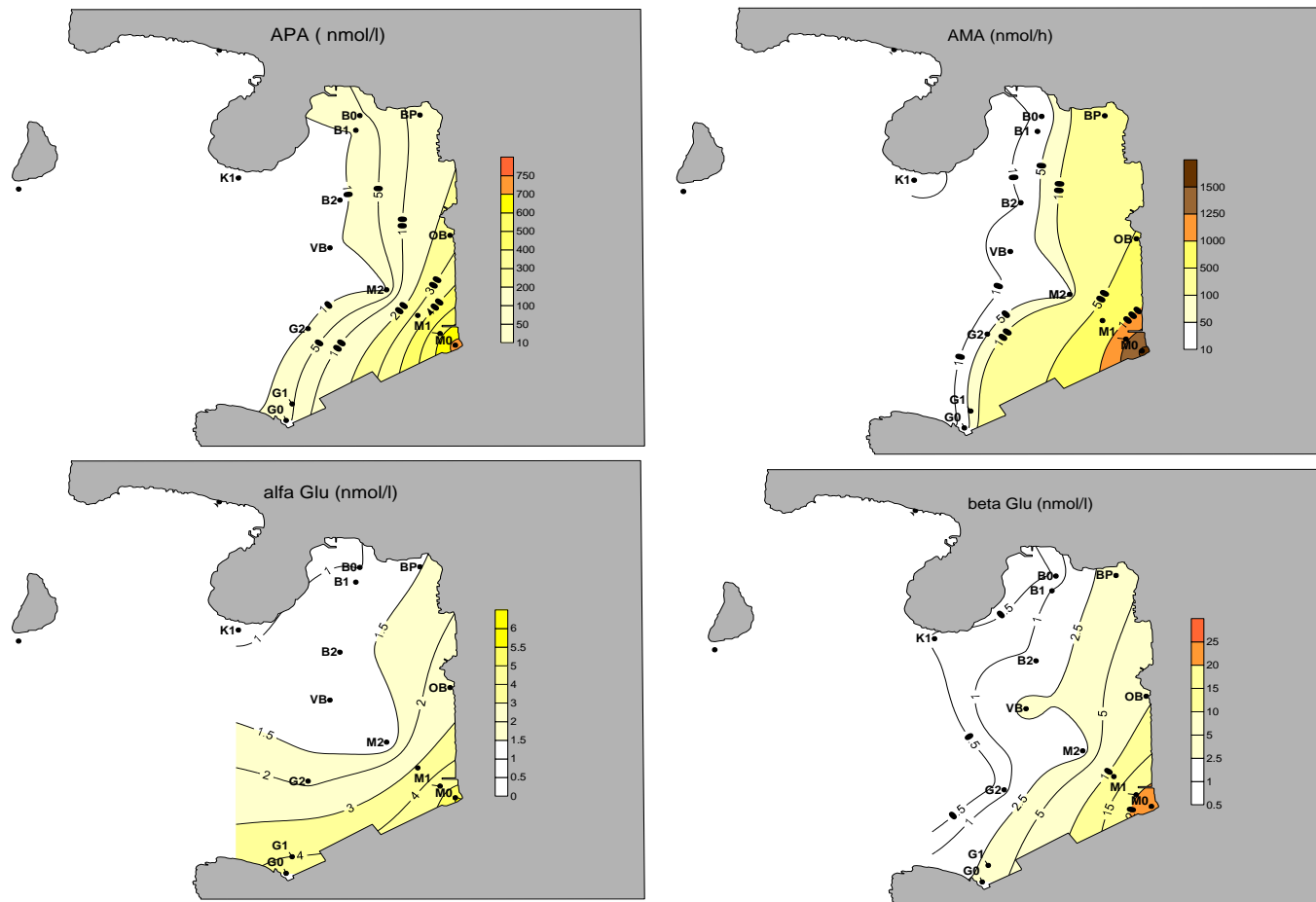


Slika 14. Raspodjela otopljene (DOC) i partikularne (POC) organske tvari na istraživanim postajama u uvali Cuvi tijekom 2013.-2014.

