

Mikrobna zajednica u lokvama jugozapadne Istre i u bočatoj močvari Palud

Nikolić, Lucia

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:137:637347>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Fakultet prirodnih znanosti

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

LUCIA NIKOLIĆ

**MIKROBNA ZAJEDNICA U LOKVAMA JUGOZAPADNE ISTRE I U
BOČATOJ MOČVARI PALUD**

Završni rad

Pula, srpanj 2021.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Fakultet prirodnih znanosti

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

LUCIA NIKOLIĆ

**MIKROBNA ZAJEDNICA U LOKVAMA JUGOZAPADNE ISTRE I U
BOČATOJ MOČVARI PALUD**

Završni rad

JMBAG: 0303084066

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: doc. dr. sc. Paolo Paliaga

Komentor: mag. biol. Neven Iveša

Pula, srpanj 2021.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana LUCIA NIKOLIĆ, kandidatkinja za prvostupnicu ZNANOSTI O MORU ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega 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.

Studentica: Lucia Nikolić

U Puli, _____2021. godine



IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, LUCIA NIKOLIĆ dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj Završni rad pod nazivom „Mikrobna zajednica u lokvama jugozapadne Istre i u bočatoj močvari Palud“ koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, _____2021. godine

Potpis

ZAHVALA

Zahvaljujem se svom mentoru i profesoru doc.dr.sc. Paolu Paliagi na neizmjernej podršci, strpljenju, ukazanom povjerenju te pomoći tijekom terenskog i laboratorijskog rada te samog pisanja.

Zahvaljujem se komentoru mag.biol. Nevenu Iveši na pomoći tijekom terenskog rada, na konstantnoj motivaciji te na ogromnoj količini prenesene pozitivne energije.

Ovim putem se također zahvaljujem Centru za invazivne vrste Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču, javnoj ustanovi Natura Histrica te Zavodu za javno zdravstvo Istarske županije na divnoj suradnji.

Zahvaljujem se svojim kolegama na podršci, kolegijalnosti te svim lijepim emocijama i uspomenama tijekom svih godina studiranja.

Zahvaljujem se svim profesorima Fakulteta prirodnih znanosti te vanjskim suradnicima na prenesenom znanju i iskustvima.

Zahvaljujem svim članovima komisije na sugestijama za poboljšanje ovoga rada.

Na posljetku se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima čija podrška i ljubav me uvijek gurala naprijed.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled literature.....	1
2.1 Sanitarna kakvoća vode.....	1
2.2 Indikatori fekalnog onečišćenja.....	5
2.2.1 Ukupni koliformi (UK).....	6
2.2.2 Fekalni koliformi (FK).....	6
2.2.3 Fekalni streptokoki (FS).....	6
2.3 Autohtona mikrobna zajednica	7
2.3.1 Heterotrofni prokarioti.....	7
2.3.2 Heterotrofni nanoflagelati	7
2.3.3 Cijanobakterije	8
3. Ciljevi.....	9
4. Materijali i metode.....	9
4.1 Opis lokacija.....	9
4.1.1 Barbariga	9
4.1.2 Greco	10
4.1.3 Palud	10
4.1.4 Cocaletto.....	11
4.1.5 Cisterna	12
4.1.6 Pili.....	13
4.2 Uzorkovanje.....	14
4.3. <i>In situ</i> mjerenja.....	14
4.4 Fizikalno-kemijske analize.....	14
4.4.1 Biološka potrošnja kisika (BOD ₅).....	14
4.4.2 Analiza nutrijenata.....	15
4.5. Biološke analize	17
4.5.1 Mikrobna zajednica	17
4.5.2 Fekalni indikatori	17
4.5.3 Klorofil a.....	18
5. Rezultati	18
5.1 Fizikalno-kemijske parametri vode	18
5.1.1 Temperatura vode	19
5.1.2 Salinitet	20
5.1.3 Prozirnost vode.....	21

5.1.4 Otopljeni kisik (DO) u vodama (saturacija).....	22
5.1.5 BOD5.....	23
5.1.6 pH.....	24
5.2 Mikrobiološke analize.....	24
5.2.1 Autohtona mikrobna zajednica.....	24
5.2.2 Fekalni indikatori (FIB) i sanitarna kvaliteta vode.....	28
5.2.3 Klorofil a.....	32
5.3 Hranjive soli.....	33
5.3.1 Fosfat.....	34
5.3.2 Nitrit.....	35
5.3.3 Nitrat.....	36
5.3.4 Amonijak.....	37
5.3.5 Silikat.....	38
6. Diskusija.....	39
7. Zaključci.....	43
8. Popis literature.....	45
9. Popis slika.....	49
10. Popis tablica.....	50

1. Uvod

Na istarskom se poluotoku nalazi više od tisuću kraških lokvi i nekoliko močvara. Zajedno s četiri male rijeke i akumulacijskim bazenom, one čine jedine površinske slatke vode u regiji. Ta malena vodna tijela općenito su umjetna ili djelomično modificirana od strane ljudi koji su se na njih oslanjali kroz povijest, uglavnom za poljoprivredne i stočarske djelatnosti (Heatwole i Wilkinson, 2015). Lokve i močvare u prošlosti su također predstavljale problem za ljudsko zdravlje pogodujući razmnožavanju komaraca i difuziji malarije te su stoga početkom 20. stoljeća masovno tretirane insekticidima ili umjetno povezane s morem (Radošević, 2013). U današnje vrijeme lokve su često napuštene i sklone degradaciji zbog neodržavanja i rasta vegetacije (Heatwole i Wilkinson, 2015). Štoviše, u njima se često nakupljaju poljoprivredne i urbane vode, a s time i mikrobiološka i kemijska onečišćenja.

Površinska vodna tijela na području Sredozemlja ključna su za opstanak okolne kopnene flore i faune. Uz to, djeluju kao žarišta vodene biološke raznolikosti koja pružaju jedino utočište raznim endemskim vrstama (Céréghino i sur. 2007) i veoma su bitna za ptice selice koje imaju ključnu ulogu u umrežavanju ekosustava te se tako doprinosi očuvanju biološke raznolikosti južne Europe (Zacharias i Zamparas, 2010).

Na plitka jezera, lokve i močvare značajno utječu globalne klimatske promjene koje rezultiraju glavnim parametrima iscrpljenosti ekosustava, tj. smanjenjem biološke raznolikosti i zamućenosti vode (Špoljar i sur., 2018). Većina stajaćih slatkih voda na svijetu je plitka (duboka 3 m ili manje) i značajna je u pogledu varijabilnosti staništa s iznimnom ekološkom važnošću, tj. bioraznolikost, mikroklima, mrijest riba, gniježđenje ptica (Špoljar i sur., 2018). Veće fluktuacije čimbenika okoliša, tj. temperature, otopljenog kisika, hranjivih tvari, izobilja prehrambenih resursa i prisutnost potopljene, iznikle ili plutajuće vodene vegetacije karakteriziraju lokve, plitka jezera i močvare (Špoljar i sur., 2011). Sprječavaju resuspendiranje sedimenta, a time i dinamiku hranjivih tvari, a mnogim organizmima nude sklonište od grabežljivaca.

2. Pregled literature

2.1 Sanitarna kakvoća vode

Sanitarna kakvoća vode definira se prisustvom patogenih mikroorganizama dospjelih u neko vodeno stanište unosom otpadnih voda, donosom rijeka, ispiranjem

tla, itd. Također, na taj način omogućuje se procjena potencijalnog rizika zaraze unesenim patogenima (Krstulović i Šolić, 2006).

Analizirane vode ne koriste se direktno za kupanje i rekreaciju te, zbog nepostojanja definiranih sanitarnih kriterija za vodena tijela toga tipa, za procjenu sanitarne kakvoće vode korišteni su standardi za morski okoliš kako bi se izmjereni podaci mogli usporediti s postojećima. Standardi kakvoće vode za kupanje i rekreaciju regulirani su Zakonom o vodama (NN 66/19) i EU direktivom o upravljanju kakvoćom vode za kupanje (br. 2006/7/EZ). Mikrobiološki pokazatelji koji se prate su crijevni enterokoki i *Escherichia coli*. Granične vrijednosti su propisane Tablicama 1. i 2.

Prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 153/09), propisane su granice vrijednosti fekalnih koliforma i fekalnih streptokoka u vodama koje se koriste za kupanje i rekreaciju. Vrijednosti su prikazane u Tablici 3.

Tablica 1. Standardi za ocjenu kakvoće vode nakon svakog ispitivanja.

Pokazatelj	Kakvoća	
	Izvrсна	Dobra
Crijevni enterokoki (bik/100 ml)	≤ 200	≤ 400
<i>Escherichia coli</i> (bik/100 ml)	≤ 500	≤ 1000

bik – broj izraslih kolonija

Tablica 2. Standardi za ocjenu kakvoće voda na kraju sezone kupanja i za tri prethodne sezone kupanja.

Pokazatelj	Kakvoća			
	Izvrсна	Dobra	Zadovoljavajuća	Nezadovoljavajuća
Crijevni enterokoki (bik/100 ml)	≤ 200*	≤ 400*	≤ 330**	> 300**

<i>Escherichia coli</i> (bik/100 ml)	≤ 500*	≤ 1000*	≤ 900**	> 900**
---	--------	---------	---------	---------

* - temeljeno na vrijednosti 95-og percentila

** - temeljeno na vrijednosti 90-og percentila

Tablica 3. Granične vrijednosti emisija pročišćenih komunalnih otpadnih voda koje se ispuštaju u površinske vode, a koje se koriste za kupanje, rekreaciju i referentne metode ispitivanja (NN, 2009).

Pokazatelji	Mjerna jedinica	Granične vrijednosti		Referentne metode ispitivanja
		Kopnene površinske vode	Priobalne vode	
Koliformne bakterije	broj u 100 ml	10 000	2 000	HRN EN ISO 9308-1:2000
Koliformne bakterije fekalnog podrijetla	broj u 100 ml	2 000	500	HRN EN ISO 9308-1:2000
Streptokoki fekalnog podrijetla	broj u 100 ml	400	200	HRN EN ISO 7899-2:2000

Uredbom o standardu kakvoće voda (NN, 2019) propisuje se standard kakvoće voda za površinske vode uključujući i priobalne vode i vode teritorijalnog mora te podzemne vode, posebni ciljevi zaštite voda, kriteriji za utvrđivanje ciljeva zaštite voda, uvjeti za produženje rokova za postizanje ciljeva zaštite voda, elementi za ocjenjivanje stanja voda, monitoring stanja voda i izvještavanje o stanju voda. Stanje površinskih voda (u ovom slučaju prijelaznih voda) određuje se na temelju ekološkog i kemijskog stanja tijela ili skupine tijela površinskih voda, dok se ekološko stanje ocjenjuje u

odnosu na biološke, hidromorfološke te osnovne fizikalno-kemijske i kemijske elemente koji prate biološke elemente. Također, kemijsko stanje ocjenjuje se u odnosu na pokazatelje kemijskog stanja. Na umjetna i znatno promijenjena tijela površinskih voda primjenjuju se elementi za ocjenjivanje stanja onih prirodnih tijela površinskih voda koja su im najbližija te se određuje na temelju ekološkog potencijala i kemijskog stanja tijela ili skupine tijela (NN, 2019).

Tijelo površinske vode razvrstava se na temelju rezultata ocjene elemenata kakvoće u kategorije ekološkog stanja: vrlo dobro ekološko stanje, dobro ekološko stanje, umjereno ekološko stanje, loše ekološko stanje ili vrlo loše ekološko stanje (Tablica 4) te u kategorije kemijskog stanja: dobro kemijsko stanje ili nije postignuto dobro kemijsko stanje (NN, 2019).

Tablica 4. Granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje,

OZNAKA TIPA	KATEGORIJA EKOLOŠKOG STANJA	Granična vrijednost ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje – vrijednost 50-tog percentila				
		Režim kisika	Hranjive tvari			Prozirnost
		Zasićenje kisikom	Anorganski dušik	Ortofosfati	Ukupni fosfor	Secchi prozirnost
		%	$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$	$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$	$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$	m
HR-P1_2 HR-P1_3	vrlo dobro ili referentno	P: 80 – 120 D: > 80	P: < 80 D: < 5	< 0,1	< 0,3	> 7*
	dobro	P: 75-150 D: > 40	P: < 150 D: < 20	0,1 – 0,3	0,3 – 0,6	> 3*

HR-P2_2 HR-P2_3	vrlo dobro ili referentno	P: 80 – 120 D: > 80	P: < 60 D: < 5	< 0,1	< 0,3	> 5*
	dobro	P: 75-175 D: > 40	P: < 125 D: < 20	0,1 – 0,5	0,3 – 0,9	> 3*

P (površinski sloj) – sloj vodenog stupca od površine (0,5 m) do dubine halokline

D (pridneni sloj) – sloj vodenog stupca 0,5-1m iznad dna

* u plićim područjima do dna

2.2 Indikatori fekalnog onečišćenja

Indikatori fekalnog onečišćenja su pokazatelji sanitarne kakvoće vode. Određivanjem koncentracije indikatora procjenjuje se stupanj rizika za ljudsko zdravlje. Ovi mikroorganizmi su kvantitativno najznačajnija kategorija stranih (alohtonih) mikroorganizama u vodenim sustavima (Krstulović i Šolić, 2006). Ulaze u vodena staništa većinom ispuštanjem otpadnih voda, no izvor može biti i atmosfera zbog vjetrova koji mogu biti vektori prijenosa te nositi viruse, bakterije i razne patogene koji se onda kišom ispiru u vodene sustave. Kiša ispire i tlo koje sadrži iste mikroorganizme koji na poslijetku također dopijevaju u kopnene vode (Krstulović i Šolić, 2006).

Kao fekalni indikatori koriste se bakterije koje su stalno prisutne u ljudskom i životinjskom probavnom traktu te se tako detektira zagađenje vode putem fekalija. Najbolji indikatori su oni koji imaju najveću korelaciju sa stupnjem rizika za ljudsko zdravlje. Svaki indikator trebao bi se što više približiti osobinama idealnog indikatora što bi značilo da mora biti uvijek prisutan kada je prisutan i patogen, njegova koncentracija treba biti proporcionalna koncentraciji patogena, odrediv i prisutan u svim vrstama onečišćenih medija, ne smije biti patogen za čovjeka, životni vijek sličan kao i najotpornijem patogenu, ne razmnožava se u vodi, može ga se vrlo brzo, lako, jeftino i precizno odrediti. Indikatori mogu biti pokazatelji fekalnog onečišćenja, onečišćenja otpadom iz domaćinstava, prisustva patogena, djelotvornost obrade

otpadnih voda, sudbine patogena u okolišu te kretanja suspendiranih čestica koje dospijevaju u okoliš otpadnim vodama (Krstulović i Šolić, 2006).

Danas se tri skupine bakterija koriste kao fekalni indikatori: ukupni koliformi (UK), fekalni koliformi (FK) i fekalni streptokoki (FS) (Krstulović i Šolić, 2006).

2.2.1 Ukupni koliformi (UK)

Predstavljaju skupinu aerobnih i fakultativno anaerobnih Gram-negativnih, nesporogenih štapića koji fermentiraju laktozu na temperaturi od 35 °C i pri tome u razdoblju od 24 sata proizvode kiselinu i plin. Pripadaju im rodovi *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* i *Enterobacter*. Oslobađaju se u okoliš preko fekalija ljudi u brojnosti od oko 10^7 stanica/g ili oko 10^9 stanica dnevno. Neki koliformi se mogu razmnožavati u prirodnim vodama te mogu ukazati na lažno onečišćenje. Ukupni koliformi kratko preživljavaju u vodi pa njihova prisutnost ukazuje isključivo na svježije onečišćenje fekalnim materijalom ili zemljom (Krstulović i Šolić, 2006).

2.2.2 Fekalni koliformi (FK)

Predstavljaju skupinu aerobnih i fakultativno anaerobnih Gram-negativnih nesporogenih štapića koji fermentiraju laktozu na temperaturi od 44.5 °C pri kojoj u razdoblju od 24 sata proizvode kiselinu i plin. Pokazuju vrlo visoku korelaciju sa stupnjem fekalnog onečišćenja koje potječe od toplokrvnih životinja. Najzastupljenija vrsta je *E. coli* (75-95 %). Indikator je svježeg onečišćenja voda s fekalnim materijalom (Krstulović i Šolić, 2006).

2.2.2.1 Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija *E. coli* vrsta je iz porodice Enterobacteriaceae koja je dobar indikator fekalnog zagađenja jer, za razliku od ostalih bakterija, prirodno stanište ove bakterije je isključivo probavni sustav. Potencijalni je patogen tj. u određenim uvjetima izvan probavnog sustava može uzrokovati oboljenja (ZZJZDNZ, 2021).

2.2.3 Fekalni streptokoki (FS)

Fekalni streptokoki su Gram-pozitivni, izduženi ili ovalni koki porijeklom iz crijeva toplokrvnih organizama. Njihovo prisustvo u vodenom okolišu također ukazuje na onečišćenje fekalnim materijalom. Preživljavaju duže nego ukupni i fekalni koliformi, pa su pokazatelji starijeg onečišćenja. Fekalni streptokoki mogu pružiti precizniju informaciju o izvoru onečišćenja. Omjer između koncentracija fekalnih koliforma i fekalnih streptokoka (FK/FS) u uzorku može se upotrijebiti kao pokazatelj porijekla

fekalnog onečišćenja. FK/FS <0,7 pokazatelj je životinjskog porijekla, dok je omjer FK/FS >4,0 pokazatelj isključivo ljudskog porijekla fekalnog materijala. Ovi odnosi vrijede samo za svježi fekalni otpad, ne stariji od 24 sata (Krstulović i Šolić, 2006).

