

# Struktura mikrobne zajednice u uvali Valdibora

---

Venier, Roberta

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:137:669128>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Roberta Venier

# STRUKTURA MIKROBNE ZAJEDNICE U UVALI VALDIBORA

ZAVRŠNI RAD

Pula, 2016

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Roberta Venier

# STRUKTURA MIKROBNE ZAJEDNICE U UVALI VALDIBORA

ZAVRŠNI RAD

Studijski smjer: Znanost o moru

JBAG: 2410992368609

Kolegij: Analitička kemija i instrumentalne metode analize

Mentor: dr.sc. Mirjana Najdek Dragić

Neposredni voditelj: dr.sc. Paolo Paliaga

Pula, 2016

## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Roberta Venier, kandidatkinja za prvostupnicu (baccalaureus) znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mog 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 necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da ni jedan dio rada nije iskorišten za neki drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student:

---

U Rovinju, 28. lipnja 2016.

Ovaj Završni rad predstavlja završetak Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru pri Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli. Rad je izrađen u Laboratoriju za morsku mikrobnu ekologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod vodstvom dr. sc. Mirjane Najdek Dragić, i dr.sc. Paola Paliaga i predan na ocjenu preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnice (Baccalaureus) znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentore završnog rada imenovao dr.sc. Mirjanu Najdek Dragić, i dr.sc. Paola Paliagu.

Povjerenstvo za ocjenu i obranu:

Predsjednik: dr.sc. Ingrid Ivančić

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Mentori: dr. Sc. Paolo Paliaga

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

dr.sc. Mirjana Najdek Dragić

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Član: dr.sc. Ljiljana Iveša

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Datum i mjesto obrane završnog rada: 28. lipnja 2016., Rovinj

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada

Roberta Venier

## ZAHVALA

Od srca zahvaljujem:

.. mentoru dr.sc. Paolu Paliagi na konstantnoj potpori, strpljenu, ohrabrenju i uglednom primjeru profesionalnosti i ljudskosti, zato što je uvijek bio prisutan sa svojim kvalitetnim savjetima na terenu, laboratoriju i tijekom pisanja rada.

.. mentorici dr.sc. Mirjani Najdek Dragić koja je omogućila stvaranje ovog rada.

.. dr.sc. Dragici Fuks koja me uvela u čaroban svijet mikrobiologije.

.. dr.sc. Renatu Batelu koji je uvijek pouzdano bio uz nas tijekom našeg školovanja.

.. Dariju Devescoviju koji je omogućio moje uzorkovanje sa broda „Burin“.

.. mojim kolegama s kojima sam provela nezaboravne trenutke, puno smijeha i sijećanja

.. mojim prijateljima koji su uvijek imali dobru riječ kada je bilo najteže.

.. a pogotovo mojoj obitelji koja me podržila u najtežim trenucima, koja je uvijek vjerovala u mene i bez koje ne bi bila ono što danas jesam.

# STRUKTURA MIKROBNE ZAJEDNICE U UVALI VALDIBORA

Roberta Venier

U ovoj studij procijenjen je utjecaj gradskih i industrijskih otpadnih voda na akvatorij sjeverne luke grada Rovinja. U tu svrhu provedena je sanitarna kontrola mora i analiza distribucije mikroorganizma na području cijele uvale Valdibora. Uzorkovanja vodenog stupca provedena su tijekom lipnja 2014 na mreži od 13 postaja. Stanje vode na referentnim postajama koje nisu bile pod direktnim utjecajem gradskog onečišćenja uspoređeno je sa područjima pod utjecajem otpadnih voda.

Sanitarna kvaliteta mora je bila nezadovoljavajuća kraj ispusta bolničkog naselja i povremeno kraj gradske tržnice, no najkritičnije stanje zabilježeno je u djelu uvale Valdibora izloženom ispustu tvornice za preradu ribe gdje su razine fekalnih indikatora bile usporedive s onima oko glavnog kanalizacijskog ispusta grada Rovinja.

Heterotrofni nanoflagelati i cijanobakterije imali su relativno nisku brojnost, dok brojnost heterotrofnih bakterija oko ispusta rovinjske tvornice za preradu ribe prelazila je granice prirodnih varijacija za rovinjsko priobalno more.

Izmjerene vrijednosti saliniteta i temperature vodenog stupca uvale Valdibora bile su tipične za istočno priobalje sjevernog Jadrana.