Iznad termokline na području ispusta, kao niti na postaji 500 m od ispusta nije zabilježeno značajnije povećanje POCa u odnosu na referentnu postaju. Na području ispusta su i zimi koncentracije POCa u cijelom vodenom stupcu bile dvostruke nego na kontrolnoj postaji i na postaji 500 m od ispusta. Usprkos tome što su koncentracije POCa na području ispusta bile visoke, na području uvale Cuvi nije zabilježeno značajnije povišenje koncentracije otopljene organske tvari (DOC; mjera ukupno unesene otopljene organske tvari) niti u ljetnim niti u zimskim mjesecima. Koncentracije DOCa na postaji kod ispusta su u cijelom vodenom stupcu (0.98-2.00 $\mu\text{g l}^{-1}$) bile slične kao i na kontrolnoj postaji i u granicama prirodne varijabilnosti rovinjskog akvatorija.

3.2. Uvala Valdibora

U veljači 2015. su enzimatske aktivnosti ispusta bile znatno niže nego ljeti, ali još uvijek značajne. Niže aktivnosti nego tokom ljeta djelomično su posljedica znatno niže temperature jer je enzimatska aktivnost ovisna o temperaturi, no i povećana ljudska aktivnost tokom ljeta (turističke i rekreacijske aktivnosti) koje utječu na unos organske tvari u ekosustav.



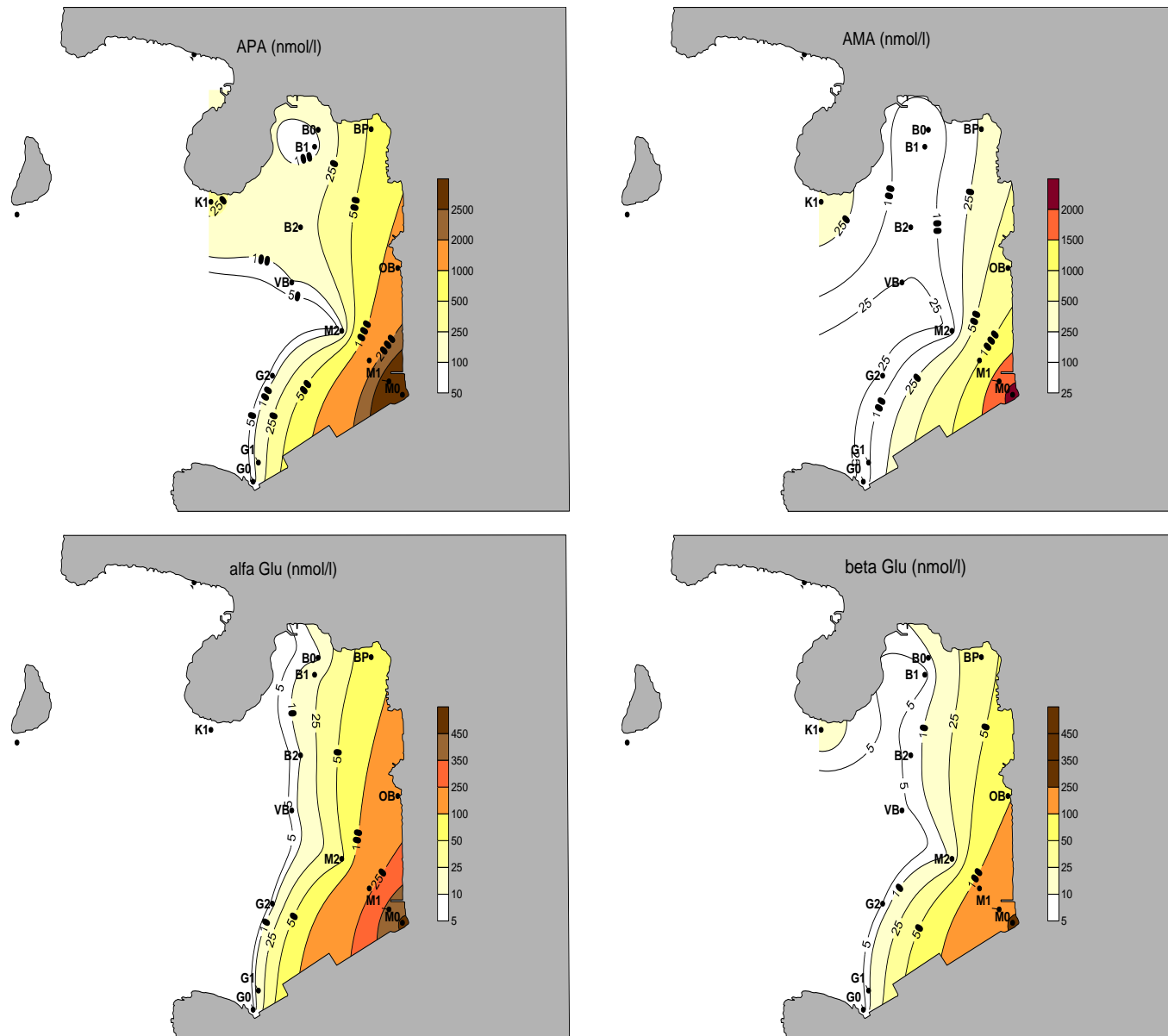
Slika 15. Raspodjela enzimatske aktivnosti (alkalna fosfataza APA; α -glukozidaza α -GLU; β glukozidaza β -GLU i aminopeptidaze AMA) na istraživanim postajama u uvali Valdibora tijekom veljače 2015.