2.3 Autohtona mikroba zajednica

2.3.1 Heterotrofni prokarioti

Heterotrofnim prokariotima smatraju se bakterije i arheje koje spadaju u skupinu pikoplanktona (0,2 – 2 µm). Uglavnom su jednostavnog štapićastog, kuglastog ili filamentnog oblika i manjih veličina. Arheje se od „pravih bakterija“ (eubakterija) razlikuju po strukturi stanične stijenke jer ne sadrže peptidoglikan pa zbog toga se uglavnom mogu pronaći na ekstremnim staništima kao što su ekstremno slana staništa (ekstremni halofili), termofilnim staništima (termoacidofili) i anaerobnim staništima gdje se proizvodi metan (metanogeni) (Krstulović i Šolić, 2006).

Heterotrofne bakterije predstavljaju najbrojniju komponentu mikrobnih zajednica vodenih ekosustava (Sanders i sur., 1992). Njihova se brojnost kreće od 10^3 do 10^8 stanica/ml te ovisi o trofičkom statusu određenog područja (Krstulović i Šolić 2006; Sanders i sur. 1992). Imaju vrlo jednostavnu morfologiju i visoku specifičnu stopu rasta koja im omogućava udvostručavanje populacije tijekom kratkog vremena (oko 2 dana) (Krstulović i Šolić 2006). Bakterije se mogu klasificirati pomoću bojanja po Gramu, prema obliku stanica, potrebi za kisikom, pokretljivosti, te temeljem metaboličkih i prehrambenih osobinama (Krstulović i Šolić 2006).

Bakterije u vodi razgrađuju otopljenu organsku tvar (eng. *dissolved organic matter*, DOM) koja se u manjoj količini luči puknućem stanica, a većinom od strane fitoplanktonskih organizama. Bakterije ne koriste samo DOM, već razlažu i partikularnu organsku tvar (eng. *particular organic matter*, POM) uz pomoć egzoenzima koji služe za cijepanje POM-a na manje molekule koje zatim služe kao supstrat za njihovu ishranu. Uz to, bakterije su ključne u globalnom kruženju ugljika i remineralizaciji organskih spojeva te u oslobađanju hranjivih soli. Također, bitne su i u prijenosu biomase mikrobnim krugom prema višim stepenicama hranidbene mreže (Azam, 1998).

2.3.2 Heterotrofni nanoflagelati

Flagelati, poznati još pod nazivom bičaši, su organizmi koji sadrže jedan, dva ili više protoplazmatskih izraslina koje nalikuju na bičeve te se njima gibaju i putem njih

primaju podražaje (enciklopedija.hr, 05.07.2021.). Dije se u 2 razreda prema načinu prehrane na biljne (*Phytomastigophora*) i životinjske bičaste (*Zoomastigophora*). Postoje i biljni bičasti koji se mogu hraniti heterotrofno te životinjski bičasti koji mogu vršiti fotosintezu (enciklopedija.hr, 05.07.2021.). Takvi organizmi se nazivaju fakultativnim autotrofnim organizmima ili miksotrofnim organizmima. Prema veličini rodovi *Phytomastigophora* i *Zoomastigophora* pripadaju skupini nanoplanktona (2-20 µm) (Krstulović i Šolić 2006).

2.3.3 Cijanobakterije

Cijanobakterije autotrofni su prokarioti koji sadrže klorofil a u tilakoidima i mogu obavljati proces fotosinteze (Fuhrman i Hagström, 2008). Obuhvaćaju širok raspon kokoidnih i nitastih-filamentnih prokariota. Postoje tri osnovna morfološka oblika: jednostanični štapići i koki, filamenti i filamenti s heterocistama. Također se dijele i na pokretne i nepokretne oblike, a oni pokretni se kreću klizanjem po površini (Krstulović i Šolić 2006). Oblici koji sadrže heterociste mogu fiksirati dušik jer unutar heterociste vladaju anaerobni uvjeti pa se na taj način enzimom nitrogenazi omogućuje fiksacija dušika.

Cijanobakterije mogu posjedovati plinske vakuole pomoću kojih reguliraju plutanje stanice u vodenom stupcu. Određene skupine cijanobakterija su pokretne. Brojnost im se kreće u rasponu od 10^2 do 10^5 stanica ml^{-1} (Waterbury i Stanier, 1981).. Rodovi *Prochlorococcus* i *Synechococcus* su najvažniji predstavnici cijanobakterija. Cijanobakterije roda *Prochlorococcus* otkrivene su krajem 80-tih metodom protočne citometrije (Chisholm i sur., 1988). Ova skupina se smatra kao jedna od najvažnijih komponenti autotrofnog pikoplanktona (Partensky i sur., 1999). Rod cijanobakterija *Synechococcus* je vrlo važna prokariotska komponenta autotrofnog pikoplanktona (Šilović, 2012). Brojnost im je od nekoliko desetaka do 10^9 stanica l^{-1} , pri čemu je veća brojnost uočena u eufotičkoj zoni, no prisutne su i u jako oligotrofnim područjima (Partensky i sur., 1999). Ova skupina cijanobakterija otkrivena je nešto ranije u odnosu na *Prochlorococcus* zbog posjedovanja pigmenta fikoeritrina koji snažno autofluorescira žuto do narančasto pod plavim ili zelenim ekscitacijskim svjetlom (Johnson i Sieburth, 1979; Waterbury i sur., 1979). Rod *Prochlorococcus* brojniji je u oligotrofnim vodama, za razliku od roda *Synechococcus* čija se brojnost povećava u vodama s većim koncentracijama nutrijenata. Rod *Synechococcus* ne prodire toliko duboko u vodu kao rod *Prochlorococcus*, ali pokazuje širu geografsku distribuciju koja

uključuje vode bogate nutrijentima te polarne vode (Partensky i sur., 1999). Predstavnici oba roda pokazuju afinitet prema uzimanju nukleozida i aminokiselina iz okoliša te ih se može smatrati fotoheterotrofima (Béja i Suzuki, 2008).

3. Ciljevi

Ciljevi ovog istraživanja bili su ispitati karakteristike staništa, ekološko stanje, mikrobiološke i sanitarne uvjete te tragove onečišćenja u vodama pet slatkovodnih lokvi i jedne bočate močvare na jugozapadnom dijelu istarskog poluotoka.

4. Materijali i metode

4.1 Opis lokacija

4.1.1 Barbariga

Lokva Barbariga (Slika 1) nalazi se u blizini istoimenog naselja na jugozapadnoj obali istarskog poluotoka. Lokvu karakterizira bujna vegetacija i raznolikost životinjskog svijeta. S obzirom da je okružena drvećem, većinom se nalazi u sjeni, stoga ima najmanju temperaturu vode u usporedbi s drugim lokacijama. Smještena je u neposrednoj blizini mora stoga ima viši salinitet u odnosu na ostale slatkovodne sustave.



Slika 1. Lokva Barbariga.

4.1.2 Greco

Lokva Greco (Slika 2) nalazi se na području između općine Bale i grada Rovinja. Ovalnog je oblika, visoke prozirnosti (u odnosu na ostale lokacije) te je okružena vegetacijom i umjetno sazidanim blokovima. Nekada je služila za napajanje stoke koja se vodila na ispašu u neposrednoj blizini lokve. Nalazi se u blizini prometne ceste, pa se uglavnom tvari s iste ispiru u lokvu. Također, značajan je utjecaj otpadnih voda na lokvu što je i ispitano u ovome radu.



Slika 2. Lokva Greco.

4.1.3 Palud

Bočata močvara Palud (Slika 3) nalazi se u blizini grada Rovinja te spada u kategoriju posebnog ornitološkog rezervata. Također, spada u POP područja Natura 2000 zbog svoje važnosti kao bitnog koridora za migracije ptica i njihovo gniježđenje. Bitno je stanište za ptice močvarice te za brojne druge organizme te obiluje bioraznolikošću. Prirodna je depresija koja se nalazi u neposrednoj blizini mora, a s morem je spojena s nekoliko umjetno prokopanih kanalića. Kanali su nastali za vrijeme pandemije koju je uzrokovala bolest malarija kako bi se onemogućilo razvijanje ličinki komaraca koji su istu bolest prenosili. Zbog svoje povezanosti s morem, ova lokacija ima najveći salinitet i jedino je bočato područje istraživano u ovome radu. Danas je

Palud turistička destinacija, stoga je pod strogim monitoringom kako bi se smanjio antropogeni utjecaj (Natura Histrica, 2021).



Slika 3. Močvara Palud.

4.1.4 Cocaletto

Lokva Cocaletto (Slika 4) nalazi se u blizini istoimenog naselja u blizini grada Rovinja. Okružuje ju vegetacija i stijene koje joj daju relativno pravilan ovalni oblik. Nalazi se u neposrednoj blizini naselja u kojem se još uvijek koriste septičke jame, stoga je antropogeni pritisak na ovu lokvu vrlo izražen.



Slika 4. Lokva Cocaletto.

4.1.5 Cisterna

Cisterna (Slika 5) se nalazi na južnom dijelu Rovinja, na samoj plaži uvale Cisterna koje je po njoj dobila naziv. Potiče iz vrijeme antike te je tada koristila za prikupljanje i čuvanje vode. Ima pravokutni oblik, strukturu joj daju zidovi sagrađeni od kamenih blokova izvana, te smjese vapna i pijeska iznutra. Na jednom od zidova nalazi se niša za koju se pretpostavlja da je služila kao potpora za filter koji je pročišćavao vodu koja bi se slijevala u cisternu. Danas se ova lokacija koristi u turističke svrhe s obzirom da se nalazi na jednoj od turistički poznatijih uvala tog područja, te u svrhu napajanja stoke koja obitava na obližnjim livadama.



Slika 5. Lokva Cisterna.

4.1.6 Pili

Lokva Pili (Slika 6) najplića je od svih promatranih lokvi te ima najmanju prozirnost. Na ovoj lokaciji izražen je antropogeni utjecaj iako se ne nalazi u neposrednoj blizini naselja niti u turistički bitnom području. Tijekom ljeta lokva je fragmentirana na nekoliko manjih vodenih tijela (4 do 5) s površinama od oko 10 m² i dubinama do 40 cm.



Slika 6. Lokva Pili.

4.2 Uzorkovanje

Uzorkovanje je obavljeno tijekom zime (16. ožujka) i ljeta (22. kolovoza) 2019. godine na šest različitih lokacija (u pet slatkovodnih lokvi i jednoj bočatoj močvari) na području jugozapadne Istre.

4.3. *In situ* mjerenja

Temperatura vode, koncentracija otopljenog kisika i salinitet izmjereni su *in situ* pomoću sonde (pIONneer 65, Radiometer analytical, Copenhagen), dok su dubina i prozirnost vode izmjerene konopom i Secchi diskom.

4.4 Fizikalno-kemijske analize

4.4.1 Biološka potrošnja kisika (BOD5)

Biološka potrošnja kisika (BOD5) određena je mjerenjem koncentracije otopljenog kisika pIONneer 65 sondom u uzorcima vode koji su stajali u zatvorenim bocama u mraku u periodu od pet dana.

4.4.2 Analiza nutrijenata

Iz uzoraka vode analizirani su amonijev ion/amonijak ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$), nitrit (NO_2^-), nitrat (NO_3^-) i ortofosfat (PO_4^{3-}) metodama opisanim u Ivančić i Degobbis (1984) te Parsons i sur. (1984). U ovim se metodama koriste razrjeđenja uzoraka kako bi isti odgovarali opsegu spektrofotometarskog određivanja (Shimadzu UV 1800, duljine puta 1 cm). Obojeni spojevi za određivanje hranjivih soli nastaju kvantitativnim reakcijama te se zatim intenzitet boje mjeri spektrofotometrom (Shimadzu UV 1800) i očitavaju se apsorbancije (A) na valnoj duljini na kojoj je maksimum apsorpcijskog spektra obojenih spojeva. Vrijednosti apsorbancije linearno su proporcionalne koncentraciji nutrijenta koji se određuje. Standardnim otopinama za svaku hranjivu sol određuju se faktori preračunavanja vrijednosti apsorbancije u koncentraciju ($f=c/A$). Nužno je tijekom analiza određivati i slijepe probe.

4.4.2.1 Amonijev ion

Uzorku od 50 ml vode dodaje se 2 ml fenol-etanolne otopine (100 gl^{-1}) te se dobro promiješa. Zatim se dodaje 5 ml miješanog reagensa (oksidansa) koji se priprema miješanjem Na-dikloro-S-triazin-2,4,5-triona ($\text{C}_3\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_3$, 4 gl^{-1}) i citratne otopine (400 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ i 32 g NaOH u 1l deionizirane vode) u omjeru 1:1. Na posljetku se dodaje 2 ml Na-nitroprusid otopine ($\text{Na}_2\text{FeNO}(\text{CN})_5$, 5 gl^{-1}) koja ima ulogu katalizatora. Vrijeme razvijanja plave indofenol boje je oko tri sata, pa se sukladno s time uzorci drže u tami zaštićene od direktne sunčeve svjetlosti na oko $25 \text{ }^\circ\text{C}$ te se apsorbancija mjeri tri sata nakon u 10 ili 5 cm kiveti na valnoj duljini od 635 nm. Za određivanje faktora proporcionalnosti koristi se standardna otopina $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ koja za kivetu od 10 cm iznosi oko 6,5. Apsorbancija slijepe probe u redestiliranoj vodi iznosi oko 0,03.

4.4.2.2 Nitrit

Uzorku vode od 50 ml dodaje se 1 ml otopine sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_2\text{S}$, 10 gl^{-1}) i dobro promiješa. Nakon 2-8 minuta dodaje se 1 ml otopine N-(1-naftil)-etilendiamindihidroklorida ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{CH}_3\text{OH}$, 1 gl^{-1}) i ponovno promiješa. Nakon otprilike 5-10 minuta mjeri se ekstinkcija nastale boje kod valne duljine od 542 nm. Otopine reagensa stabilne su nekoliko mjeseci. Faktor proporcionalnosti određen je korištenjem standardne otopine bezvodnog kalijevog nitrata, a iznosi oko 2 za kivetu od 10 cm. Vrijednosti ekstinkcije slijepe probe u redestiliranoj vodi kreću se oko nule. Preciznost metoda za nitrit iznosi oko 0,03.

4.4.2.3 Nitrat

Nitrat se određuje metodom redukcije u nitrit prolaskom uzorka kroz redukcijску kolonu ispunjenu česticama kadmija veličine 0,5-2 mm prevučenim bakrom. Da bi se spriječilo taloženje kadmijevih iona propuštanjem kroz kolonu, uzorku vode od 50 ml dodaje se 1 ml otopine amonijevog klorida (NH_4Cl , 250 g l^{-1}), dobro promiješa i propusti kroz redukcijску kolonu. Prvih 20 ml se ne koristi, a u preostalih 30 ml se određuje nitrit prema opisanom postupku. Upotrebom kolona većih dimenzija (promjera 0,8 cm i dužine 23 cm) spriječeno je smanjivanje efikasnosti redukcije pri višim koncentracijama ortofosfata. Iz razlike u ekstinkciji za nitrit dobiven prije i nakon redukcije izračunava se koncentracija nitrata. Faktor proporcionalnosti određivan je korištenjem standardne otopine bezvodnog kalijevog nitrata i iznosi 2,2 za kivetu od 10 cm. Vrijednosti ekstinkcije slijepe probe u redestiliranoj vodi kreću se oko nule. Preciznost metode za nitrat jednaka je onoj za nitrit.

4.4.2.4 Ortofosfat

Uzorku morske vode od 50 ml dodaje se 5 ml miješanog reagensa, a sastoji se od jednog dijela amonij-heptamolibdata-tetrahidrata ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30 g l^{-1}), 2,5 dijela razrijeđene sulfatne kiseline (140 ml H_2SO_4 + 900 ml redestilirane vode), jednog dijela L(+)-askorbinske kiseline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, 54 g l^{-1}) i 0,5 dijela kalij-antimonil-tartarata ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$, $1,36 \text{ g l}^{-1}$). Nakon 10 minuta mjeri se ekstinkcija plave boje kod valne duljine od 890 nm. Svi reagensi osim askorbinske kiseline su stabilni nekoliko mjeseci, dok se ona mora čuvati na hladnom mjestu. Faktor proporcionalnosti određuje se korištenjem standardne otopine bezvodnog KH_2PO_4 i za 10 cm kivetu iznosi oko 5, a vrijednost ekstinkcije slijepe probe niža je od granice osjetljivosti metode. Preciznost metode iznosi 0,03.

4.4.2.5 Ortosilikat

U polietilensku bočicu stavi se 10 ml otopine amonij-heptamolibdata-tetrahidrata ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 8 g l^{-1} uz dodavanje 24 ml HCl (12 mol l^{-1})) i dodaje 25 ml uzorka, te promiješa. Nakon desetak minuta uzorku se dodaje 15 ml miješanog reagensa koji se sastoji od jednog dijela otopine natrijevog sulfita i p-metilaminofenol sulfata (12 g Na_2SO_3 i 20 g $(\text{CH}_3\text{NHC}_6\text{H}_4\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ u 1l), 0,6 dijela otopine oksalne kiseline ($(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 g l^{-1}), 0,6 dijela razrijeđene sulfatne kiseline (1:1) i 0,8 dijela deionizirane vode. Reakcija je kvantitativna nakon jednog sata, ali kod viših koncentracija to može iznositi i do tri sata, nakon čega se mjeri ekstinkcija boje kod

valne duljine od 810 nm. Otopinu miješanog reagensa potrebno je pripremiti neposredno prije određivanja ortosilikata, dok su sami reagensi stabilni više mjeseci. Faktor proporcionalnosti određuje se pomoću standardne otopine bezvodnog natrijevog silikofluorida i u 10 cm kiveti iznosi oko 11. Zbog utjecaja ionske jakosti otopine tj. saliniteta na ekstinkciju silikomolibdatnog kompleksa, a time i na vrijednost faktora, poželjno je da se standardi pripreme u morskoj vodi s niskim sadržajem. Vrijednost ekstinkcije slijepe probe u deioniziranoj vodi iznosi 0,01.