Najniže koncentracije kisika zabilježene su na području ispusta tvornice za preradu ribe zbog značajnog unosa organske tvari i njene razgradnje dok je saturacija kisikom u ostatku uvale bila relativno visoka.

**Ključne riječi:** otpadne vode, mikroorganizmi, sanitarna kontrola mora, hidrografski parametri

# STRUCTURE OF THE MICROBIAL COMMUNITY IN THE BAY OF VALDIBORA

Roberta Venier

This study assesses the impact of municipal and industrial wastewaters on the aquatorium of the northern port of the town of Rovinj. For this purpose, sanitary control of seawater and the distribution of microorganisms were carried out throughout the entire area of Valdibora Bay. Sampling of the water column was performed during June 2014 on a network of 13 stations. The conditions of the water at the reference stations, which were not under the direct influence of sewage pollution, were compared to the areas affected by wastewaters.

The sanitary quality of the seawater was unsatisfactory near the outfall of the hospital complex and, in some cases, near the old town market. The most critical conditions were recorded in the part of Valdibora Bay exposed to the effects of the fish processing factory outfall, where the concentrations of faecal indicators were comparable to those recorded around the main sewage outfall of Rovinj.

The number of heterotrophic nanoflagellates and cyanobacteria was relatively low, while the number of heterotrophic bacteria around the outfall of the fish cannery exceeded the limits of naturally-occurring variations for the coastal waters of Rovinj.

The salinity and temperature values in the water column of Valdibora Bay were typical for the east coast of the North Adriatic.

The lowest concentrations of oxygen were recorded in the area around the outfall of the fish cannery due to the influx of organic matter and its degradation in the sea while the oxygen saturation in the rest of the bay was relatively high.

**Key words:** wastewaters, microorganisms, sanitary quality of the seawater, hydrographic parameters.



## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Ciljevi i hipoteze istraživanja.....	2
2.1. Ciljevi istraživanja.....	2
2.2. Hipoteze .....	2
3. Literaturni pregled.....	3
3.1. Bakterijske zajednice u moru .....	3
3.2. Nanoflagelati .....	8
3.3. Cijanobakterije .....	10
3.3. Indikatori fekalnog onečišćenja .....	12
4. Materijali i metode .....	15
4.1. Područje istraživanja .....	15
4.2. Uzorkovanje .....	16
4.3. Hidrografski uvjeti .....	17
4.4. Sanitarna kvaliteta mora.....	17
4.5. Brojnost heterotrofnih bakterija, flagelata i cijanobakterija.....	19
5. Rezultati i diskusija .....	20
5.1. Hidrografski uvjeti .....	20
5.2. Sanitarna kvaliteta mora.....	22
5.3. Brojnost heterotrofnih bakterija .....	26
5.4. Brojnost heterotrofnih nanoflagelata.....	28
5.5. Brojnost cijanobakterija .....	29
6. Zaključci.....	31
7. Literatura .....	32

## 1. Uvod

Onečišćenje priobalnih područja otpadnim vodama predstavlja jedan od glavnih problema okoliša na globalnoj skali (Garrido-Perez i sur., 2008). Otpadne vode donose u more razne tvari poput: pesticida, deterdženata, teških metala, suspendiranih čestica, hranjivih soli i veliku količinu fekalnih mikroorganizma ljudskog i životinjskog porijekla (Gonzalez-Fernandez i sur., 2010). Unosom patogena u morsku okolinu povećava se mogućnost širenja različitih infekcija i bolesti kod ljudi i životinja direktno kroz morsku vodu i sediment ili indirektno kroz prehrambeni lanac. Također, onečišćenje otpadnim vodama narušava gospodarsko-estetsku vrijednost onečišćenog područja i ugrožava morski ekosustav. Otpadne vode koje su inače bogate organskim i anorganskim tvarima mogu uzrokovati promjene u veličini, strukturi, proizvodnji i funkciji autotrofne i heterotrofne mikrobne zajednice prihvatnog mora i na taj način poremetiti funkcioniranje cijelog morskog priobalnog ekosustava. Budući da su mikrobne zajednice jedna od temeljnih karika morskog sustava praćenje njihovog stanja u onečišćenim područjima može pridonijeti boljem razumijevanju utjecaja antropogenih aktivnosti na morski ekosustav.