| station | Tapa | Taglu | Tbglu | Tama |
|-----------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| M0 | 5,8475 | 544 | 383 | 5,71 |
| M2 | 454,7600 | 4195 | 19946 | 361,49 |
| VB | 631,3600 | 1727 | 181876 | 374,0 |
| K1 | 140,0000 | 1997 | 9998 | 420,20 |
| G0 | 113,2200 | 1083 | 1274 | 944,77 |
| G2 | 463,4600 | 15222 | 8014 | 639,23 |
| B2 | 2941,1000 | 2960 | 27544 | 1469,80 |
| B1 | 369,250 | 3594 | 22374 | 683,33 |
| B0 | 72,1180 | 2363 | 1692 | 1439,0 |

Tablica 1. Vrijeme razgradnje organske tvari putem ekstracelularnih enzima (organskog fosfora T-APA; polisaharida T α -GLU i T β -GLU; te proteina T-AMA) na istraživanim postajama tijekom veljače 2015.

Tijekom veljače 2015. najveća enzimatska aktivnost zabilježena je kod enzima AMA. Na samom ispustu tvornice Mirna (postaja M0) enzimatska aktivnost AMAe je iznosila 1500 nmol/l, što je ujedno i najviša aktivnost, dok su na ostalim postajama vrijednosti bile za red veličine niže. Enzimatska aktivnost APAe koja je također povišena iznosila je 750 nmol/l na ispustu Mirne (M0), dok na ostalim postajama koje su udaljene od samog ispusta vrijednosti enzimatske aktivnosti su značajno niže. α -GLU i β -GLU aktivnosti su bile znatno niže u odnosu na druge mjerene enzime.

Na mjestu ispusta (Postaje M0, G0 i B0) tijekom veljače 2015. vrijeme razgradnje polisaharida (Taglu i Tbglu) je iznosilo od 300-1300h, dok na ostalim postajama to vrijeme je bilo znatno više. Vrijeme razgradnje organskog fosfora je bilo vrlo kratko od 5- 120h, dok je razgradnja proteina (Tama) iznosila na postaji M0 5,71h što je jedino značajnije vrijeme od ostalih istraživanih postaja. Najviše zabilježeno vrijeme razgradnje organskih spojeva je bilo na sljedećim postajama: B2, G2 I VB koje nisu pod velikim opterećenjem donosom organske tvari.