4.5. Biološke analize

4.5.1 Mikrobna zajednica

Uzorci vode prikupljeni su sterilnim staklenim bocama, fiksirani formaldehidom (2% ukupne koncentracije) i skladišteni na 4 °C. U uzorcima određena je abundancija heterotrofnih prokariota (HP), cijanobakterija (CB) i heterotrofnih nanoflagelata (HNF). U 2 ml fiksiranog uzorka dodana je DAPI boja (4,6-diamidino-2-fenilindolom, 1 µg/ml konačne koncentracije) te je uzorak stavljen na mirovanje 10 minuta. Uzorci su profiltrirani kroz crne polikarbonatne filtre veličine pora 0,2 µm (Nuclepore, Whatman, UK). Abundancija heterotrofnih prokariota utvrđena je epifluorescentnim mikroskopom (Leitz Laborlux D) pri povećanju od 1000x (Porter i Feig, 1980). Izbrojano je najmanje 500 stanica HP-a po uzorku. Međutim, točan broj HP-a dobije se razlikom ukupnog broja prebrojanih prokariota i broja cijanobakterija. Abundancija heterotrofnih nanoflagelata određena je prebrojavanjem najmanje 100 stanica po uzorku (Sherr, Caron i Sherr, 1993), a abundancija cijanobakterija dobivena je pomoću zelenog svjetla uz njihovu autofluorescenciju, a izbrojano je najmanje 300 stanica po uzorku (Takahashi, Kikuchi i Hara, 1985).

4.5.2 Fekalni indikatori

Od fekalnih indikatora analizirali su se fekalni streptokoki (FS), fekalni koliformi (FC) te bakterija *Escherichia coli* (EC). Za svaki indikator prikupljeno je 500 ml uzorka koji su skladišteni u prijenosnom hladnjaku do dolaska u laboratorij gdje su fekalni su indikatori kvantificirani metodom membranske filtracije (WHO, 1994). Poduzorci od 100 ml, 10 ml, 1 ml i 0,1 ml, razrijeđeni fosfatnim puferom, filtrirani su kroz membranski filter od 0,45 µm veličine pora (47 mm u promjeru). Kod brojanja *E. coli* membranski filtri su postavljeni na površinu CCA kromogenog agara u Petrijevim zdjelicama te inkubirani na temperaturi od 36 ± 2 °C u vremenskom periodu od 24 sata. Sve kolonije koje su poprimile karakterističnu tamnoplavu ili ljubičastu boju brojane su kao EC te je

rezultat izražen kao broj izraslih kolonija (eng. „Colony forming unit“ – CFU) u 100 ml vode. Fekalni koliformi određeni su postavljanjem membranskih filtara na površinu mFC agara u Petrijevim zdjelicama te su inkubirani na 44,5 °C tijekom 24 sata. Prebrojane su sve kolonije koje su pokazivale specifičnu plavu boju, a rezultat je izražen u CFU u 100 ml vode. Fekalni streptokoki su određeni postavljanjem membranskih filtara na površinu Slanetz-Bartley agara koji se također nalazio u Petrijevim zdjelicama te su inkubirani na 36 °C tijekom 48 sati. Filtri čije su kolonije pokazivale crvenu boju dodatno su postavljeni na površinu Bile-aesculin agara u Petrijevim zdjelicama i inkubirani na 44,5 °C tijekom 2 sata radi potvrdnog testa. Kolonije oko kojih je uočena smeđa boja prebrojane su kao FS. Konačni rezultati izraženi su u CFU u 100 ml vode.

4.5.3 Klorofil a

Stakleni filtri od mikrovlakana (GF/F) (Whatman, UK) veličine pora 0,7 µm prije uporabe žareni su na 400 °C tijekom 4 sata kako bi se uništili potencijalno prisutni organski kontaminanti. Kroz staklene filtre filtrirano je 500 ml uzorka pomoću vakuum pumpe. Filteri su naknadno skladišteni na – 20 °C do daljnjeg nastavka analiza. Ekstrakcija klorofila a (Chl a) iz filtara izvedena je pomoću metanola koji je služio kao otapalo (Zavrel i sur., 2015). Dobiveni ekstrakti su obrađeni spektrofotometrijski (Shimadzu UV, duljina puta 1 cm) principom mjerenja apsorpcije svjetlosti pigmentom na 665 nm tj. na valnoj duljini maksimalne apsorpcije. Koncentracije Chl a su iz apsorpcije izračunate prema spektrofotometrijskim jednadžbama klorofila (Ritchie, 2006).

5. Rezultati

5.1 Fizikalno-kemijske parametri vode

Tablica 5. Fizikalno-kemijski parametri vode u ožujku 2019.

LOKVA	T zraka (°C)	T vode (°C)	Salinitet (‰)	Prodiranje svijetla (Secchi disk bijeli) cm	Prodiranje svijetla (Secchi disk crni) cm	Saturacija kisikom (%)	BOD 5 (%) Saturacija kisikom nakon 5 dana
Barbariga	15,3	11,4	2,7	68,5	68,5	84,5	76,50
Greco	16,7	13,4	0,2	142	105	78,8	70,6

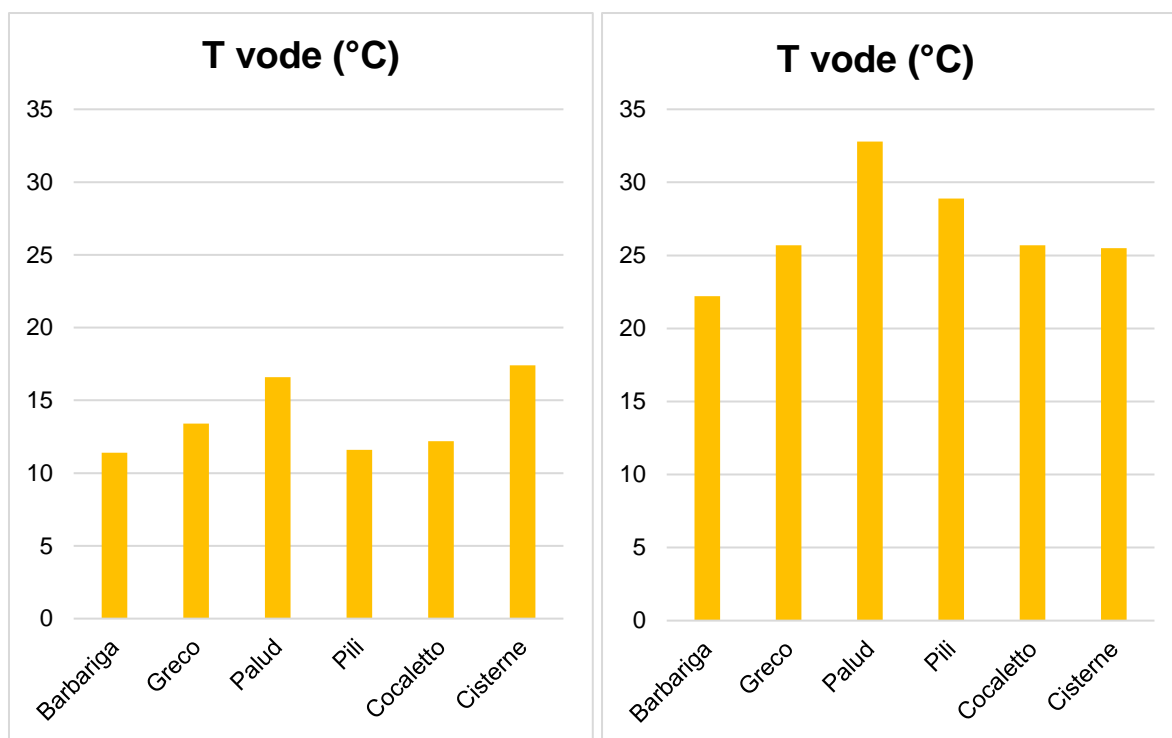
Palud	16	16,6	17,6	69	69	96,7	77,2
Pili	16,2	11,6	0,2	15	10	79,2	1,9
Cocaletto	16,8	12,2	0,22	45	35	74,3	19,9
Cisterne	16,8	17,4	0,2	38	30	115	58,5

Tablica 6. Fizikalno-kemijski parametri vode u kolovozu 2019.

LOKVA	T zraka (°C)	T vode (°C)	Salinitet (‰)	Prodiranje svijetla (Secchi disk bijeli) cm	Prodiranje svijetla (Secchi disk crni) cm	Saturacija kisikom (%)	BOD 5 (%) Saturacija kisikom nakon 5 dana
Barbariga	24,8	22,2	2,9	35	30	53,1	10,40
Greco	27	25,7	0,2	40	32	52,8	28,5
Palud	28,5	32,8	21,6	10	4	21,5	3,8
Pili	28,9	28,9	0,2	7	4	25,4	6,6
Cocaletto	28,8	25,7	0,23	10	5	36,5	6,7
Cisterne	28,1	25,5	0,2	13	10	8,8	4,7

5.1.1 Temperatura vode

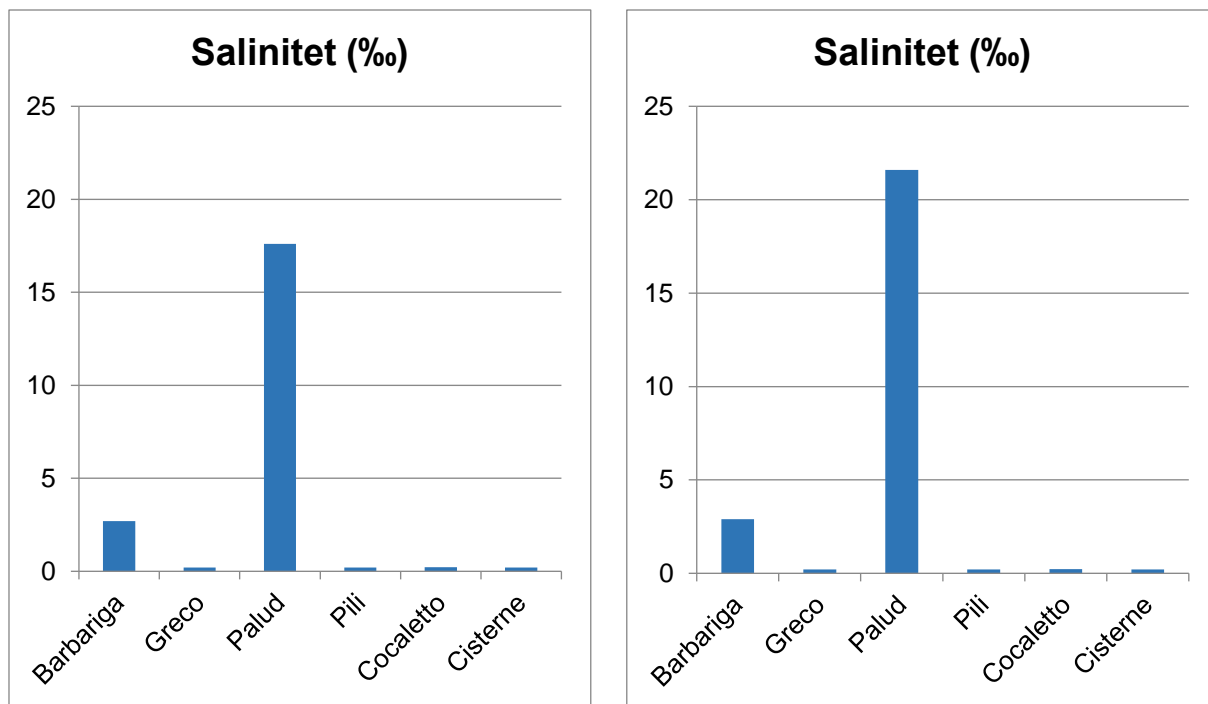
Tijekom zimskog uzorkovanja prosječna temperatura lokvi iznosila je 13,8 °C. Najviša temperatura izmjerena je u Cisterni (17,4 °C), a najniža u Barbarigi (11,4 °C). Ljeti je prosječna temperatura iznosila 26,8 °C, a kretala se između 22,2 °C (Barbariga) i 32,8 °C (Palud) (Tablica 5 i 6) (Slika 7).



Slika 7. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za temperaturu (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

5.1.2 Salinitet

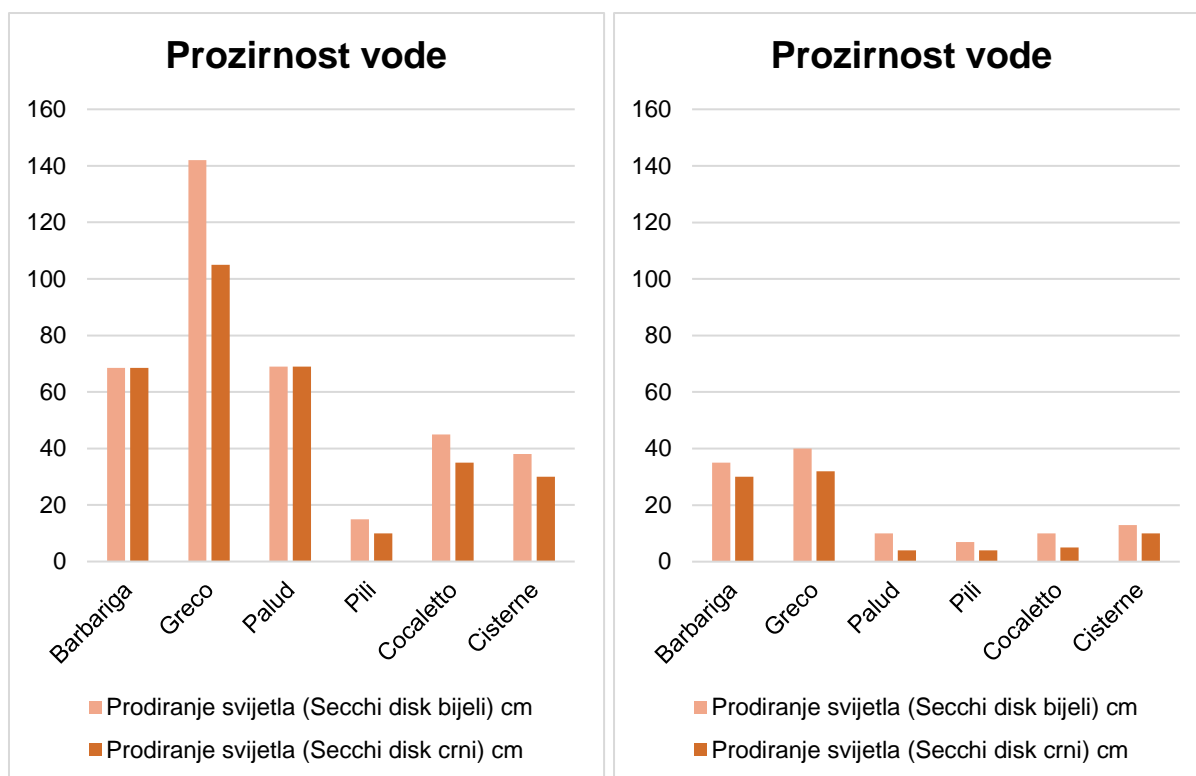
Salinitet se nije značajno razlikovao tijekom sezona za lokve Cocaletto, Cisterne, Greco i Pili koji su imali vrijednosti vrlo blizu 0,2 (vrlo niska slanost). Lokva Barbariga imala je veću slanost u usporedbi s prethodno navedenim lokvama, ali relativno sličnu slanost u obje sezone (2,7 zimi i 2,9 ljeti). Močvara Palud, koja ima nekoliko velikih umjetnih i manjih prirodnih veza s morem, pokazala je znatno veći salinitet u odnosu na ostale lokve koji se kretalo između 17,6 tijekom zime (kada ima više padalina) i 21,6 ljeti. Prosječna vrijednost za zimu bila je 0,21, a za ljetu 0,215 i nije postojala statistički značajna razlika između sezona jer su uspoređivane pomoću neparametrijskog Wilcoxon-Mann-Whitneyova testa zbroja rangiranih uzoraka od dva uzorka ($U = 16,5$, n Ljeto = n Zima = 6, $\alpha = 0,05$) (Tablica 5 i 6) (Slika 8).