Za priobalne gradove kao što su Rovinj, gdje je turizam jedna od najvažnijih ekonomskih djelatnosti, očuvanje visoke kvalitete priobalnog mora predstavlja jedan od strateških temelja razvoja. Sjeverna luka grada (Uvala Valdibora) izložena je ispuštanju gradskih i industrijskih kanalizacijskih voda. Tvornica za preradu ribe ispušta mjesečno između 15000 i 20000 m<sup>3</sup> voda dok su gradski ispusti znatno manji s oko 1000 m<sup>3</sup> mjesečno. Uvala se koristi za privremeno sidrenje turističkih i ribarskih brodova, rekreativni ribolov, ronjenje, veslanje i kupanje na uređenim plažama sa ugostiteljskim sadržajima. Blizina starogradske jezgre, daje dodatnu estetsku, kulturnu i arhitektonsku vrijednost ovoj uvali. Jedan od prvih koraka potrebnih za očuvanje uvale Valdibora je određivanje stanja okoliša na tom području. Kako bi se procijenio antropogeni pritisak na tu uvalu i potencijalni rizik za ljudsko zdravlje analizirati će se struktura morske mikrobne zajednice i sanitarna kvaliteta mora.

## **2. Ciljevi i hipoteze istraživanja**

### **2.1. Ciljevi istraživanja**

Kvantificirati brojnost glavnih komponenti mikrobne zajednice tijekom lipnja u uvali Valdibora.

Analizirati sanitarnu kvalitetu mora u uvali Valdibora.

Istražiti utjecaj gradskog i industrijskog onečišćenja na morsku mikrobnu zajednicu.

### **2.2. Hipoteze**

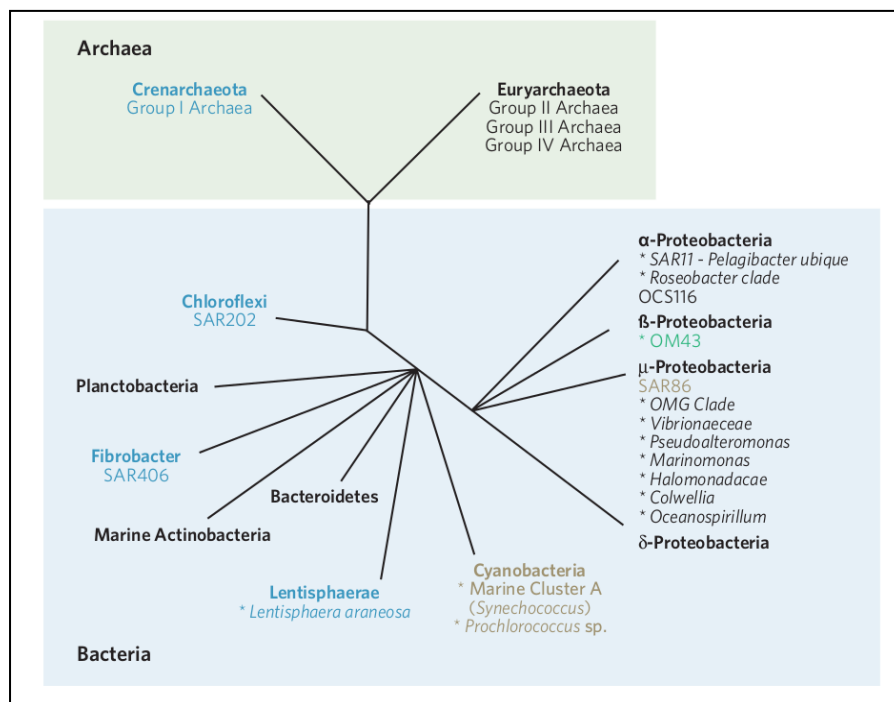
Industrijske i komunalne otpadne vode značajno utječu na brojnost i strukturu mikrobne zajednice u moru.

Ispuštanje organske tvari ribljeg porijekla iz tvornice za preradu ribe značajno utječe na sanitarnu kvalitetu mora.

### 3. Literaturni pregled

#### 3.1. Bakterijske zajednice u moru

Heterotrofne bakterije su najbrojnija komponenta morskih mikrobnih zajednica. Njihova se brojnost kreće u rasponu od  $10^3$  do  $10^8$  stanica po mililitru te ovisi o trofičkom statusu određenog područja (Sanders i sur., 1992, Šolić i Krstulović, 2000). Po veličini spadaju u klasu pikoplanktona (od 0,2 do  $2\mu\text{m}$ ), imaju vrlo jednostavnu morfologiju i visoku specifičnu stopu rasta (oko 0,4/sat) koja im omogućava udvostručavanje populacije tijekom kratkog vremena (oko 2 dana) (Krstulović i Šolić, 2006). Bakterije spadaju u prokariote i tradicionalno mogu biti klasificirane pomoću bojanja po Gramu, oblikom stanica, potrebom za kisikom, pokretljivošću, te metaboličkim i prehranbenim osobinama (Krstulović i Šolić, 2006). Međutim u zadnjim se desetljećima njihova klasifikacija sve više bazira na filogenetskim analizama.