Slika 16. Raspodjela enzimatske aktivnosti (alkalna fosfataza APA; α -glukozidaza α -GLU; β -glukozidaza β -GLU i aminopeptidaze AMA) na istraživanim postajama u uvali Valdibora tijekom ljeta (kolovoz 2014).

| station | T _{APA/h} | T _{αglu/h} | T _{βglu/h} | T _{AMA/h} |
|---------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| G0 | 58,4 | | | |
| G2 | 32,3 | | | |
| VB | 28,1 | | | |
| B0 | 68,1 | 292 | 157 | 616 |
| B0 | 35,7 | | | |
| B2 | 13,0 | 391 | 141 | |
| K1 | 15,4 | 660 | 115 | 66 |
| M0 | 1,1 | 9 | 57 | 7 |
| M0 | 13,5 | 8 | 20 | 161 |
| M2 | 32,5 | 81 | 542 | |
| K2 | 0,0 | 68 | 317 | 303 |

Tablica 2. Vrijeme razgradnje organske tvari putem ekstracelularnih enzima (organskog fosfora T_{APA}; polisaharida T_{α-GLU} i T_{β-GLU}; te proteina T_{AMA}) na istraživanim postajama tijekom kolovoza 2014.

Tijekom kolovoza 2014., enzimatske aktivnosti APAe na ispustu Mirne su bile najviše te su iznosile 2500 nmol/l. No, znatno povišene vrijednosti su detektirane još na postajama M1 (2000 nmol/l), te OB (1000 nmol/L). Na ostalim postajama enzimatske aktivnosti APAe su bile za red veličine niže. Dok je izmjerena aktivnost AMAe iznosila 2000 nmol/l na ispustu Mirne, te su još značajne aktivnosti zabilježene na postajama M1 (1000 nmol/l) i OB (500-1000 nmol/l). Izrazito povišenje α-GLU i β-GLU aktivnosti (250-450 nmol/l) zabilježeno je u kolovozu te su izmjerene vrijednosti znatno više u odnosu na zimu.

Na mjestu ispusta tijekom kolovoza vrijeme razgradnje polisaharida (T_{αglu} i T_{βglu}) je bilo najniže na postaji M0 8h za T_{αglu}, te 57h za T_{βglu}. Ostale vrijednosti na drugim postajama su bile za red veličine više. Najkraće vrijeme razgradnje proteina (T_{ama}) izmjereno je na postaji M0 i iznosilo je 7h. Što se tiče organskog fosfora, najkraća vremena razgradnje su bila na sljedećim postajama: M0, K1 i B2. Vrijeme razgradnje na postaji M0 iznosilo je 1,1h što je ujedno i najkraće vrijeme svih mjenjenih enzima.

4. ZAKLJUČAK

- Tijekom zime enzimatske aktivnosti su znatno niže nego ljeti što je djelomično posljedica znatno niže temperature, a djelomično preraspodjele organske tvari kroz vodeni stupac zbog miješanja. Utjecaj turizma također doprinosi povećanom unosu organske tvari u ekosustav tijekom ljeta.
- Povišene enzimatske aktivnosti su detektirane na samom području ispusta.
- Tijekom ljeta su te vrijednosti na području ispusta puno više, no enzimatska razgradnja organske tvari važna je i tijekom zime.
- Vrijeme razgradnje organske tvari putem izvanstaničnih enzima je bilo najkraće u neposrednoj blizini ispusta. Najviša enzimatska aktivnost i najkraće vrijeme razgradnje dobiveno je na području ispusta tvornice „Mirna“.

5. LITERATURA

Benner R. Chemical composition and reactivity. In: Hansell DA, Carlson CA, editors. *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. New York: Academic Press; 2002. p. 59–90.