Slika 8. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za salinitet (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

5.1.3 Prozirnost vode

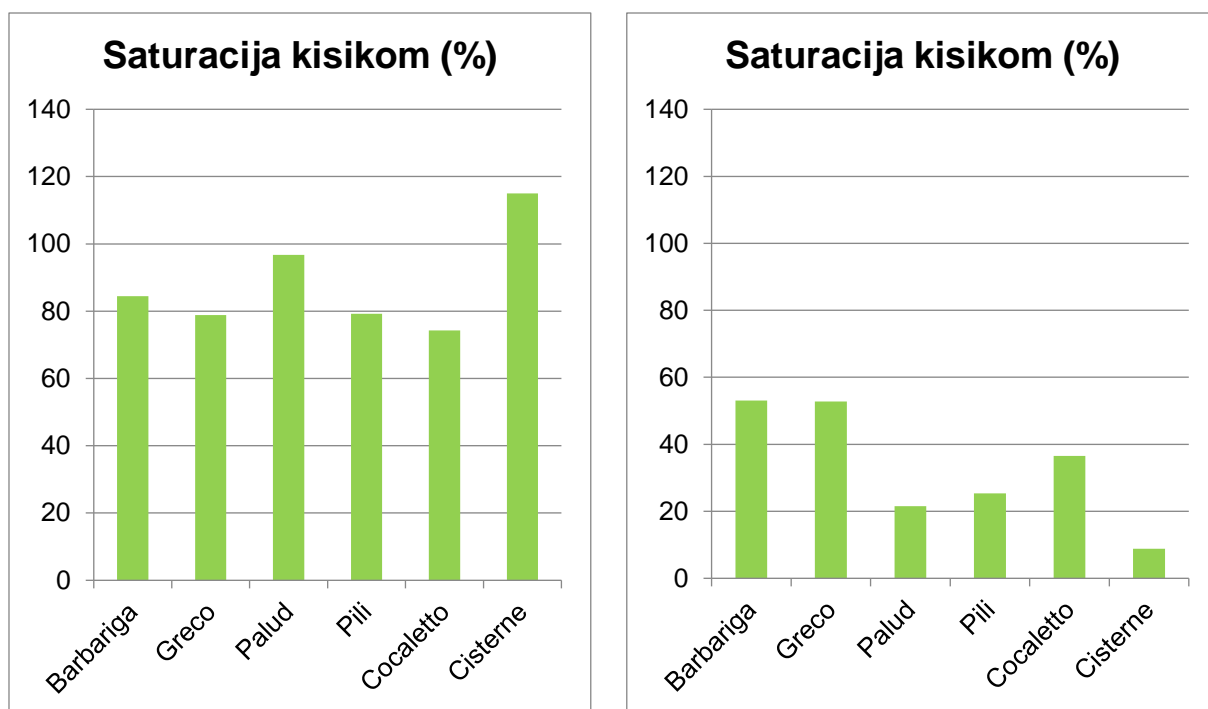
Prozirnost vode procijenjena diskom Secchi (promjera 30 cm) bila je vrlo niska u svim promatranim lokvama u obje sezone. Mjerenja i rezultati nastali ovom metodom za ispitivane lokve smještena su unutar graničnih vrijednosti za supertrofične (1,6 - 0,7 m) i hipertrofične ($\leq 0,7$ m) tipove lokvi (Burns i sur., 2009). Samo tijekom zimskog uzorkovanja prozirnost za lokvu Greco bila je iznad 0,7 m, dok je za sve ostale lokve bila znatno niža, dosežući najmanje 10 cm na lokvi Pili. U prosjeku je prozirnost tijekom zime bila 3 puta veća nego ljeti kada su se vrijednosti kretale između najviših od 32 cm do 30 cm za Greco i Barbarigu i minimuma za Palud (4 cm), Pili (4 cm) i Cocaletto (5 cm) (Tablica 5 i 6) (Slika 9).



Slika 9. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za prozirnost vode (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

5.1.4 Otopljeni kisik (DO) u vodama (saturacija)

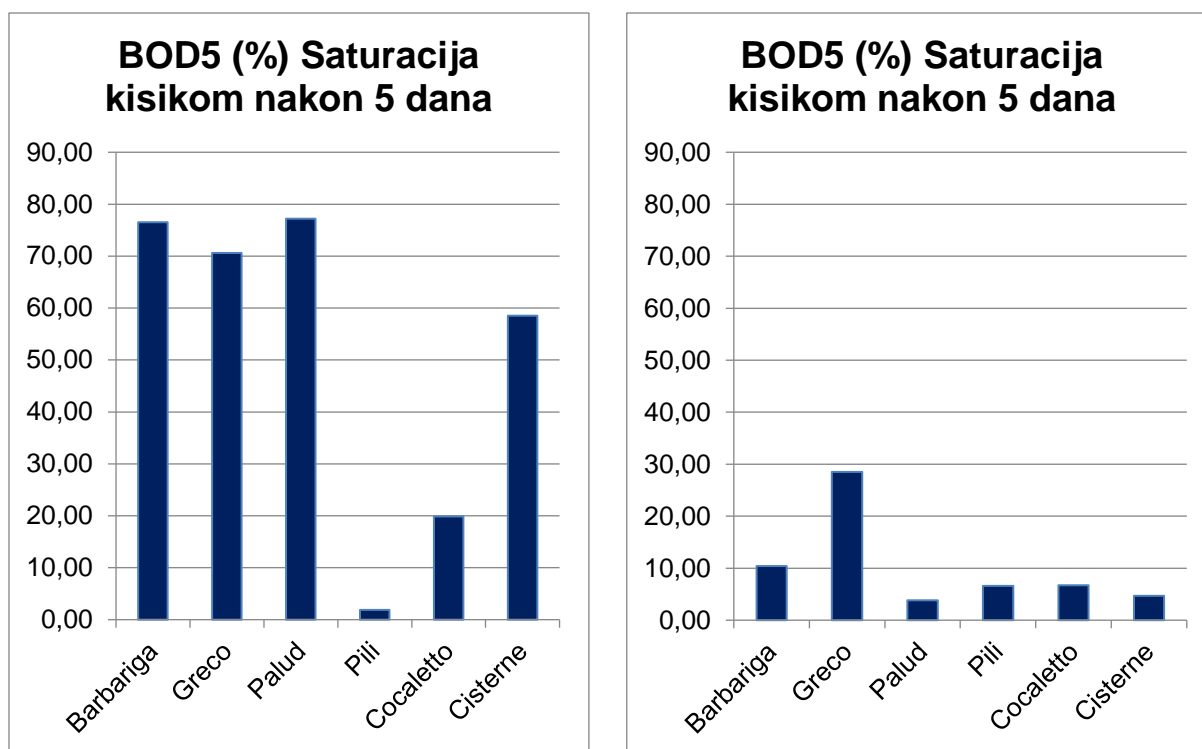
Tijekom zime potvrđeni su oksični uvjeti na svim mjestima uzorkovanja. Topljivost kisika u vodi jako ovisi o temperaturi i slanosti, pa je koncentracija kisika zimi bila statistički značajno veća nego ljeti (dvostrani T test, $p < 0,001$) i varirala je između minimalno 78,8% (Greco) i najviše 115% (Cisterna). Ljeti su najveće zasićenje kisikom pokazivali Barbariga (53,1%) i Greco (52,8%). Niske saturacije zabilježene su kod Paluda (21,5%) i Cisterne (8,8%) koje su pale ispod koncentracije od 2 mg O₂/l koja se smatra pragom za hipoksične vode (Vaquer-Sunyer i Duarte, 2008) (Tablica 5 i 6) (Slika 10).



Slika 10. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za saturaciju kisikom (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

5.1.5 BOD5

Postotak zasićenja se najčešće pretvaraju u koncentracije otopljenog O₂ (Mortimer, 1981). Izmjerene koncentracije petog dana se odbijaju od izmjerenih koncentracija na početku inkubacije i na taj način se dobiva BOD5. Nije primijećena statistički značajna razlika vrijednosti BOD5 između ljeta ($3,9 \pm 3,1$ mg/l) i zime ($1,9 \pm 1,2$ mg/l) korištenjem Welchovog neparametrijskog F testa ($p > 0,05$). Uz iznimku Barbarige i Greca, utvrđeno je da su vrijednosti BOD5 zimi više nego ljeti. Kretale su se od minimalnih 0,34 mg/l (Cisterna - ljeto) i 0,8 mg/l (Barbariga - zima) do maksimuma od 3,7 mg/l (Barbariga - ljeto) i 8,4 mg/l (Pili - zima) (Tablica 5 i 6) (Slika 11).



Slika 11. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za BOD5 (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

5.1.6 pH

Na svim lokacijama u obje sezone pH vrijednosti pokazivale su alkalne uvjete u rasponu od slabo alkalnih do umjerenih, najvjerojatnije zbog karbonatnih materijala koji čine stjenovitu podlogu cijelog područja lokvi. Veća primarna proizvodnja i povećana potrošnja CO₂ tijekom toplijeg dijela godine vjerojatno su bili važan razlog nastanka takvih uvjeta. Mjerenja su bila unutar prirodnog raspona vrijednosti za većinu jezera i rijeka (između 6 i 9) (Mattson, 1999) za močvaru Palud i sve lokve osim za Cisternu gdje je pH bio iznad 9 tijekom oba uzorkovanja. Ukupni prosječni pH bio je $7,9 \pm 0,8$ ljeti i $7,8 \pm 0,7$ zimi. Međutim, nije bilo statistički značajne razlike između godišnjih doba (neparametrijski Wilcoxon-Mann-Whitneyev test, $U = 13,5$, n Ljeto = n Zima = 6, $\alpha = 0,05$). Najbazičniji uvjeti pronađeni su u Cisterni u obje sezone (9,2 zimi i 9,4 ljeti). Minimalne vrijednosti pronađene su zimi u lokvi Greco (7,3) i ljeti u Paludu (7,26). Zanimljivo je da su se, osim Paluda, i na drugim mjestima pokazivali značajni porasti lužnatosti ljeti.

5.2 Mikrobiološke analize

5.2.1 Autohtona mikrobna zajednica

Tablica 7. Abundancija autohtone mikrobne zajednice u lokvama u ožujku 2019.

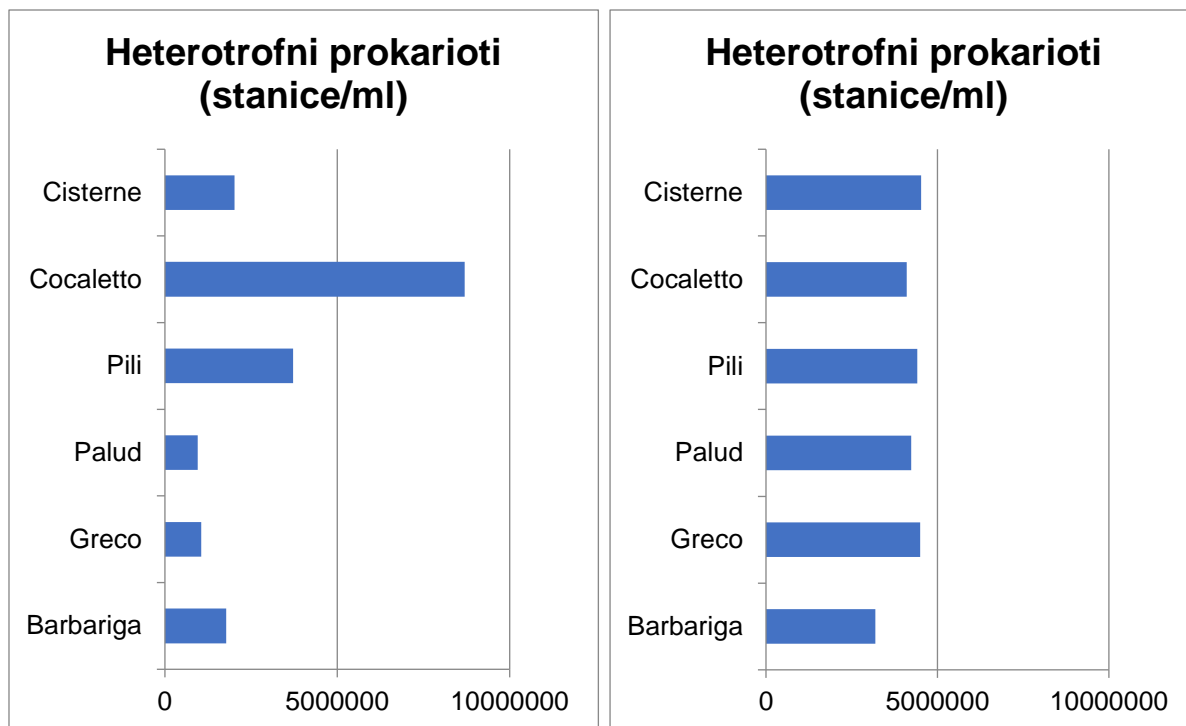
LOKVA	Heterotrofni prokarioti (Stanice/ml)	Heterotrofni nanoflagelati (Stanice/ml)	Cijanobakterije (Stanice/ml)
Barbariga	1.776.460	17.010	167
Greco	1.055.505	24.088	149
Palud	955.140	8.698	279
Pili	3.713.505	32.339	797
Coculetto	8.698.300	36.131	65
Cisterne	2.016.221	19.330	1.023

Tablica 8. Abundancija autohtone mikrobne zajednice u lokvama u kolovozu 2019.

LOKVA	Heterotrofni prokarioti (Stanice/ml)	Heterotrofni nanoflagelati (Stanice/ml)	Cijanobakterije (Stanice/ml)
Barbariga	3.187.146	7.583	0
Greco	4.499.697	14.720	273
Palud	4.235.403	11.151	3.347
Pili	4.416.060	3.186	130
Coculetto	4.103.813	5.904	11.291
Cisterne	4.525.346	12.043	187

5.2.1.1 Heterotrofni prokarioti

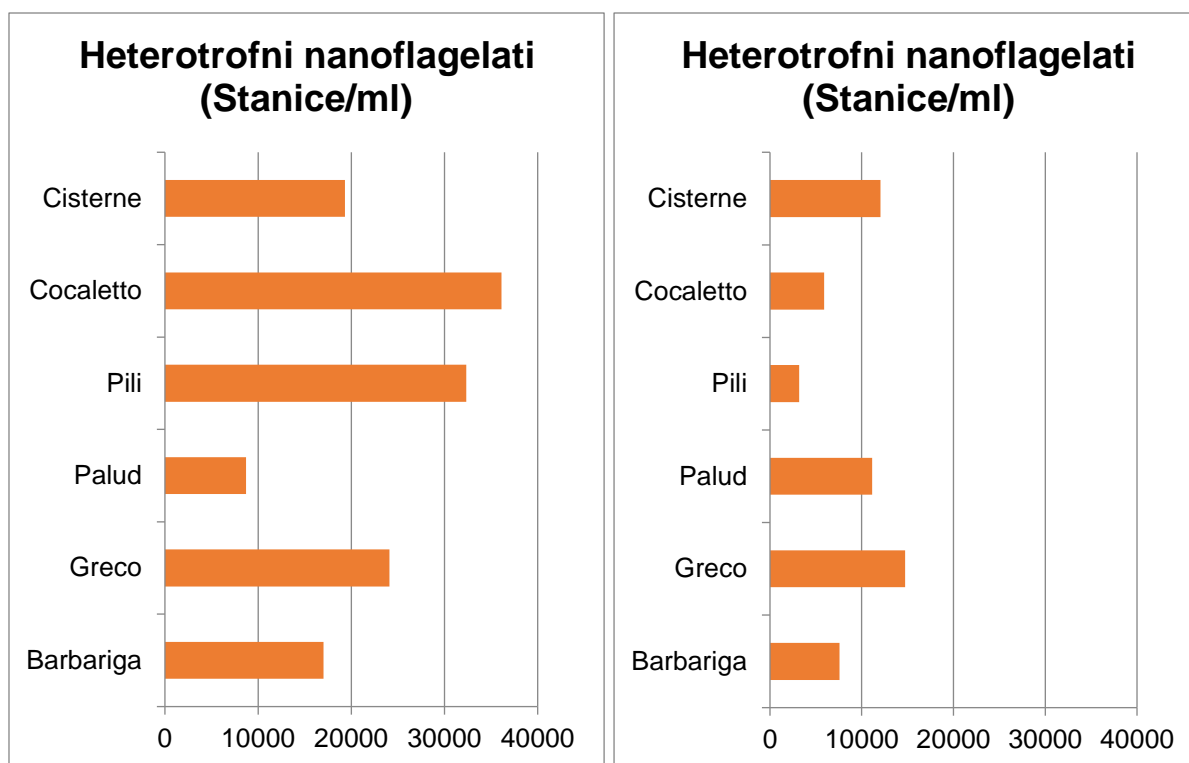
Koncentracije HP varirale su između različitih lokacija u relativno uskom rasponu koncentracija između $9,5 \cdot 10^5$ stanica/ml (Palud) i $8,5 \cdot 10^6$ stanica/ml (Coculetto) zimi i između $3,2 \cdot 10^6$ stanice/ml (Barbariga) i $4,5 \cdot 10^6$ stanica/ml (Cisterna) ljeti. Takve su vrijednosti unutar gornje granice prirodnih abundancija zabilježenih za jezera i estuarne vode, koje se kreću od 10^5 - 10^8 stanica/ml (Sanders i sur., 1992). Za sve lokacije utvrđena je značajna statistička razlika između ljetnih i zimskih vrijednosti HP-a pomoću Welchovog neparametrijskog F testa ($p < 0,01$). U ovom istraživanju prosječna je brojnost HP-a tijekom ljeta bila 37% veća u odnosu na zimu, što je u skladu s podacima koji se odnose na umjerena područja gdje se brojnost HP-a može povećati do jednog reda veličine od zime do ljeta (Sanders i sur., 1992) (Tablica 7 i 8) (Slika 12).