Slika 1. Shematski prikaz filogenetskog odnosa glavnih morskih prokariota koji posjeduju jednog zajedničkog pretka. Crna slova ukazuju na sveprisutne grupe mikroorganizama u moru. Zelena boja označava mikroorganizme koje žive u priobalnim ekosustavima, skupine označene sivom bojom tipične su za fotičku zonu dok su plave skupine ograničene na mezopelagičnu zonu.

Najveći dio zajednice prokariotskog pikoplanktona na globalnoj razini čini razred *Alphaproteobacteria* (koljeno *Proteobacteria*; Slika 1). Predstavnici ove skupine bakterija mogu sačinjavati i do 50% ukupne pikoplanktonske zajednice u eufotičkoj i 25% u mezopelagičkoj zoni (Cohan, 2001; Carlson i sur., 2009; Vergin i sur., 2013; ). U ovoj skupini bakterija stanice su manje od 1 µm i dobro su prilagođene oligotrofnim uvjetima koji vladaju u velikom dijelu oceana. Većina njih su Gram-negativne, dok ostatak spada u Gram varijabilne zbog nedostatka peptidoglikana.

Razred *Betaproteobacteria* svrstava se u Gram-negativne proteobakterije. One su većinom dobro prilagođene različitim staništima i okolišima. Ova je skupina raznolika i često se nalazi u slatkim vodama, u boćatim vodama estuarija (Glockner i sur., 2000; Newton i sur., 2011 ) te u morskim ekosustavima smanjenog saliniteta poput Baltičkog mora (Riemann i sur., 2008; Andersson i sur., 2010 Herlemann i sur., 2011).

Koljeno *Actinobacteria* je skupina koja se često nalazi u morskim pelagičkim ekosustavima, međutim njezina brojnost nije toliko velika kao u slatkim vodama ili u tlu (Fuhrman i Hagström, 2008). Poput razreda *Betaproteobacteria* predstavnici ovog koljena brojniji su u boćatim vodama estuarija rijeka (Riemann i sur., 2008; Andersson i sur., 2010 Herlemann i sur., 2011) te u morima smanjenog saliniteta poput Baltičkog (Riemann i sur., 2008; Andersson i sur., 2010 Herlemann i sur., 2011). Pripadnici skupine *Actinobacteria* pokazuju sposobnost razgradnje različitih spojeva poput agara, hitina, celuloze i ugljikovodika (Fuhrman i Hagström, 2008).

Razred *Gammaproteobacteria* još je jedna skupina koljena *Proteobacteria*, brojna u vodenom stupcu i morskim sedimentima (Slika 1.) (Fuhrman i Hagström, 2008). Uključuje vrstu *Vibrio cholerae*, uzročnika kolere u ljudi, vrstu *Vibrio vulnificus*, povezanu s infekcijom rana, vrstu *Vibrio anguillarum*, patogena riba te mnoge nepatogene vrste (Korlević, 2015). Ostali poznatiji rodovi razreda *Gammaproteobacteria* koji su lako uzgojivi su: *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Schewanella*, *Glaciecola*, *Ocanospirillum* i *Colwellia* (Fuhrman i Hagström, 2008, Korlević, 2015).

Neke podskupine rodova *Gammaproteobacteria* specijalizirane su u korištenju jednostavnih šećera ili monomera aminokiselina koji se javljaju u visokim koncentracijama.

Bakterije koje pripadaju razredu *Deltaproteobacteria* mogu se naći u površinskim morskim sedimentima gdje imaju važnu ulogu u procesima mineralizacije (Wang i sur., 2013), u dubokim dijelovima oceana (Schattenhofer i sur., 2009) i u područjima gdje je prisutno antropogeno onečišćenje (Zhang i sur., 2007).

Predstavnici koljena *Bacteroidetes* važan su sastavni dio prokariotske pikoplanktonske zajednice mora (Slika 1). Radi se o vrlo raznolikoj skupini bakterija čiji su predstavnici pronađeni u mnogim staništima od jezera, otvorenih oceana, sedimenata, hidrotermalnih izvora i morskog leda do probavnog trakta sisavaca (Fuhrman i Hagström, 2008). Iako u površinskim vodama oceana čine samo oko 2-4% pikoplanktonske zajednice (Shattenhofer i sur., 2009) predstavnici ovog koljena imaju važnu ulogu u razgradnji kompleksne organske tvari (Kirchmann, 2002). Dokazana im je uloga u razgradnji spojeva visoke molekularne mase poput proteina i hitina (Cottrell i sur., 2000; Cottrell i sur., 2005).