Boyes, S., Elliott, M., 2006. Organic matter and nutrient inputs to the Humber Estuary, England. *Marine Pollution Bulletin* 53, 136–143.

Carlson CA. 2002. Production and removal processes. In *Biogeochemistry of Dissolved Organic Matter*, ed. DA Hansell, CA Carlson. San Diego: Academic

Carol Arnosti (2011.); Microbial Extracellular Enzymes and the Marine Carbon Cycle. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2011. 3:15.1–15.25.

Caruso, G.; Zaccone, R. (2000.); Estimates of leucine aminopeptidase activity in different marine and brackish environments. *J. Appl. Microb.*, 89, 951–959.

Caruso, G., Monticelli, L., Azzaro, F., Azzaro, M., Decembrini, F., La Ferla, R., Leonardi, M., Zaccone, R., (2005.); Dynamics of extracellular enzymatic activities in a shallow Mediterranean ecosystem (Tindari ponds, Sicily). *Marine and Freshwater Research* 56, 173–188.

Cembella, A. D., Antia, N.J and Harrison, P. J. (1984.); The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective. Part 2. *Critical reviews in Microbiology*, 65: 3205-3212.

Chrost, R.J. (1990.); Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In *Aquatic Microbial Ecology : Biochemical and Molecular Approaches*; Overbeck, J., Chrost, R.J., Eds.; Brock/Springer: New York, NY, USA, 1990; pp. 47–78.

Cornelissen, G., Pettersen, A., Nesse, E., Eek, E., Helland, A., Breedveld, G.D., (2008.); The contribution of urban runoff to organic contaminant levels in harbour sediments near two Norwegian cities. *Marine Pollution Bulletin* 56, 565–573. the macrobenthic community in Rapallo Harbour (Ligurian Sea, Italy). *Scientia Marina* 71 (4), 705–714.

Cristina Misic*, Anabella Covazzi Harriague (2009.); Organic matter characterisation and turnover in the sediment and seawater of a tourist harbour. *Marine Environmental Research* 68, 227–235.

Diaz, R.J., Rosenberg, R., (2008.); Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321, 926–929.

Duarte, C.M., Conley, D.J., Carstensen, J., Sanchez-Camacho, M., 2009. Return to Neverland: shifting Baselines Affect Eutrophication Restoration Targets. *Estuaries and Coasts* 32, 29–36.

Gabriella Caruso (2010.); Leucine Aminopeptidase, β -Glucosidase and Alkaline Phosphatase Activity Rates and Their Significance in Nutrient Cycles in Some Coastal Mediterranean Sites. *Mar. Drugs*, 8, 916-940; doi:10.3390/md8040916.

Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J.,(2003.); The nitrogen cascade. *BioSciences* 53, 341–356.

Gasol, J.M.; Doval, M.D.; Pinhassi, J.; Calderon-Paz, J.I.; Guixa-Bouixareu, N.; Vaqué, D.; Pedrós-Alió, C. Diel (1998.); Variations in bacterial heterotrophic activity and growth in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1998**, 164, 107–124.

Goñi, M.A., Teixeira, M.J., Perkey, D.W.,(2003.); Sources and distribution of organic matter in a 20 river-dominated estuary (Winyah Bay, SC, USA). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57, 1023–1048.

Hanke, A., Strous, M., (2010.); Climate, fertilization, and the nitrogen cycle. *Journal of Cosmology* 8, 1838–1845.

Hedges JI. (1992.); Global biogeochemical cycles: progress and problems. *Mar. Chem.* 39:67–93

Hirose K.(2007.); Metal-organic matter interaction: ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Appl Geochem* 2007;22:1636–45.

Hans-Georg Hoppe (2003.); Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia* 493: 187–200.

Hoppe, H.-G. & S. Ullrich, (1999.) Profiles of ectoenzymes in the Indian Ocean: phenomena of phosphatase activity in the mesopelagic zone. *Aquat. Microb. Ecol.* 19: 129–138.