Slika 12. Grafički prikaz abundancije heterotrofnih prokariota na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

5.2.1.2 Heterotrofni nanoflagelati

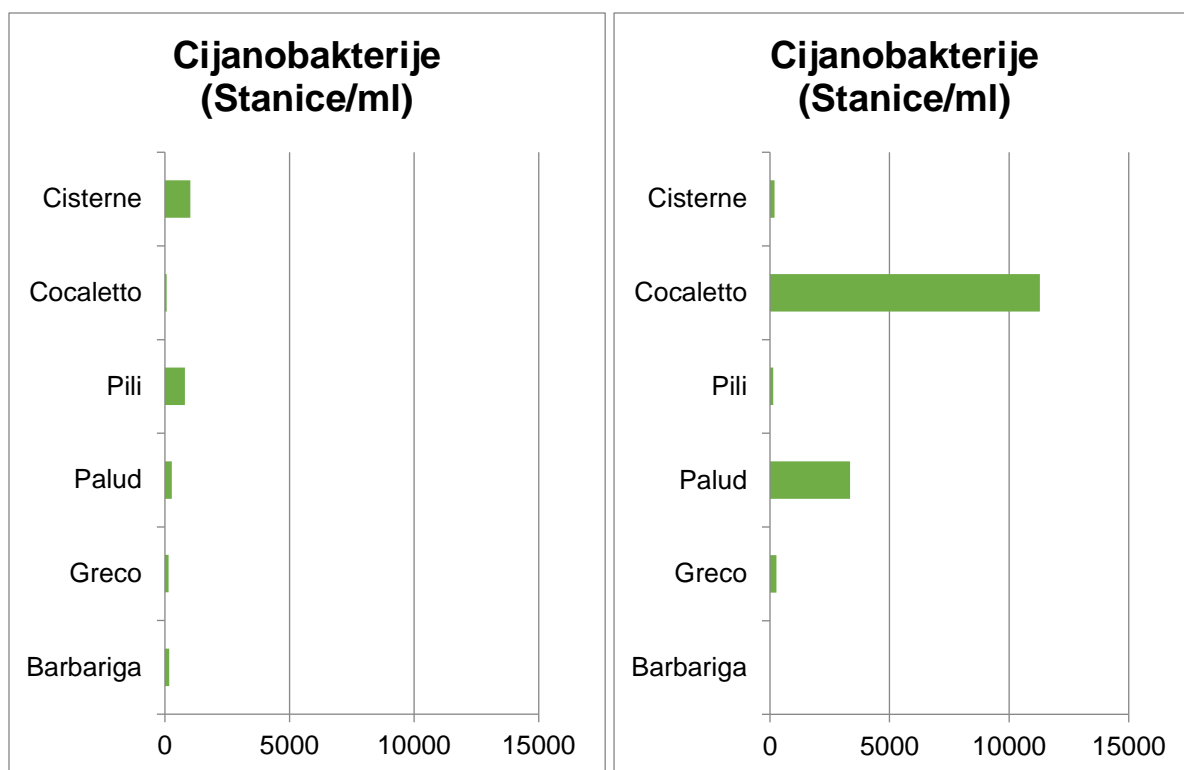
HNF se zimi kretao između $8,7 \cdot 10^3$ stanica/ml (Palud) i $3,6 \cdot 10^4$ stanica/ml (Cocaletto) i između $3,2 \cdot 10^3$ stanica/ml (Pili) i $1,2 \cdot 10^4$ stanica/ml (Cisterna) tijekom ljeta. Kao i za HP, također su količine HNF-a bile unutar raspona koncentracija zabilježenih za slatke vode i morske planktonske zajednice ($10^2 - 10^4$ stanice/ml do 10^5 stanica/ml u ekstremno eutrofnim sustavima) (Sanders i sur., 1992). Neočekivano, koncentracije HNF-a bile su znatno niže tijekom ljeta (2,5 puta), kada je brojnost njihovog glavnog plijena HP-a bila veća, u odnosu na zimu. Tijekom zime je broj HNF-a relativno blisko pratio raspodjelu HP-a, dok tijekom ljeta nije potvrđeno povezivanje (Tablica 7 i 8) (Slika 13).



Slika 13. Grafički prikaz abundancije heterotrofnih nanoflagelata na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

5.2.1.3 Cijanobakterije

CB u znatnom su izobilju bile ljeti, a raspon abundancije sezao je od 0 (Barbariga) do $1,13 \cdot 10^4$ stanica/ml (Cocaletto). Tijekom zime koncentracije su im bile između 65 stanica/ml (Cocaletto) i $1,02 \cdot 10^3$ stanica/ml (Cisterna) (Tablica 7 i 8) (Slika 14).



Slika 14. Grafički prikaz abundancije cijanobakterija na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

5.2.2 Fekalni indikatori (FIB) i sanitarna kvaliteta vode

Tablica 9. Abundancija fekalnih indikatora u lokvama u ožujku 2019.

LOKVA	<i>E. coli</i> (CFU/100 ml)	Fekalni koliformi (CFU/100 ml)	Crijevni enterokoki (CFU/100 ml)
Barbariga	3	1	13
Greco	0	108	9
Palud	0	4	0
Pili	6	135	50
Cocaletto	1	20	3
Cisterne	0	7	22

Tablica 10. Abundancija fekalnih indikatora u lokvama u kolovozu 2019.

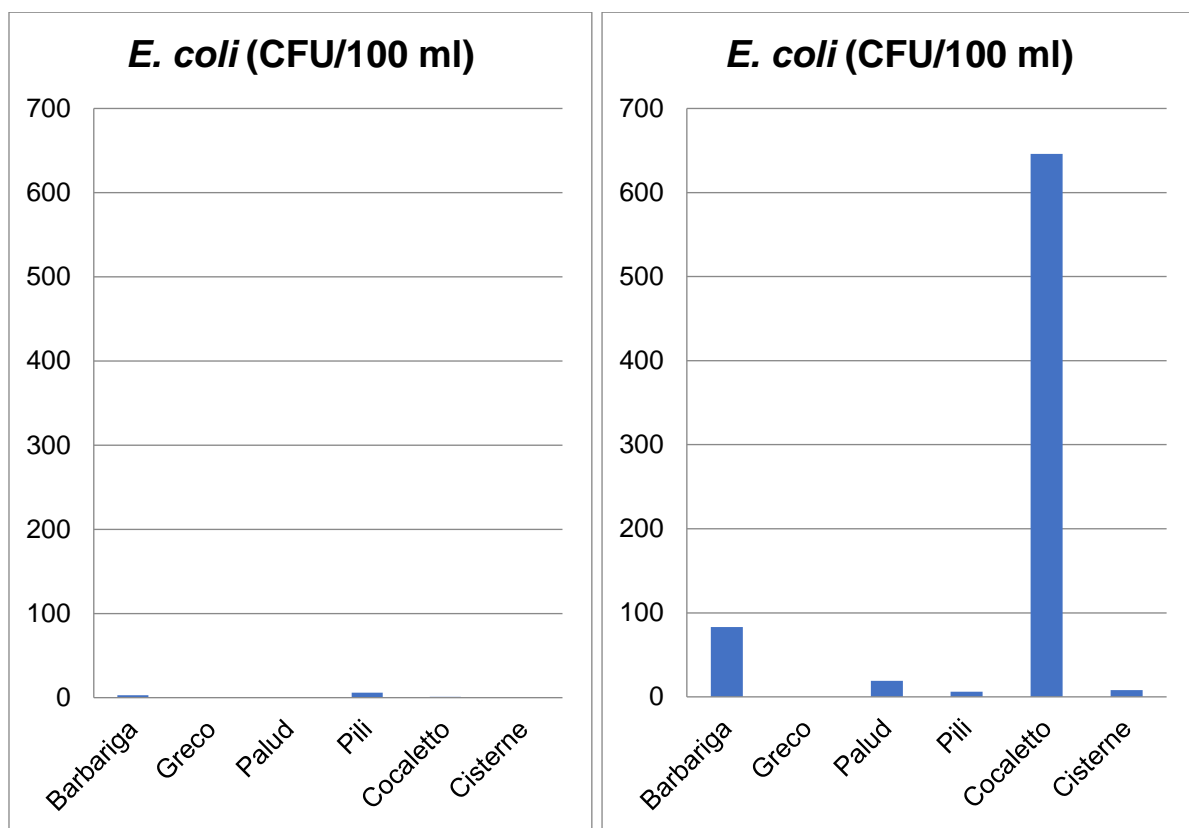
LOKVA	<i>E. coli</i> (CFU/100 ml)	Fekalni koliformi (CFU/100 ml)	Crijevni enterokoki (CFU/100 ml)
Barbariga	83	105	157
Greco	0	19	1

Palud	19	25	28
Pili	6	27	6
Cocaaletto	646	792	19
Cisterne	8	20	1610

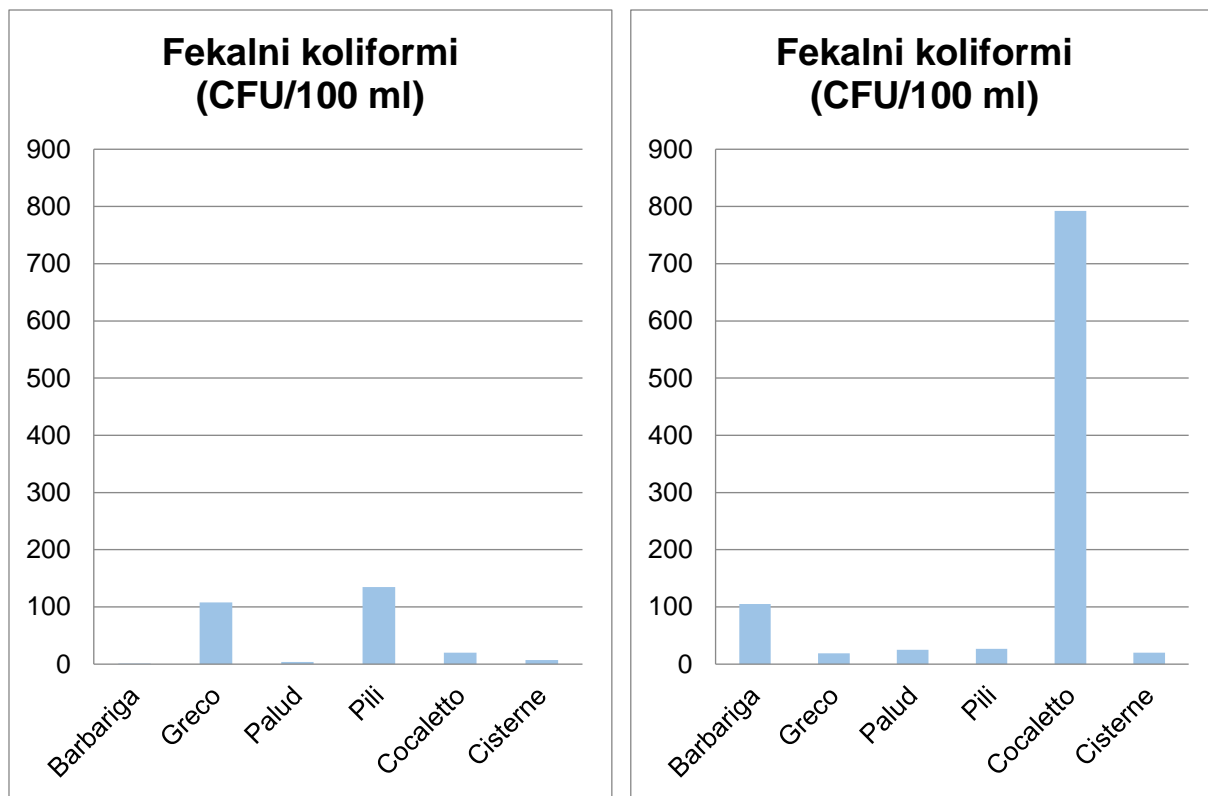
Vrijednosti FIB-a statistički su se značajno razlikovale po sezonama i utvrđeno je da su ljeti više nego zimi (Tablica 9 i 10). Za sve lokacije utvrđene su značajne statističke razlike između ljetnih i zimskih vrijednosti korištenjem Welch-ovog F testa ($p < 0,01$) za EC, FS i FC/FS te pomoću dvaju repnih Wilcoxon-Mann-Whitneyevih testova ($U = 0$, $n_1 = n_2 = 6$, $p < 0,05$) za FC. Zimi je EC otkriven samo na dvije lokacije s izuzetno niskim koncentracijama (≤ 10 CFU/100 ml), FC su bili prisutni na svim lokacijama s relativno malom abundancijom (≤ 200 CFU/100 ml), a FS su otkriveni u malim količinama (≤ 50 CFU/100 ml) na samo pet lokacija. Ljeti je EC bio prisutan u pet od šest praćenih staništa s niskim koncentracijama, osim Cocaletta koji je pokazivao umjerenu koncentraciju (646 CFU/100 ml). Razlika u abundanciji EC između dvije sezone bila je veća ljeti za red veličine (Slika 15). FC su otkriveni na svim lokacijama s relativno niskim koncentracijama, ali na Cocalettu se ponovno postigla umjerena brojnost od 792 CFU/100 ml (Slika 16). FS su bili prisutni u svim promatranim staništima, dosežući umjerene razine u Barbarigi (158 CFU/100 ml) i visoke razine u Cisterni (1610 CFU/100 ml) (Slika 17). Odnos FC/FS može se koristiti za procjenu izvora FIB-a u vodenom tijelu (Geldreich i Kenner 1969; Mara 1974; Feachem 1975). Odnos FC/FS u ljudskom fecesu obično je veći od 4, a u toplokrvnim životinjskim fecesima manji od 0,1. Stoga se, pod određenim uvjetima, omjer FC/FS onečišćene vode može koristiti kao indeks za razlikovanje zagađenja ljudskim fekalijama od zagađenja životinjskim. U našoj studiji tijekom zime identificiran je mogući ljudski izvor FIB-a za Cocaletto, Palud i Greco, mješoviti ljudsko-životinjski izvor za Pili, dok su Barbariga i Cisterne pokazali prevladavajući životinjski izvor. Tijekom ljeta omjer FC/FS ukazivao je na ljudski izvor FIB-ova za Greco, Pili i Cocaletto, mješoviti izvor za Palud i životinjski izvor za Cisterne i Barbarigu.

Izvori FIB-a naznačeni omjerom FC/FS za neke od lokacija potvrđeni su izravnim terenskim promatranjima. Lokve Cisterna i Barbariga, gdje je omjer ukazivao na životinjski izvor FIB-a, bila su daleko od ljudskih naselja, ali su ih redovito koristile životinje (koze i ovce). Za lokvu Cocaletto, gdje je omjer ukazivao na jasan ljudski izvor, njegova blizina urbanom području, gdje se još uvijek koriste septičke jame,

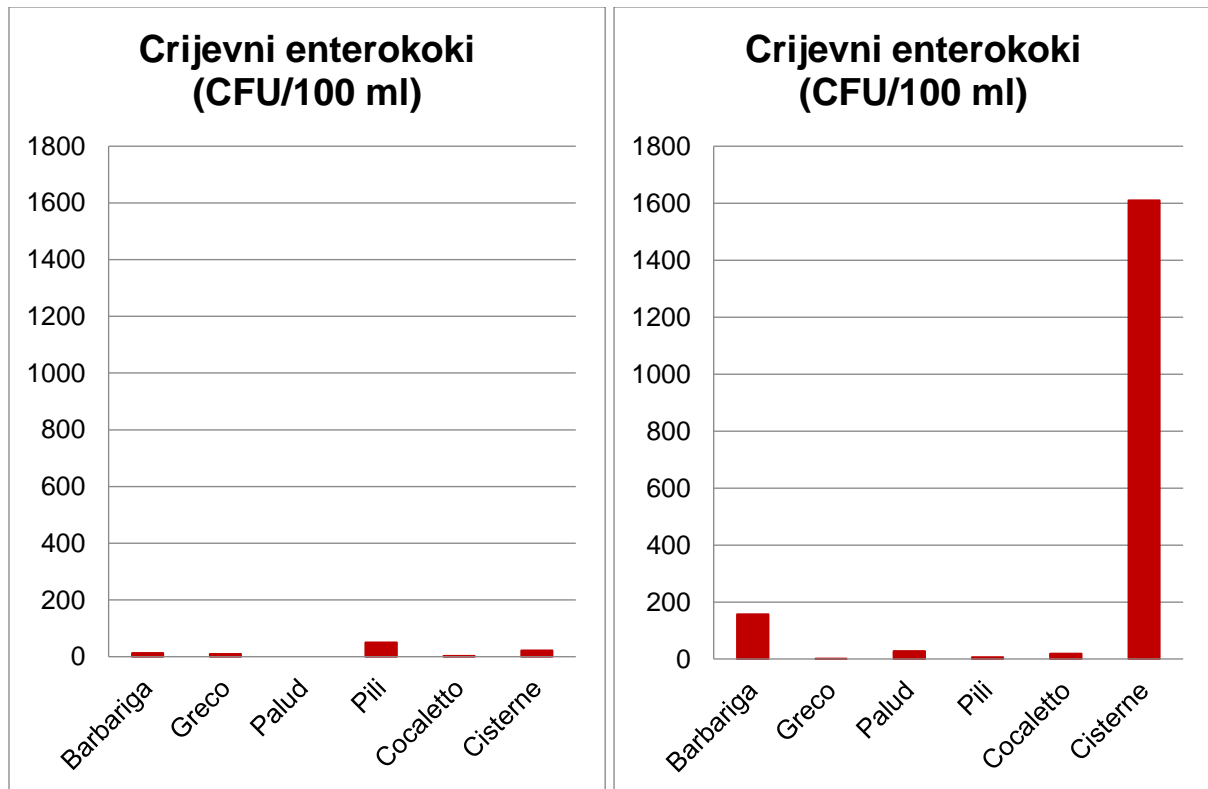
mogla bi objasniti ulazni FIB. S druge strane, antropogeno i mješovito podrijetlo FIB-a pokazalo se na Paludu, Piliju i Greco, što je bilo prilično iznenađujuće jer se nalaze nekoliko kilometara od najbližeg naselja. Moguće objašnjenje za dobivene omjere FIB-a moglo bi se pripisati prisutnosti znatnog broja ptica koje se redovito zadržavaju oko tih lokaliteta, a posebno ornitološkog rezervata močvare Palud. Prethodne studije potvrdile su da su divlje ptice važan neprecizan izvor fekalne kontaminacije površinskih voda i mogu izlučivati velike količine FIB-a (Ricca i sur., 1998; Geldreich i sur., 1969). Osim ptica, jedini drugi izvor fekalija za te lokacije bile su divlje životinje i domaća stoka, čiji su tragovi pronađeni u blizini staništa.



Slika 15. Grafički prikaz abundancije bakterije *E. coli* na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).



Slika 16. Grafički prikaz abundancije fekalnih koliforma na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).