Skupini morskih prokariota pripadaju i arheje koje se morfološki razlikuju od bakterija jer imaju jednostruku staničnu membranu i nemaju peptidoglikan (spoj šećera i aminokiselina) u staničnim stjenkama. Pored toga, dok su stanične membrane bakterija i eukariota građene pretežno od lipida koji su glicerolni esteri, membrane archaea su građene od lipida koji su glicerolni eteri. Arheje često žive u ekstremnim uvjetima ali njihova brojnost u određenim dijelovima oceana može biti jako visoka. Ukupno se procjenjuje da u oceanima ima u prosjeku oko  $1,3 \times 10^{28}$  arheja i  $3,1 \times 10^{28}$  bakterija.

Do danas je opisano oko 250 vrsta arheja koje su svrstane u dva koljena: *Euryarchaeota* i *Crenarchaeota* (Korlević, 2015). Koljeno *Euryarchaeota* karakteristično je za površinske vode (Kirchman, 2008) dok je koljeno *Crenarchaeota* brojnije u dubokim vodama (Herndl i sur., 2005). Čini se kako predstavnici koljena *Crenarchaeota* mogu biti autotrofi i heterotrofi (Fuhrman i Hagström, 2008). Smatra se kako dio pripadnika ovog koljena fiksira ugljikov dioksid kemoautotrofijom koristeći amonijak kao davatelj elektrona i izvor energije utječući tako na globalni ciklus dušika (Könneke i sur., 2005; Francis i sur., 2005; De Corte i sur.; 2009). Fiziologija predstavnika koljena *Euryarchaeota* manje je poznata (Korlević, 2015).

Bakterije su sveprisutne u moru te imaju temeljnu ulogu u kruženju nutrijenata u hranidbenim mrežama (Azam, 1998). DOC (dissolved organic carbon) je za heterotrofne bakterije glavni izvor energije i ugljika. One ga vrlo aktivno uzimaju i koriste iz svog okoliša iako su koncentracije otopljenih labilnih spojeva u vodi niske (od  $10^{-8}$  do  $10^{-10}$  M) (Williams, 1986), pa su bakterije razvile niz mehanizama da bi se održale u morskom okolišu. Bakterije imaju izuzetno efikasni transportni sustav kroz staničnu membranu i visoki omjer (oko 10) površine i volumena stanice. Uz to, sposobne su izlučiti egzoenzime pomoću kojih hidroliziraju partikulatnu i otopljenu organsku tvar do monomera i oligomera koji mogu biti iskorišteni.

Većina morskih bakterija je pokretljiva a njihova brzina kretanja varira u rasponu od 2 do 40  $\mu\text{m/s}$  (Šolić i Krstulović, 2000). U uskoj vezi s pokretljivošću bakterija je kemotaksija, odnosno sposobnost bakterija da osjete organsku tvar koja ih privlači. Stoga bakterije mogu mijenjati svoj prostorni raspored kao odgovor na gradijent hranjivih tvari u njihovom okolišu. Jedan primjer takvog gradijenta su “fikosfere”, tj. zone oko stanice fitoplanktona, gdje je povećana koncentracija DOC-a. Sposobnost bakterija da velikom brzinom mogu ukloniti znatan dio raspoloživog DOC-a u moru (Azam i Fuhrman, 1984) daje im prednost u kompeticiji s drugim morskim organizmima koji koriste otopljenu organsku tvar.

Bakterije imaju i višestruku ulogu u vezi s anorganskim hranjivima i to: u uvjetima kad imaju dovoljno otopljenog organskog dušika (DON) i otopljenog organskog fosfora (DOP), mineraliziraju organsku tvar i oslobađaju dušik i fosfor koji su potrebni za primarnu proizvodnju, međutim kada se smanjuje količina raspoloživih hranjivih soli, bakterije mogu postati kompetitori fitoplanktonu. To znači da ovisno o količini anorganskih i organskih supstrata, bakterije će biti neto proizvođači ili neto potrošači anorganskih soli (Azam i Smith, 1991).