Hans-Georg Hoppe (1993.); Use of Fluorogenic Model Substrates for Extracellular Enzyme Activity (EEA) Measurement of Bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, chapter 48.

Hans-Georg Hoppe,* Sang-Jin Kim, Klaus Gocke (1988.); Microbial Decomposition in Aquatic Environments: Combined Process of Extracellular Enzyme Activity and Substrate Uptake. *Applied And Environmental Microbiology*, Mar., P. 784-790.

Ingrid Ivančić,* Jelena Godrijan, Martin Pfannkuchen, Daniela Marić, Blaženka Gašparović, Tamara Djakovac, and Mirjana Najdek (2012.); Survival mechanisms of phytoplankton in conditions of stratification-induced deprivation of orthophosphate. Northern Adriatic case study, *Limnol. Oceanogr.*, 57(6), 1721–1731.

Jones, R.D. (1997.); Phosphorus cycling. In *Manual of Environmental Microbiology*; Hurst, C.J., Ed.; ASM Press: Washington, DC, USA; pp. 343–348.

Long, R.A.; Azam F. (1996.); Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 10, 213–221.

La Ferla, R.; Zaccone, R.; Caruso, G.; Azzaro, M. (2001.); Enzymatic activities and carbon flux through the microbial compartment in the Adriatic Sea. In *Structure and Processes in the Mediterranean Ecosystems*; Faranda, F.M., Guglielmo, L., Spezie, G., Eds.; Springer-Verlag: Milan, Italy; Chapter 61, pp. 485–493.

Nixon, S.W., (1995.); Coastal marine eutrophication – a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41, 199–219.

Manini, E., Fiordelmondo, C., Gambi, C., Pusceddu, A., Danovaro, R., (2003.); Benthic microbial loop functioning in coastal lagoons: a comparative approach. *Oceanologica Acta* 26, 27–38.

Marc Tedetti, Pascale Cuet, Catherine Guigue, Madeleine Goutx (2011.); Characterization of dissolved organic matter in a coral reef ecosystem subjected to anthropogenic pressures (La Réunion Island, Indian Ocean) using multi-dimensional fluorescence spectroscopy. *Science of the Total Environment* 409, 2198–2210.

Nagata T. (2000.); Production mechanisms of dissolved organic matter. In: Kirchman DL, editor. *Microbial Ecology of the Oceans*. New York: Wiley-Liss, p. 121–52.

Obayashi, Y.; Suzuki, S.(2008.); Occurrence of exo- and endopeptidases in dissolved and particulate fractions of coastal seawater. *Aquat. Microb. Ecol.*, 50, 231–237.

R.W. Fulweiler, N.N. Rabalais, A.S. Heiskanen (2012.); The eutrophication commandments. *Marine Pollution Bulletin* 64, 1997–1999.

Rabalais, N.N., Turner, R.E., (2001.); Coastal Hypoxia: Consequences for Living Resources and Ecosystems. *Coastal and Estuarine Studies* American Geophysical Union, Washington, DC, p. 454.

Rabalais, N.N., (2004.); Eutrophication. In: Robinson, A.R., McCarthy, J., Rothschild, B.J. (Eds.), *The Global Coastal Ocean: Multiscale Interdisciplinary Processes, The Sea*. Harvard University Press, Boston, MA, pp. 819–865.

Smil, V., 2000. Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences. *Annual Review of Energy and the Environment* 25, 53–88

Tomislav Radić, Ingrid Ivančić, Dragica Fuks & Jadranka Radić (2006.); Marine bacterioplankton production of polysaccharidic and proteinaceous particles under different nutrient regimes. DOI:10.1111/j.1574-6941.2006.00176.x.

Van Wambeke, F.; Ghiglione, J.F.; Medoma, J.; Mével, G.; Raimbault, P. Bottom up effects on bacterioplankton growth and composition during summer-autumn transition in the open NW Mediterranean Sea. *Biogeoscience* **2009**, 6, 705–720.