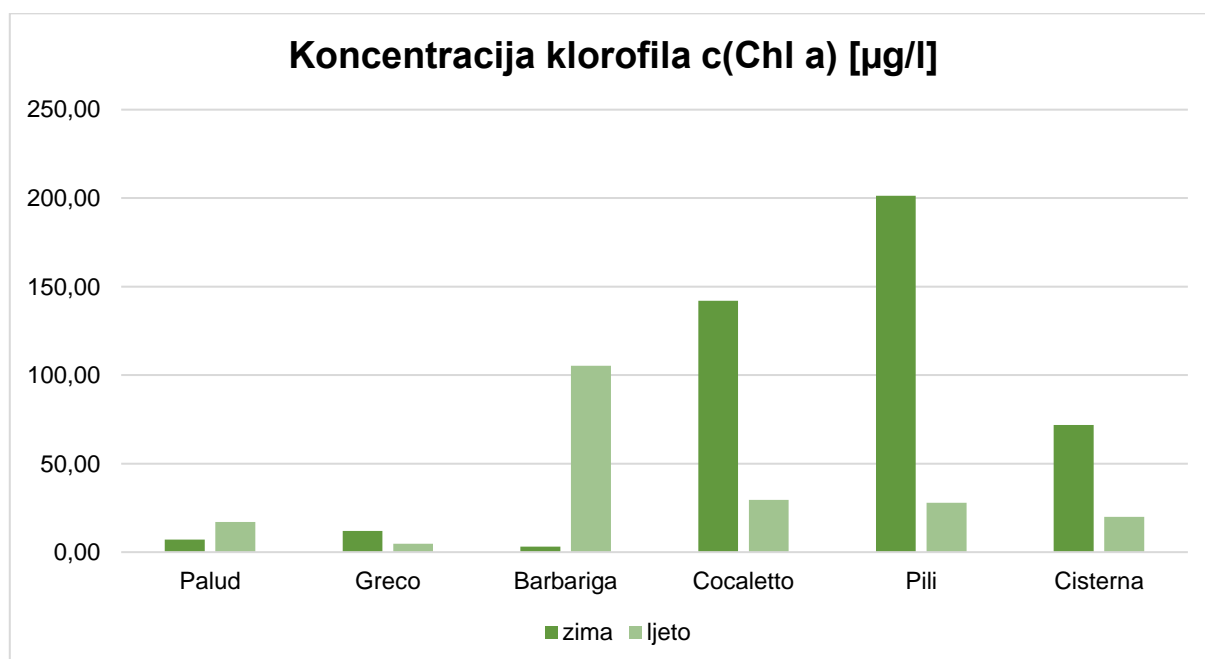
Slika 17. Grafički prikaz abundancije crijevnih streptokoka na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

5.2.3 Klorofil a

Tablica 11. Rezultati koncentracija klorofila a na svim lokacijama tijekom dvije sezone (zima i ljeto 2019.).

Lokva	Koncentracija klorofila c(Chl a) [µg/l] zimi	Koncentracija klorofila c(Chl a) [µg/l] ljeti
Palud	7,16	17,00
Greco	12,00	4,75
Barbariga	3,11	105,37
Cocaletto	142,05	29,60
Pili	201,42	27,87
Cisterna	71,84	19,85

Koncentracije Chl a znatno variraju između sezona. Najveća sezonska promjena uočena je u lokvi Barbariga u kojoj je zabilježena najmanja koncentracija zimi (3,11 µg l⁻¹), a najviša tijekom ljeta (105,37 µg l⁻¹). Također, velike sezonalne varijacije uočene su i u lokvama Cocaletto, Pili i Cisterna, a kod Paluda i Greca nisu uočene ekstremne promjene u koncentraciji. Prosjek koncentracija zimi i ljeti se također bitno razlikovao, pa je tako zimi bio viši (72,93 ± 82,71 µg l⁻¹), a ljeti niži (34,07 ± 36,04 µg l⁻¹) (Tablica 11) (Slika 18).



Slika 18. Grafički prikaz usporedbe koncentracija klorofila a na svim lokacijama tijekom ljeta i zime 2019.

5.3 Hranjive soli

Tablica 12. Rezultati hranjivih soli za sve lokacije (ožujak 2019.).

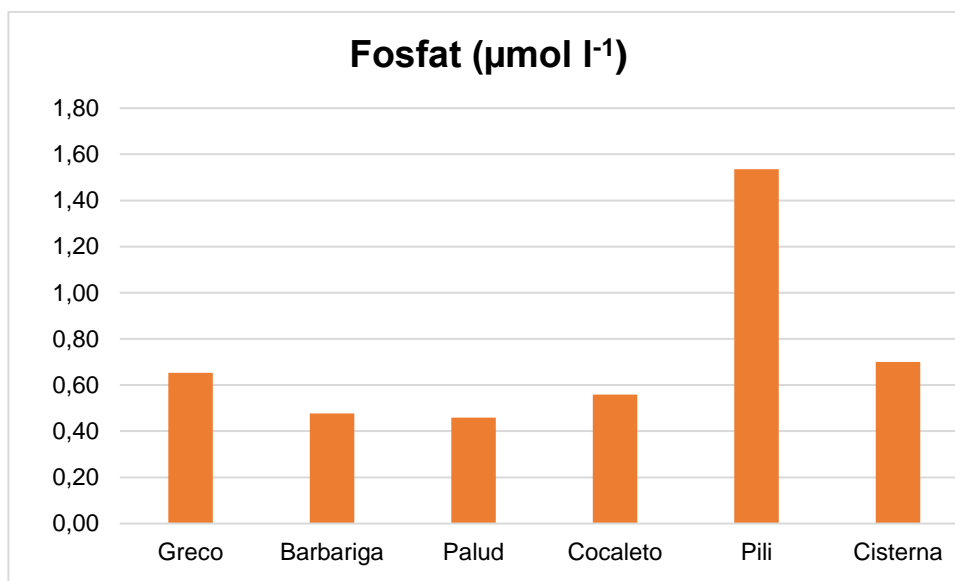
Uzorak	Fosfat ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Nitrit ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Nitrat ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Amonij ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	SiO ₄ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
Greco	0,65	0,08	1,38	1,99	51,01
Barbariga	0,48	0,04	1,27	2,96	79,75
Palud	0,46	0,14	0,69	2,53	11,16
Cocchetto	0,56	0,09	0,65	1,64	77,37
Pili	1,53	0,06	0,71	0,70	137,03
Cisterna	0,70	0,88	4,60	21,72	144,12
prosjek	0,73	0,22	1,55	5,26	83,41
SD	0,41	0,33	1,53	8,10	50,75
min	0,46	0,04	0,65	0,70	11,16
max	1,53	0,88	4,60	21,72	144,12

Tablica 13. Rezultati hranjivih soli za sve lokacije (kolovoz 2019.).

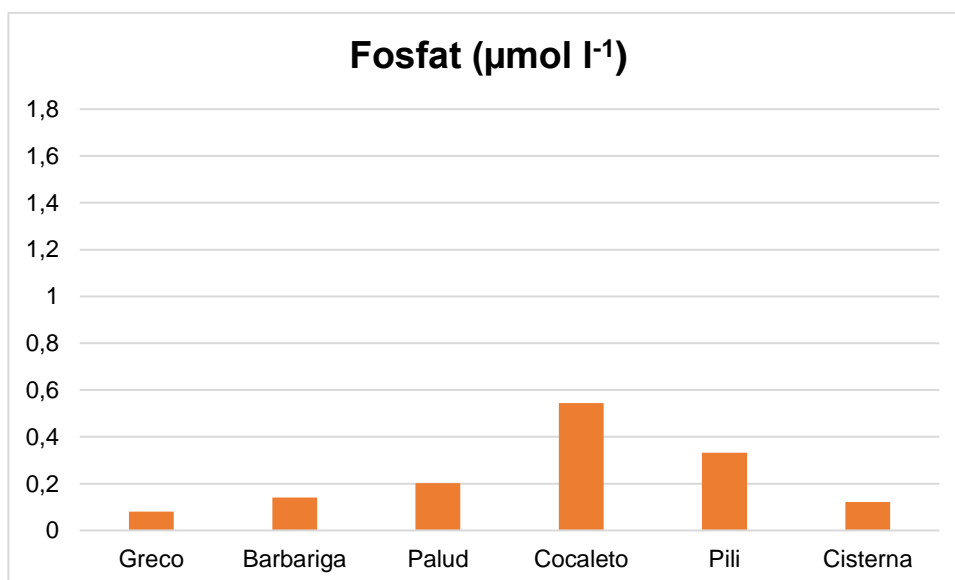
Uzorak	Fosfat ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Nitrit ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Nitrat ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Amonij ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	SiO ₄ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
Greco	0,08	0,19	3,84	0,52	42,65
Barbariga	0,14	0,31	3,93	145,42	70,32
Palud	0,20	0,22	0,37	28,01	4,56
Cocchetto	0,54	0,15	3,57	1,47	69,30
Pili	0,33	0,28	3,88	222,12	98,23
Cisterna	0,12	0,12	1,58	2,82	104,27
prosjek	0,24	0,21	2,86	66,73	64,89
SD	0,17	0,07	1,51	94,41	37,001
min	0,08	0,12	0,37	0,52	4,56
max	0,54	0,31	3,93	222,12	104,27

5.3.1 Fosfat

Tijekom zimskog uzorkovanja prosječna koncentracija fosfata na svim lokacijama iznosila je $0,73 \pm 0,41 \mu\text{mol l}^{-1}$ što je oko tri puta više u odnosu na ljeto (prosjeak $0,24 \pm 0,17 \mu\text{mol l}^{-1}$). Tijekom ljeta najviša razina fosfata ($0,54 \mu\text{mol l}^{-1}$) izmjerena je u lokvi Cocaletto, dok je najniža ($0,08 \mu\text{mol l}^{-1}$) registrirana kod lokve Greco. Zimi, ortofosfat je bio najviši ($1,63 \mu\text{mol l}^{-1}$) kod lokve Pili a najniži ($0,08 \mu\text{mol l}^{-1}$) u močvari Palud (Tablica 12 i 13) (Slika 19 i 20).



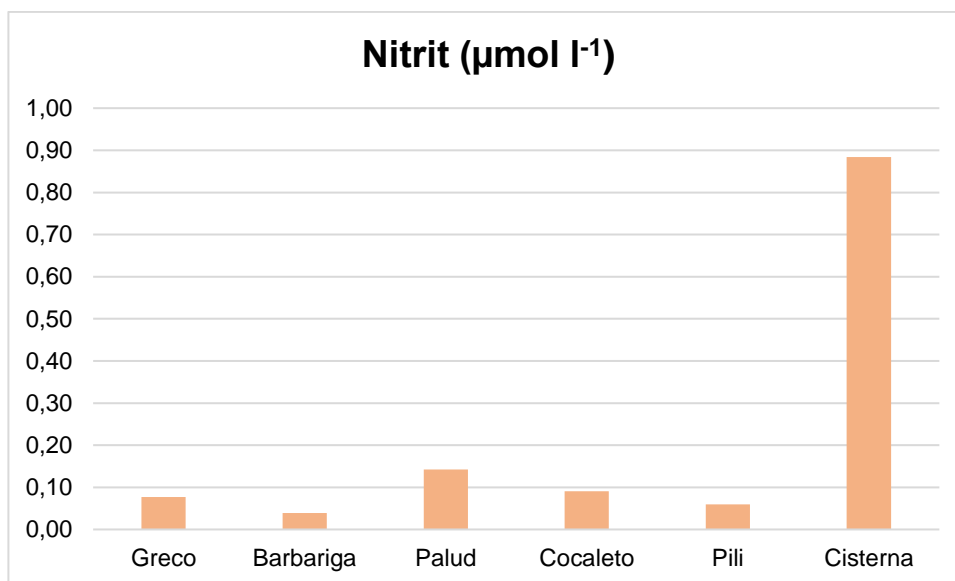
Slika 19. Grafički prikaz koncentracija fosfora u svim lokvama (ožujak 2019.).



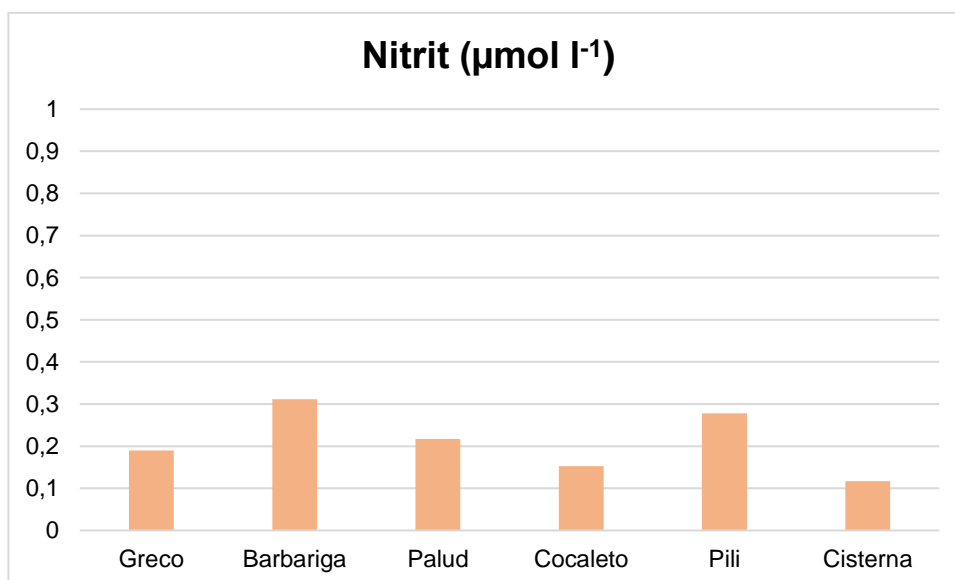
Slika 20. Grafički prikaz koncentracija fosfora u svim lokvama (kolovoz 2019.).

5.3.2 Nitrit

Iako se prosjek koncentracija nitrita nije bitno razlikovao između ljetnog ($0,21 \pm 0,07 \mu\text{mol l}^{-1}$) i zimskog ($0,22 \pm 0,33 \mu\text{mol l}^{-1}$) uzorkovanja, razlika u njihovim standardnim devijacijama ukazuje da su ipak uvjeti bili različiti. Zimi raspon koncentracija nitrita bio je veći u odnosu na ljeto. U hladnijem dijelu godine najviša koncentracija nitrita ($0,88 \mu\text{mol l}^{-1}$) zabilježena je kod lokve Cisterne, a ljeti u lokvi Barbariga ($0,31 \mu\text{mol l}^{-1}$) (Tablica 12 i 13) (Slika 21 i 22).



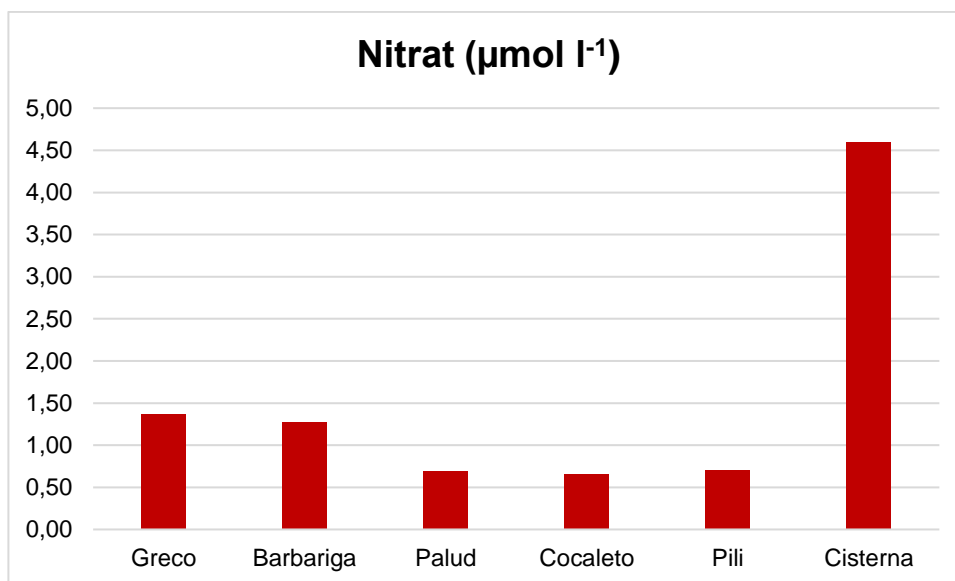
Slika 21. Grafički prikaz koncentracija nitrita u svim lokvama (ožujak 2019.).



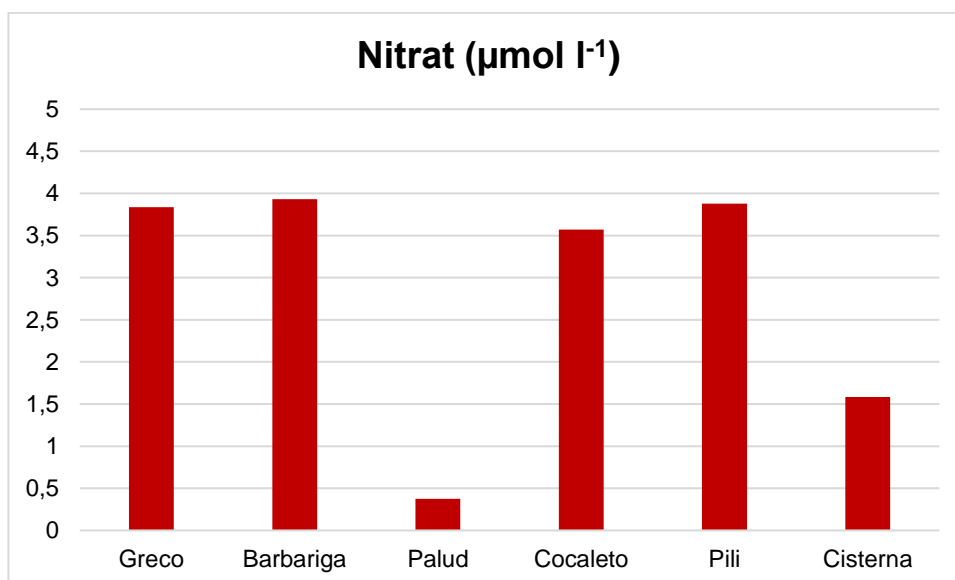
Slika 22. Grafički prikaz koncentracija nitrita u svim lokvama (kolovoz 2019.).