Broj bakterija može biti značajno smanjen interakcijama sa drugim mikroorganizmima kao što su mikro i nanoflagelati, cilijati i fitoplankton. Na primjer nanoplanktonski protisti mogu ukloniti od 54 do 75% bakterijske populacije na dan (Caron i sur., 1992). Ovim putem se stvara zaseban protok energije kroz koji se dio primarne proizvodnje, izlučen u okoliš kao otopljena organska tvar, vraća u glavnu hranidbenu mrežu putem mikrobnog kruga (Azam i sur., 1983). Na brojnost bakterija znatan utjecaj imaju i virusi budući da mogu ukloniti oko 20% dnevne bakterijske proizvodnje (Šolić i Krstulović, 2000).

U sjevernom Jadranu bakterije pokazuju brojnosti u rasponu od  $0,1 \cdot 10^9$  do  $6 \cdot 10^9$  stanica po litri dok se u središnjem Jadranu kreću od  $0,41 \cdot 10^9$  do  $3,43 \cdot 10^9$  (Krstulović i Šolić, 2006). Najviše vrijednosti izmjerene su u površinskom sloju u zapadnom djelu sjevernog Jadrana (Fuks i sur., 2005). S druge strane vrijednosti brojnosti u pridnenom sloju niže su od onih u površinskim vodama i ne mijenjaju se puno u smjeru istok-zapad. Tijekom zime brojnost heterotrofnih bakterija se smanjuje i relativno je ravnomjerno raspoređena u cijelom vodenom stupcu. Kad se more zagrije broj bakterija se postepeno povećava, pogotovo u površinskom sloju.

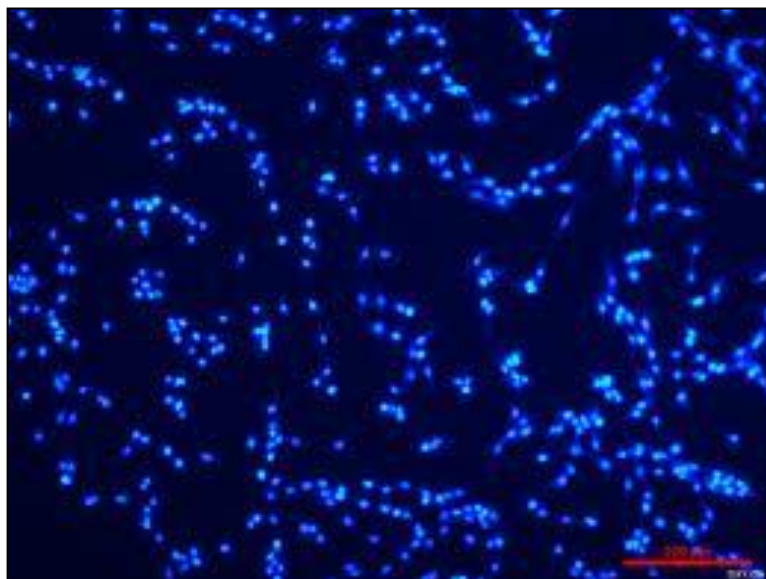
Bakterije u Jadranu pokazuju pozitivnu korelaciju s temperaturom i sa klorofilom *a*, dok je njihova korelacija sa salinitetom negativna označavajući da hranjive soli koje dolaze sa rijekama imaju važnu ulogu podržavajući rast fitoplanktona i proizvodnju organske tvari u

moru (Fuks i sur., 2005). Bakterije brzo odgovaraju na takve promjene i mogu poslužiti kao dobar pokazatelj perturbacija u morskom ekosustavu (Cavari i Colwell, 1988).

Tijekom sedamdesetih godina dvadesetog stoljeća, znanstvenici su smatrali da je uloga bakterija u oceanskoj hranidbenoj mreži sekundarna. Tradicionalne metode brojanja bakterija (na primjer uzgajanje na agaru) davale su kao rezultat malu brojnost, koja se značajno razlikovala od one realne. Kriva procjena brojnosti bakterija bila je i posljedica metodologije koja se temeljila na korištenje planktonskih mreža s okom većim od 60  $\mu\text{m}$  gdje bi se prikupile samo alge kremenjašice i kopepodi dok bi bakterije prošle kroz mrežu. Pomoću novih metodologija dobivene su preciznije procijene bakterijske brojnosti i značajnosti njihove uloge u morskom ekosustavu. Tehnika direktnog mikroskopskog brojanja (engl. *direct microscopic counting*) razvijena je tijekom sedamdesetih godina (Francisco i sur., 1973; Hobbie i sur., 1977) i temelji se na brojanju stanica epifluorescentnim mikroskopom. Ovom metodom znanstvenici su dobili uvid u pravu veličinu mikrobne zajednice.