Zaccone, R.; Caruso, G. (2002.); Microbial hydrolysis of polysaccharides and organic phosphates in the Northern Adriatic Sea. *Chem. Ecol*, 18, 85–94.

Zaccone, R.; Caroppo, C.; La Ferla, R.; Zampino, D.; Caruso, G.; Leonardi, M.; Maimone, G.; Azzaro, M.; Sitran, R. (2004.); Deep-chlorophyll maximum time series in a transitional area of the Augusta Gulf (Sicily): Part III, microbial community structures and functions. *Chem. Ecol.*, 20 (suppl. 1), S267-S284.

Weiss MS, Abele U, Weckesser J, Welte W, Schiltz E, Schulz GE. (1991.); Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 254:1627–30

6. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ- ZNANOST O MORU

ENZIMATSKA AKTIVNOST U PRIOBALNIM PODRUČJIMA POD UTJECAJEM ANTROPOGENOG OPTEREĆENJA ORGANSKOM TVARI

SAŽETAK

U ovoj studiji procijenjen je utjecaj otpadnih voda na obalno područje akvatorija Rovinja koje se koristi za rekreacijske i turističke aktivnosti. U tu svrhu provedena je karakterizacija organske tvari i brzina njene razgradnje. Koncentracije partikularne organske tvari kod samog ispusta bile su znatno više nego na kontrolnoj postaji i više od uobičajenih za rovinjski akvatorij. Povišene vrijednosti enzimatske aktivnosti i time relativno brzo vrijeme razgradnje sprječavale su nagomilavanje unesene organske tvari u vodenom stupcu tog područja. Povišene enzimatske aktivnosti su detektirane na samom području ispusta. Tijekom ljeta su te vrijednosti na području ispusta puno više, no enzimatska razgradnja organske tvari važna je i tijekom zime. Vrijeme razgradnje organske tvari putem izvanstaničnih enzima je bilo najkraće u neposrednoj blizini ispusta. Najviša enzimatska aktivnost i najkraće vrijeme razgradnje dobiveno je na području ispusta tvornice „Mirna“. Tijekom zime enzimatske aktivnosti su znatno niže nego ljeti što je djelomično posljedica znatno niže temperature, a djelomično preraspodjele organske tvari kroz vodeni stupac zbog miješanja. Dio partikularne tvari sedimentira čime se povećava sadržaj organske tvari u sedimentu.

7. BASIC DOCUMENTATION CARD

JURJA DOBRILA UNIVERSITY OF PULA

UNIVERSITY UNDERGRADUATE STUDY PROGRAMME- MARINE SCIENCE

ENZYMATIC ACTIVITY IN COASTAL WATERS INFLUENCED BY ANTHROPOGENIC INPUT OF ORGANIC MATTER

ABSTRACT

In this study, the influence of waste waters on the coastal environment of Rovinj aquatorium used for recreational and touristic activities was estimated. For that purpose, a characterization of the organic matter and the speed of its dissolution was conducted. Concentration of the particulate organic matter during the actual release was significantly higher than those at the control station and more than usual for Rovinj aquatorium. Increased values of enzymatic activities and a relatively fast time of the dissolution stopped the amounting of the inserted organic matter in the water column of that area. Increased enzymatic activities are detected on the its release area. During the summer, these values at the area are much higher, but enzymatic dissolution of organic matter is important even during the winter. Time of the organic matter dissolution via extracellular enzymes was the shortest in the vicinity of the release. Highest enzymatic activity and the shortest time of the dissolution was recorded at the release area of factory „Mirna“. During the winter, enzymatic activities are significantly lower than those during the summer which is partially a consequence of significantly lower temperatures, and partially because of the division of the organic matter through the water column mixing. Part of the particulate matter sedimentates which increase the amount of the organic matter in the sediment.