5.3.3 Nitrat

U zimskom periodu prosjek koncentracije nitrata ($1,55 \pm 1,53 \mu\text{mol l}^{-1}$) bio je niži u odnosu na ljeto ($2,86 \pm 1,51 \mu\text{mol l}^{-1}$), ali najveća koncentracija izmjerena zimi ($4,60 \mu\text{mol l}^{-1}$) kod Cisterne bila je veća od najviše ljetne koncentracije ($3,93 \mu\text{mol l}^{-1}$) kod Barbarige. Močvara Palud bila je karakterizirana najstalnijom i niskom koncentracijom nitrata, dok kod lokve Cisterna uočena je najveća sezonska promjena (Tablica 12 i 13) (Slika 23 i 24).



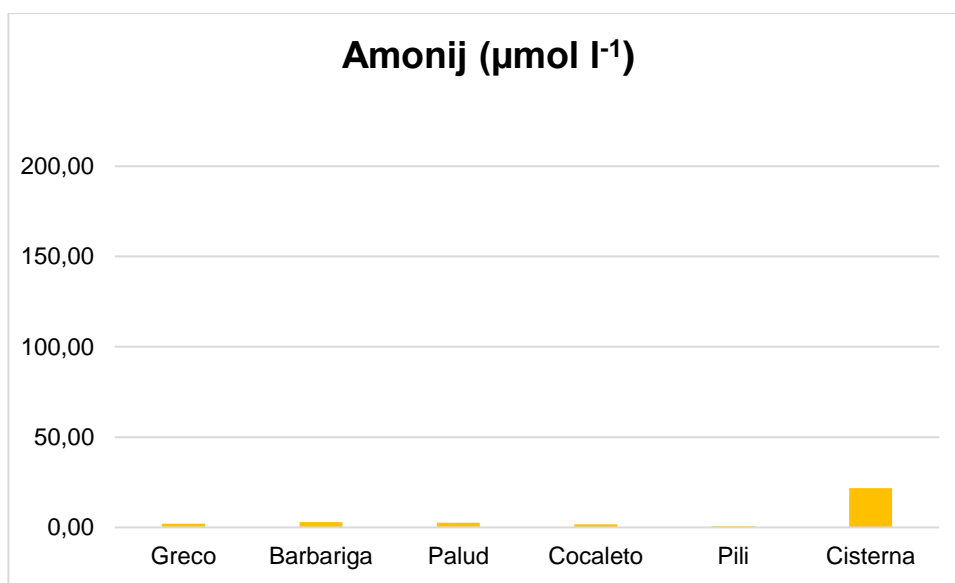
Slika 23. Grafički prikaz koncentracija nitrata u svim lokvama (ožujak 2019.).



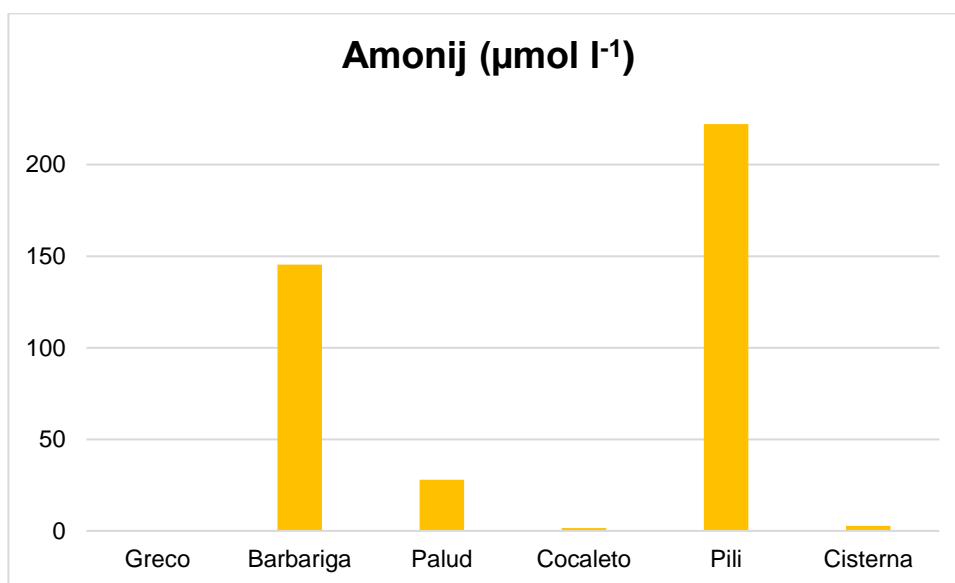
Slika 24. Grafički prikaz koncentracija nitrata u svim lokvama (kolovoz 2019.).

5.3.4 Amonijak

Prosječna koncentracija amonijaka tijekom ljetnog perioda ($66,7 \pm 94,4 \mu\text{mol l}^{-1}$) bio je za oko red veličine viši od prosjeka zimi ($5,26 \pm 8,1 \mu\text{mol l}^{-1}$). Lokve Pili ($222,12 \mu\text{mol l}^{-1}$) i Barbariga ($145,42 \mu\text{mol l}^{-1}$) istaknule su se po visokim koncentracijama amonijaka tijekom ljeta, dok su zimi bile niske i slične ostalim postajama. U usporedbi s ostalim postajama, u zimskom se periodu istaknula Cisterna s koncentracijom od $21,72 \mu\text{mol l}^{-1}$, dok na drugim lokacijama koncentracije nisu prelazile $3 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Tablica 12 i 13) (Slika 25 i 26).



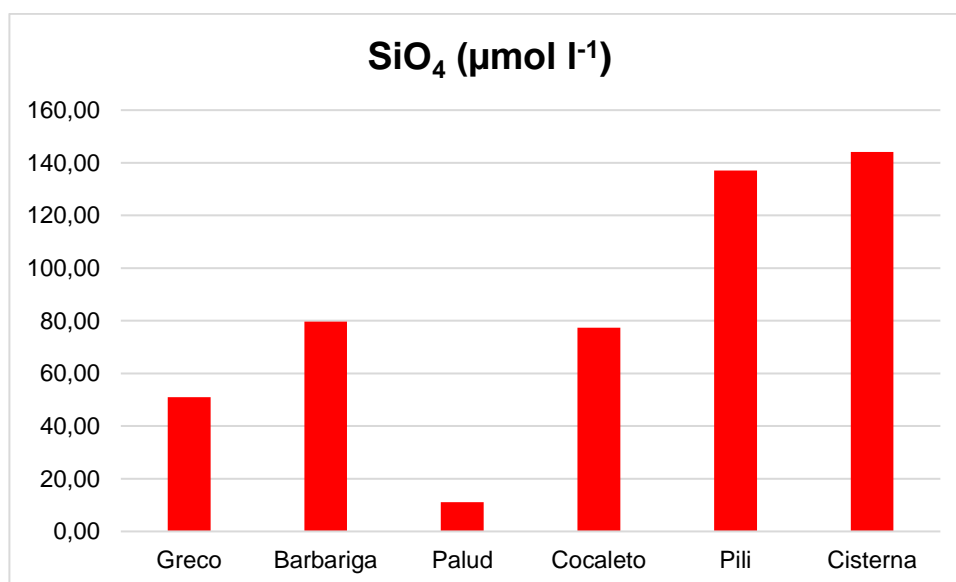
Slika 25. Grafički prikaz koncentracija amonijaka u svim lokvama (ožujak 2019.).



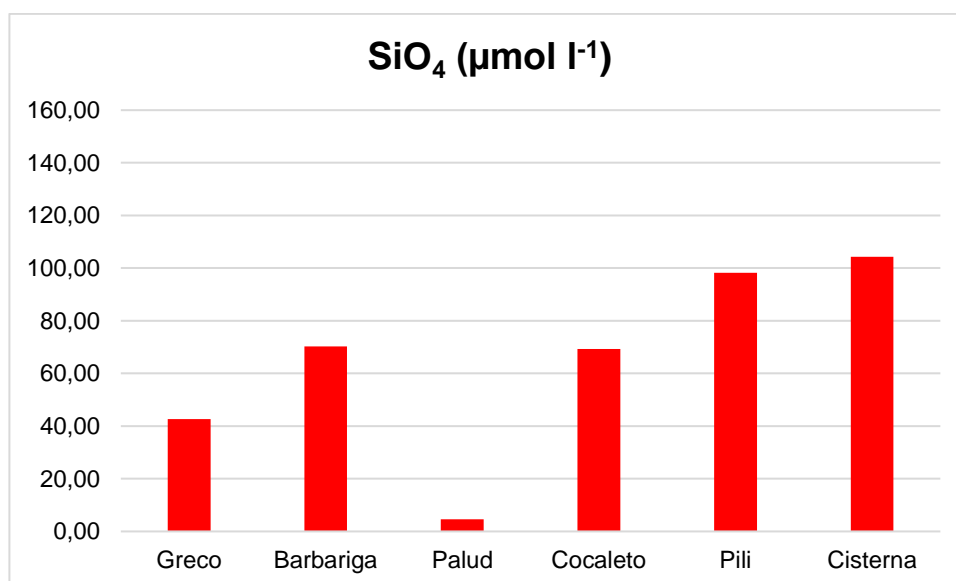
Slika 26. Grafički prikaz koncentracija amonijaka u svim lokvama (kolovoz 2019.).

5.3.5 Silikat

Prosjeck koncentracija silikata u obje sezone nije pokazivala značajne oscilacije, ali, s obzirom na ostale hranjive soli, prosjeck koncentracija bio je manji ljeti ($64,89 \pm 37,002 \mu\text{mol l}^{-1}$) nego zimi ($83,41 \pm 50,75 \mu\text{mol l}^{-1}$). Močvara Palud istaknula se sa znatno manjim koncentracijama u usporedbi s ostalim lokacijama u obje sezone, pa su tako najmanje koncentracije zimi ($11,16 \mu\text{mol l}^{-1}$) i ljeti ($4,56 \mu\text{mol l}^{-1}$) zabilježene na Paludu. Suprotno tome, najviše koncentracije ljeti ($104,27 \mu\text{mol l}^{-1}$) i zimi ($144,12 \mu\text{mol l}^{-1}$) bile su kod Cisterne (Tablica 12 i 13) (Slika 27 i 28).



Slika 27. Grafički prikaz koncentracija silikata u svim lokvama (ožujak 2019.).



Slika 28. Grafički prikaz koncentracija silikata u svim lokvama (kolovoz 2019.).

6. Diskusija

Tablica 14. Usporedba abundancija autohtone mikrobne zajednice uzorkovanih lokvi (plavo osjenčane ćelije) i lokvi u svijetu za ožujak.

LOKACIJA	Heterotrofni prokarioti (stanice/ml)	Heterotrofni nanoflagelati (stanice/ml)	Cijanobakterije (stanice/ml)
Barbariga	1776460 ($1,7 \cdot 10^6$)	17010 ($1,7 \cdot 10^4$)	167
Greco	1055505 ($1 \cdot 10^6$)	24088 ($2,4 \cdot 10^4$)	149
Palud	955140 ($9,5 \cdot 10^5$)	8698 ($8,7 \cdot 10^3$)	279
Pili	3713505 ($3,7 \cdot 10^6$)	32339 ($3,2 \cdot 10^4$)	797
Cocchetto	8698300 ($8,7 \cdot 10^6$)	36131 ($3,6 \cdot 10^4$)	65
Cisterne	2016221 ($2 \cdot 10^6$)	19330 ($1,9 \cdot 10^4$)	1023
Jezero Biwa (Japan)	$2 - 3 \cdot 10^6$	$> 2 \cdot 10^3$	/
Jezero Oubeira (Alžir)	$1 \cdot 10^3$	/	$540,74 - 704,2 \cdot 10^3$
4 rijeke (Južna Koreja)	/	/	0
Jezero Toolik	$1,2 \cdot 10^6$	/	/
Jezero Inba (Japan)	$4 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^4$	0
Zaljev Chesapeake (SAD)	Manja abundancija od flagelata	$2 - 4 \cdot 10^6$	/
29 rezervoara (Brazil)	Suho razdoblje: $0 - 2,5 \cdot 10^4$	$0,092 - 8,19 \cdot 10^3$	/
	Kišno razdoblje: $0 - 2 \cdot 10^3$	/	/

Jezero Constance (Njemačka)	1 • 10 ⁶ na 5,7°C; 4 • 10 ⁶ na 14,1°C	/	/
------------------------------------	---	---	---

Tablica 15. Usporedba abundancija autohtone mikrobne zajednice uzorkovanih lokvi (plavo osjenčane ćelije) i lokvi u svijetu za kolovoz.

LOKACIJA	Heterotrofni prokarioti (stanice/ml)	Heterotrofni nanoflagelati (stanice/ml)	Cijanobakterije (stanice/ml)
Barbariga	3187146 (3,2 • 10 ⁶)	7583 (7,5 • 10 ³)	0
Greco	4499697 (4,5 • 10 ⁶)	14720 (1,5 • 10 ⁴)	273
Palud	4235403 (4,2 • 10 ⁶)	11151 (1,1 • 10 ⁴)	3347 (3,3 • 10 ³)
Pili	4416060 (4,4 • 10 ⁶)	3186 (3,2 • 10 ³)	130
Cocchetto	4103813 (4,1 • 10 ⁶)	5904 (5,9 • 10 ³)	11291 (1,1 • 10 ⁴)
Cisterne	4525346 (4,5 • 10 ⁶)	12043 (1,2 • 10 ⁴)	187
Jezero Biwa (Japan)	4 - 6 • 10 ⁶	> 2 • 10 ³	/
Jezero Oubeira (Alžir)	2 - 6 • 10 ⁵	/	540,74 – 704,2 • 10 ³
4 rijeke (Južna Koreja)	/	/	2,3
Jezero Toolik	1,06 • 10 ⁶	/	/
Jezero Inba (Japan)	2 - 4 • 10 ⁶	3 - 4 • 10 ⁴	10 - 40 µg/L
Zaljev Chesapeake (SAD)	Manja abundancija od flagelata	1 - 3 • 10 ⁶	/
29 rezervoara (Brazil)	Suho razdoblje: 0 – 2,5 • 10 ⁴	0,092 – 8,19 • 10 ³	/
	Kišno razdoblje: 0 – 2 • 10 ³	/	/

Jezero Constance (Njemačka)	$5 \cdot 10^6$	/	/
--	----------------	---	---

Rezultate koje smo dobili za autohtonu mikrobnu zajednicu uzorkovanih lokacija usporedili smo s već postojećim podacima za lokacije sličnih fizikalno-kemijskih karakteristika kao uzorkovane lokacije (Tablica 14 i 15).

Zimske abundancije HP-a zabilježene na mjestima za uzimanje uzoraka bile su slične onima izmjerenim u drugim jezerima tijekom hladne sezone koja su pokazivala različite trofičke uvjete poput eutrofnog jezera Inba (Japan, $4 \cdot 10^6$ stanica/ml) (Kagami i sur., 2011) i Jezero Biwa (Japan, $2-3 \cdot 10^6$ stanica/ml) (Gurug i sur., 2001), oligotrofno-mezotrofno Bodensko jezero (Njemačka, $1-4 \cdot 10^6$ stanica/ml) (Montserrat i sur., 2006) i arktičko oligotrofno jezero Toolik (Aljaska, $1,2 \cdot 10^6$ stanica/ml) (Hobbie, 1983). Izmjerene koncentracije bile su više od koncentracija u oligotrofnom jezeru u Alžiru (jezero Oubeira, $1 \cdot 10^3$ stanice/ml) (Boussaidia i sur., 2015) i u mezotrofnim rezervoarima vode u Brazilu ($0-2,5 \cdot 10^3$ stanice/ml) (Pereira i sur., 2014). Također, tijekom ljeta brojnost HP-a bila je slična spomenutim jezerima: jezero Biwa ($4-6 \cdot 10^6$ stanica/ml) (Gurug i sur., 2001), jezero Inba ($2-4 \cdot 10^6$ stanica/ml) (Kagami i sur., 2011), jezero Toolik ($1,06 \cdot 10^6$ stanica/ml) (Hobbie, 1983) i Bodensko jezero ($5 \cdot 10^6$ stanica/ml) (Montserrat i sur., 2006). Izmjerene su količine ponovno bile veće od onih zabilježenih za ljeto u jezeru Oubeira ($2-6 \cdot 10^5$ stanica/ml) (Boussaidia i sur., 2015) i unutar vodospremnika u Brazilu ($0-2,5 \cdot 10^4$ stanica/ml) (Pereira i sur., 2014).

Zimske koncentracije HNF-a bile su usporedive s onima izmjerenima u umjerenim eutrofnim jezerima poput jezera Inba tijekom zime ($6 \cdot 10^4$ stanice/ml) (Kagami i sur., 2011) i jezera Biwa ($2 \cdot 10^3$ stanice/ml) (Gurung i sur., 2001).

Brojnost CB-a u istarskim lokvama znatno je manja u usporedbi s onima u kojima se događaju cvatnje CB-a, npr. u različitim lokvama u Bangladešu tijekom proljeća i ljeta, dostižući do $1,56 \cdot 10^5$ stanica/ml (Rahman i Jewel, 2008) i na nalazima Oberholster i sur. (2006) za uzorke s kraja ljeta (kolovoz i rujna) iz plitkog, umjetno miješanog urbanog jezera u Koloradu gdje su dobili maksimalnu abundanciju od čak $1,66 \cdot 10^9$ stanica/ml. CB u istarskim lokvama bile su usporedive s donjim dijelom

raspona koncentracije brojnosti CB izmjerenih u 30 ribnjaka u Brazilu ($2,9 \cdot 10^3$ - $4758 \cdot 10^3$ stanica/ml) (Costa i sur., 2014).