Azam (1983) u članku “The Ecological Role of Water Column Microbes in the Sea” (Ekološka uloga mikroba u vodenom stupcu u moru) po prvi put uvodi termin mikrobna petlja i napominje da protisti koji se hrane bakterijama pripadaju istoj veličinskoj klasi kao i fitoplankton te vjerojatno predstavljaju važan dio ishrane planktonskih račića. Mikrobna petlja je termin koji zapravo opisuje trofički put u morskom okolišu gdje se otopljeni organski ugljik (DOC) iz izlučevina fitoplanktona i mrtvih stanica vraća u hranidbenu mrežu preko ugradnje u bakterijama i njihove predacije od strane heterotrofnih protista. Mikrobna petlja dominira u sustavima siromašnim otopljenim organskim dušikom (DON) gdje bakterije koriste polisaharide izlučene od strane fitoplanktona i anorganski dušik u obliku  $\text{NH}_4^+$ . U takvim sustavima bakterije predstavljaju kompeticiju fitoplanktonu i preuzimaju glavnu ulogu u prijenosu ugljika i energije prema višim razinama hranidbenog lanca. Značajnost mikrobne petlje mijenja se ovisno o različitim trofičkim uvjetima. U eutrofnim područjima njena uloga je zanemariva. U mezotrofnim vodama značajnost mikrobne petlje je sekundarna, dok je u oligotrofnim područjima veoma važna. Mediteransko more je u većem dijelu oligotrofni sustav u kojemu mikrobna petlja ima temeljnu ulogu u procesima recikliranja ugljika i protoka energije prema višim trofičkim razinama.



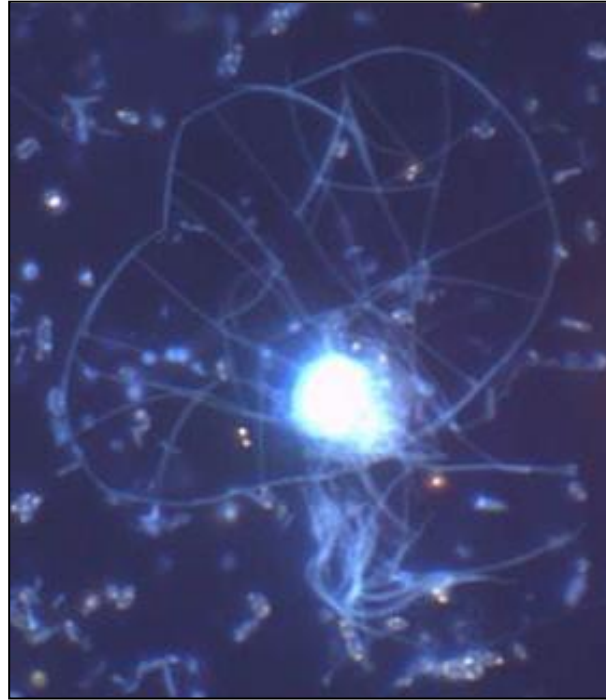


Slika 2. Heterotrofne bakterije obojane DAPI bojom, izložene UV svjetlu promatrane epifluorescentnim mikroskopom

### 3.2. Nanoflagelati

Bičaći ili flagelati (Slika 3.) nadrazred su jednostaničnih organizama koji okupljaju oblike posrednih značajki između životinjskog i biljnog carstva. Određene skupine flagelata imaju sposobnost fotosinteze i posjeduju plastide u kojima se nalazi klorofil i ponekad još koji različiti pigment. Bičaći koji se hrane heterotrofno fagocitiraju male organizme ili čestice organske tvari i predstavljaju najznačajniju skupinu predatora pikoplanktonskih mikroorganizma (Fenchel, 1980; McManus i Furhman, 1988; Krstulović i Šolić, 2006). Nanoplanktonski protisti veliki su potrošači prokariota i mogu ukloniti od 54% do 75% cijanobakterija i heterotrofnih bakterija svaki dan (Caron i sur., 1991). Stopa kojom heterotrofni nanoflagelati (HNF) konzumiraju bakterijski plijen se za najveći broj morskih okoliša kreće u rasponu od 1 do 100 bakterija  $\text{HNF}^{-1}\text{h}^{-1}$ . U sjevernom Jadranu ta vrijednost iznosi u prosjeku 85 bakterija  $\text{HNF}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Turk i sur., 1992). Zanimljivo je da jedan flagelat u jednom satu može profiltrirati od 1 do 100 nl mora i ukloniti jedinke svojih pljenova koji se nalaze u toj vodi (Fuks, 1995). HNF imaju dva glavna načina uzimanja hrane, s jedne strane filtracijom a s druge hvatanjem plijena. S obzirom da se HNF selektivno hrane s određenom veličinskom kategorijom, oni istovremeno kontroliraju brojnost bakterija i njihovu veličinsku raspodjelu (Ammerman i sur., 1984).