Kakvoća vode promatranih lokvi procijenila se prema podacima iz Uredbe o kakvoći voda za kupanje (NN, 2014) (Tablica 1). Prema standardu za ocjenu kakvoće voda nakon svakog ispitivanja, promatranjem zimske abundancije *E. coli* i crijevnih enterokoka (Tablica 9) ustanovila se izvrsna kakvoća voda na svim lokacijama. Prema podacima za ljeto (Tablica 10), na većini lokacija je kakvoća vode procijenjena kao izvrsna (najbolja kod lokve Greco – EC (0 CFU/100 ml), crijevni enterokoki (1 CFU/100 ml), osim lokve Cocaletto, gdje je abundancija *E.coli* (646 CFU/100 ml) bila iznad granice dobre kakvoće vode (≤ 400) stoga je kakvoća vode procijenjena kao nezadovoljavajuća. Također, kod lokve Cisterna abundancija crijevnih enterokoka iznosila je 1610 CFU/100 ml što prelazi granicu dobre kakvoće mora (≤ 1000) stoga je procijenjena nezadovoljavajućom.

Procjena ekološkog stanja vode za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje određivala se prema podacima navedenim u Uredbi o standardu kakvoće voda (NN, 2019). Procjena se vršila uspoređivanjem podataka graničnih vrijednosti Uredbe te podataka voda ispitivanih u ovom radu kroz obje sezone za ortofosfate i zasićenje kisikom. Secchi prozirnost nije se uzimala u obzir s obzirom na trofičnost ispitivanih sustava prema prozirnosti (supertrofična i hipertrofična staništa) te s obzirom na dubinu (vrlo plitka područja). Tijekom zimskog uzorkovanja lokva Cocaletto istaknula se po neprihvatljivom ekološkom stanju za oba pokazatelja (ortofosfat – $0,70 \mu\text{mol l}^{-1}$; zasićenje kisikom – 74,3%). Greco i Pili prema saturaciji kisikom spadaju u kategoriju dobrog ekološkog stanja, a Cisterna u kategoriju vrlo dobrog, no vrijednosti ortofosfata istih prelaze propisanu graničnu vrijednost za ortofosfate. Lokva Barbariga i močvara Palud po vrijednostima ortofosfata spadaju u kategoriju dobrog ekološkog stanja, a po saturaciji kisikom u kategoriju vrlo dobrog. Tijekom ljeta, prema vrijednostima fosfata, većina voda spada u kategoriju dobrog ekološkog stanja, osim Greca koji spada u vrlo dobru ($0,08 \mu\text{mol l}^{-1}$) i Cocaletta čije vrijednosti prelaze granične ($0,54 \mu\text{mol l}^{-1}$). Na svim lokacijama vrijednosti zasićenja kisikom ispod su propisanih graničnih vrijednosti za zasićenje kisikom stoga ne spadaju u kategoriju prihvatljivog ekološkog stanja.

7. Zaključci

Lokve i močvare jedne su od bitnih žarišta vodene bioraznolikosti. Ovi ekosustavi osim što su ključni za opstanak organizama kojima pružaju životni prostor, neophodna su i za kopnenu flore i faunu koja ih okružuje. Bitan su koridor za ptice selice i staništa za brojne endemske vrste, stoga ih je bitno zaštititi.

Ova su staništa plitka (manje od 3 m dubine), niske prozirnosti te ih karakteriziraju velike sezonske varijacije u fizikalno-kemijskim uvjetima kao što su temperatura, pH te zasićenost kisikom.

Abundancije autohtonih mikroorganizama bili su kroz obje sezone unutar granica njihovih prirodnih abundancija. Abundancije heterotrofnih prokariota i cijanobakterija bile su više zimi, dok su abundancije heterotrofnih nanoflagelata bile više ljeti, što je začuđujuće s obzirom da su HP glavni plijen HNF-a. Zimske abundancije autohtone mikrobne zajednice u istarskim vodenim staništima bile su slične onima izmjerenima u drugim vodenim staništima za HP i HNF, dok su koncentracije CB-a bile znatno manje. Također, abundancije HP-a i CB-a proporcionalne su koncentracijama hranjivih soli tijekom obje sezone.

Sanitarna kakvoća voda u ožujku je za sve promatrane lokacije bila izvrsna. Najbolju kakvoću je imala močvara Palud, a najlošiju je imala lokva Pili. Ljeti je većina lokacija imala izvrsnu kakvoću vode od kojih je najbolju imala lokva Greco. Najlošiju kakvoću imale su lokve Cocaletto i Cisterna gdje su abundancije prelazile granične vrijednosti. Kod Cocaletta je abundancija EC bila povišena zbog potencijalnog utjecaja septičkih jama koje se još uvijek koriste u neposrednoj blizini staništa, a kod Cisterne je bila povišena abundancija crijevnih enterokoka zbog ispiranja tla na kojima obitava stoka.

Za procjenu ekološkog stanja uspoređuju se granične vrijednosti s dobivenim vrijednostima za hranjive soli (ortofosfat) i zasićenje kisikom. Tijekom obje sezone Cocaletto se ističe po neprihvatljivom ekološkom stanju vode za oba pokazatelja. Barbariga i Palud zimi prema ortofosfatu spadaju u kategoriju dobrog ekološkog stanja, a prema zasićenosti kisikom vrlo dobrog, dok Greco i Pili prema zasićenju kisikom imaju dobro ekološko stanje, no koncentracije ortofosfata prelaze granične vrijednosti. Ljeti većina vodenih staništa ima dobro ekološko stanje prema ortofosfatu, dok Greco spada u kategoriju vrlo dobrog ekološkog stanja, no na svim lokacijama su vrijednosti

zasićenja kisikom ispod graničnih vrijednosti, stoga niti jedna lokacija nema prihvatljivo ekološko stanje.

S obzirom na važnost ovih staništa, vrlo je bitno poduzeti pravilne mjere zaštite i održivog upravljanja ovih područja. Bitno je provoditi česte monitoringe područja u svrhu kontrole parametara. Uz to, treba raditi na sprječavanju dotoka otpadnih voda i drugih izvora fekalija koji bi mogli narušiti sanitarnu kakvoću vode. Također je neophodno smanjiti broj korisnika i/ili posjetitelja te postaviti jasne mjere opreza i pravila ponašanja prema određenom području. Na posljetku, vrlo je bitno informirati i educirati ljude kako bi se osvijestili i razumjeli funkcioniranje kompletnog ekosustava.

8. Popis literature

Azam (1998). Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens

Béja, O., Suzuki, M.T. (2008). Photoheterotrophic marine prokaryotes, In Kirchman, D.L. (Ed), Microbial Ecology of the Oceans, pp. 131-157.

Boussadia M. I., Sehli N., Bousbia A., Ouzrout R., Bensouilah M. (2015). The effect of Environmental Factors on Cyanobacteria Abundance in Oubeira Lake (Northeast Algeria). Research journal of fisheries and hydrobiology, 10(14): 157-168.

Burns, N., Mcintosh, J., Scholes, P. (2005). Strategies for managing the lakes of Rotorua district, New Zeland. Lake and Reservoir Management, 21(1): 61-72.

Céréghino R., Biggs J., Oertli B., Declerck S. (2007). The ecology of European ponds: defining the characteristics of a neglected freshwater habitat. In: Oertli B., Céréghino R., Biggs J., Declerck S., Hull A., Miracle M.R. (eds) Pond Conservation in Europe, Dordrecht.

Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke, R., Waterbury, J., Welshmeyer, N. (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. Nature 334: 340-343.

Costa S., Appel, E., Macedo C.F. and Huszar V.L.M. (2014). Low water quality in tropical fishponds in southeastern Brazil. Annals of the Brazilian Academy of Sciences 86(3): 1181-1195.

Feachem, R. G. (1975). An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources (Note). Water research 9: 689-690.

Fuhrman, J.A., Hagström, A. (2008). Bacterial and archaeal community structure and its patterns, str. 45–90. u Kirchman, DL (prir.), Microbial Ecology of the Oceans, 2. izd. Wiley-Blackwell, New Jersey.

Geldreich, E. E., Kenner, B. A. (1969). Concepts of fecal streptococci in stream pollution. Journal of the Water Pollution Control Federation 41 (8, Part 2): R336-R352

Goeldner Pereira D., Cleide Rodrigues L., Lansac-Toha F. A., Machado Velho L. F. (2014). Planktonic heterotrophic nanoflagellate abundance along a trophic gradient

in subtropical reservoirs: influence of a bottom-up or top-down control mechanism?. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 36(2), 155-163.

Gurung T. B., Kagami M., Yoshida T. (2001). Relative importance of biotic and abiotic factors affecting bacterial abundance in Lake Biwa: an empirical analysis. *Limnology* 2:19-28

Heatwole, H., Wilkinson J. W. (2015). *Amphibian Biology*, vol.11: Status of Conservation and Decline of Amphibians: Eastern Hemisphere, Part 4: Southern Europe and Turkey. Exeter Pelagic Publishing.

Hobbie J. E., Corliss T. L., Peterson B. J. (1983). Seasonal Patterns of Bacterial Abundance in an Arctic Lake, *Arctic and Alpine Research*, 15:2, 253-259.

Ivančić, I., Degobbis, D. (1984). An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. *Water Research* 18(9), 1143-1147.

Johnson, P.W., Sieburth, J.M. (1979). Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography*; 24:928–935.

Kagami, M., Ishinabe J. (2011). Factors affecting seasonal variations in bacterial abundance in Lake Inba. *Japanese Journal of Limnology*, 72:65-70.

Krstulović, N., Šolić M. (2006). *Mikrobiologija mora. Institut za oceanografiju i ribarstvo*, Split

Mara, D. D. (1974). *Bacteriology for sanitary engineers*. Churchill Livingstone, Edinburgh and London, pp 209.

Montserrat Sala, M., Güde, H. (2006). Seasonal dynamics of pelagic and benthic (littoral and profundal) bacterial abundances and activities in a deep prealpine lake (L. Constance). *Archiv für hydrobiologie*, 167(1/4), 351-369.

Mortimer, C. H. (1981). The oxygen content of air-saturated fresh waters over ranges of temperature and atmospheric pressure of limnological interest. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen*, 22(1), 1-23.

Natura Histrica (2021). Poseban ornitološki rezervat Palud, dostupno na: <http://www.natura-histrica.hr/hr/posjete/poseban-ornitoloski-rezervat-palud-2> (06.07.2021.)

NN (2009). Narodne novine – Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, br.153/09, dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_07_87_2460.html (02.07.2021.)

NN (2014). Narodne novine – Uredba o kakvoći voda za kupanje, br.51/14, dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_04_51_978.html (02.07.2021.)

NN (2019). Narodne novine – Uredba o standardu kakvoće voda, br.96/19, dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_10_96_1879.html (05.07.2021.)

Oberholster P. J., Botha A.M., Cloete T. E. (2006). Toxic cyanobacterial blooms in a shallow, artificially mixed urban lake in Colorado, USA. *Lake and Reservoirs*, Vol 11 (2) pp. 111-123.

Parsons, T.R., Maita, Y. and Lalli, C.M. (1984). A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Toronto, 173 pp.

Partensky, F., Blanchot, J., Vaulot, D. (1999). Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Bulletin de l'Institut océanographique* 19:457–475.

Porter K. G, Feig Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*; 25, 943–8.

Radošević, M. (2013). From *Gambusia* Fish to the Paris Green Chemical: How Malaria was overcome in Istria. *Journal of Contemporary History*, issue no. 3 509-530 pp.

Rahman S. and Jewel M. A. S. (2008). Cyanobacterial blooms and water quality in two urban fish ponds *University Journal of Zoology*, Rajshahi University. Vol. 27, pp. 79-84

Ricca, D. M., and Cooney J. J. (1998). Coliphages and indicator bacteria in birds around Boston Harbor. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 21:28-30.

Sanders R. W., Caron D. A., Berninger U. G. (1992). Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison Marine Ecology Progress Series. Vol 86, 1-14.

Sherr E. B., Caron D. A., Sherr B. F. (1993). Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy, In: Kemp P, Sherr B, Sherr E Cole JJ (eds). Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Boca Raton: Lewis publishers, 1993, 213–229.

Šilović, T. (2012). Struktura i dinamika pikofitoplanktona Jadrana s naglaskom na cijanobakterije roda *Synechococcus*. Doktorski rad, *Sveučilište u Zagrebu, PMF*; pp. 150.

Špoljar, M., Dražina, T., Lajtner, J., Kovačević, G., Pestić, A., Matijašec, D. i Tomljanović, T. (2018). Impact of water level fluctuation in the shaping of zooplankton assemblage in a shallow lake- Croatian Journal of Fisheries, 76 (1), 27-34.

Špoljar, M., Tomljanović, T. i Lalić, I. (2011). Eutrophication impact on zooplankton community: a shallow lake approach. The holistic approach to environment, 1 (4), 131-142.

Takahashi M. K., Kikuchi K., Hara Y. (1985). Importance of picocyanobacteria (unicellular blue-green algae) in the phytoplankton population of the coastal waters off Japan. Marine Biology; 89:63–69.

Vaquier-Sunyer, R., Duarte, C. M. (2008). Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(40), 15452-15457.

Waterbury, J.B., Stanier R.Y. (1981). Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments. In the Prokaryotes, A Handbook on Habits, Isolation and Identification of Bacteria, Vol I, M.P.Starr, H.Stolp, H.G.Truper, A.Balows and H.G.Schelegel (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 221-223

Waterbury, J.B., Watson, S.W., Guillard, R.R.L., Brand, L.E. (1979). Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. Nature 277:293–294.

WHO (1994). Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas. Part I: General guidelines. Long-term Programme for Pollution Monitoring and Research in the Mediterranean Sea (MED/POL Phase II).

Zacharias, I., Zamparas, M. (2010). Mediterranean temporary ponds. A disappearing ecosystem. *Biodiversity and Conservation* 19, 3827–3834.

Zavřel, T., Sinetova, M. A., Červený, J. (2015). Measurement of chlorophyll a and carotenoids concentration in cyanobacteria. *Bio-protocol*, 5(9): e1467-e1467.

ZZJZDNZ (2021). *Escherichia coli*. Dostupno na <https://www.zzjzdnz.hr/hr/ona/rjecnik-pojmova/964>. Pristupljeno 4.7.2021.

9. Popis slika

Slika 1. Lokva Barbariga.

Slika 2. Lokva Greco.

Slika 3. Močvara Palud.

Slika 4. Lokva Cocaletto.

Slika 5. Lokva Cisterna.

Slika 6 Lokva Pili.

Slika 7. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za temperaturu (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 8. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za salinitet (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 9. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za prozirnost vode (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 10. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za saturaciju kisikom (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 11. Grafički prikaz usporedbe izmjerenih podataka na svim lokacijama za BOD5 (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 12. Grafički prikaz abundancije heterotrofnih prokariota na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 13. Grafički prikaz abundancije heterotrofnih nanoflagelata na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 14. Grafički prikaz abundancije cijanobakterija na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 15. Grafički prikaz abundancije bakterije *E. coli* na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 16. Grafički prikaz abundancije fekalnih koliforma na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 17. Grafički prikaz abundancije crijevnih streptokoka na svim lokacijama uzorkovanja (lijevo – ožujak 2019., desno – kolovoz 2019.).

Slika 18. Grafički prikaz usporedbe koncentracija klorofila a na svim lokacijama tijekom ljeta i zime 2019.

Slika 19. Grafički prikaz koncentracija fosfora u svim lokvama (ožujak 2019.).

Slika 20. Grafički prikaz koncentracija fosfora u svim lokvama (kolovoz 2019.).

Slika 21. Grafički prikaz koncentracija nitrita u svim lokvama (ožujak 2019.).

Slika 22. Grafički prikaz koncentracija nitrita u svim lokvama (kolovoz 2019.).

Slika 23. Grafički prikaz koncentracija nitrata u svim lokvama (ožujak 2019.).

Slika 24. Grafički prikaz koncentracija nitrata u svim lokvama (kolovoz 2019.).

Slika 25. Grafički prikaz koncentracija amonijaka u svim lokvama (ožujak 2019.).

Slika 26. Grafički prikaz koncentracija amonijaka u svim lokvama (kolovoz 2019.).

Slika 27. Grafički prikaz koncentracija silikata u svim lokvama (ožujak 2019.).

Slika 28. Grafički prikaz koncentracija silikata u svim lokvama (kolovoz 2019.).

10. Popis tablica

Tablica 1. Standardi za ocjenu kakvoće vode nakon svakog ispitivanja.

Tablica 2. Standardi za ocjenu kakvoće voda na kraju sezone kupanja i za tri prethodne sezone kupanja.

Tablica 3. Granične vrijednosti emisija pročišćenih komunalnih otpadnih voda koje se ispuštaju u površinske vode, a koje se koriste za kupanje, rekreaciju i referentne metode ispitivanja (izvor: NN 87/2010-2460)

Tablica 4. Granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje,

Tablica 5. Fizikalno-kemijski parametri vode u ožujku 2019.

Tablica 6. Fizikalno-kemijski parametri vode u kolovozu 2019.

Tablica 7. Abundancija autohtone mikrobne zajednice u lokvama u ožujku 2019.

Tablica 8. Abundancija autohtone mikrobne zajednice u lokvama u kolovozu 2019.

Tablica 9. Abundancija fekalnih indikatora u lokvama u ožujku 2019.

Tablica 10. Abundancija fekalnih indikatora u lokvama u kolovozu 2019.

Tablica 11. Rezultati koncentracija klorofila a na svim lokacijama tijekom dvije sezone (zima i ljeto 2019.).

Tablica 12. Rezultati hranjivih soli za sve lokacije (ožujak 2019.).

Tablica 13. Rezultati hranjivih soli za sve lokacije (kolovoz 2019.).

Tablica 14. Usporedba abundancija autohtone mikrobne zajednice uzorkovanih lokvi (plavo osjenčane ćelije) i lokvi u svijetu za ožujak.

Tablica 15. Usporedba abundancija autohtone mikrobne zajednice uzorkovanih lokvi (plavo osjenčane ćelije) i lokvi u svijetu za kolovoz.