Ova skupina morskih protista obuhvaća veliki broj flagelatnih stanica dimenzija od 2 do 20  $\mu\text{m}$  koji nemaju kloroplaste (Krstulović i Šolić, 2006). S obzirom na veliku filogenetsku raznolikost među flagelatnim protistima, ne mogu se razmatrati kao jedinstvena skupina niti u okviru sistematike niti trofičkih oblika.



Slika 3. Heterotrofni nanoflagelat obojan DAPI bojom i promatran pomoću epifluorescentnog mikroskopa. Vidljivi su bičevi oko intenzivno svjetle jezgre.

Skupina heterokontnih flagelata jedna je od najbrojnijih među nanoflagelatima koja je karakterizirana veličinama od 2 do 10  $\mu\text{m}$ , sferičnim do ovalnim oblikom stanice i prisutnošću dva biča, od kojih jedan ili oba imaju flagelarne dlačice. Najznačajnije taksonomske skupine heterokontnih flagelata uključuju rodove: *Chryomonades*, *Bicosoecides*, *Pedinellides*, *Choanoflagellates*, *Bodonides* i *Nanodinoflagellates*. Smatra se da su pripadnici skupina *Choanoflagellates* i *Chryomonades* najefikasniji bakteriovorci u moru i da su njihove koncentracije veće od  $10^3 \text{ ml}^{-1}$  (Krstulović i Šolić, 2006).

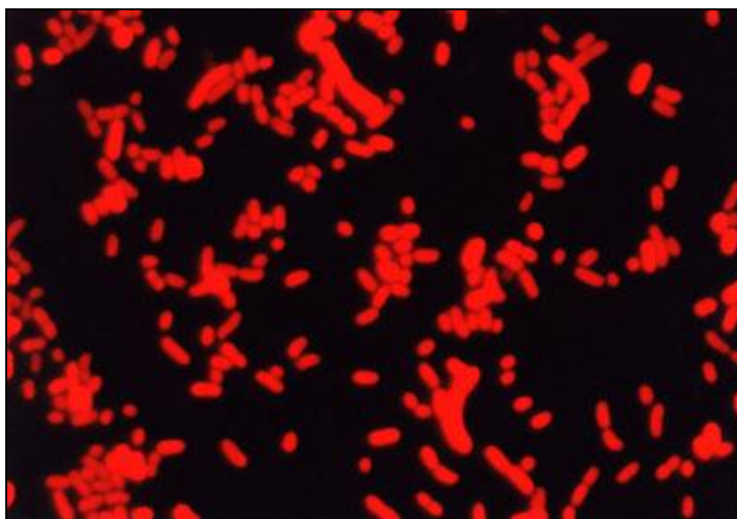
Postoje i određene skupine nanoflagelata koji su prikazani kao miksotrofi, odnosno imaju sposobnosti i fotosinteze i probavljanja partikulatnog plijena, najvećim dijelom bakterija (Sanders i Porter, 1988; Sanders, 1991). U pelagičkim morskim zajednicama broj

miksotrofnih nanoflagelata povremeno doseže i preko 50% ukupne brojnosti nanoplanktonskog fitoplanktona (Krstulović i Šolić, 2006).

Rastući broj studija pokazuje da protisti mogu otpustiti značajan dio (od 10% do 30%) fagocitiranog organskog materijala u obliku otopljenog organskog ugljika (Nagata i Kirchman, 1992). Te vrijednosti upućuju na to da su flagelati potencijalno dominantan izvor otopljenog organskog ugljika u mnogim dijelovima oceana gdje prevladava primarna proizvodnja fitoplanktona malih dimenzija (Sherr i Sherr, 1994).

### 3.3. Cijanobakterije

Cijanobakterije spadaju u autotrofne prokariote (Slika 4.) te imaju jednostavnu morfologiju i citološku građu stanice. Sve cijanobakterije sadrže klorofil *a* te mogu provoditi fotosintezu (Fuhrman i Hagström, 2008). U moru mogu biti u obliku pojedinačnih kokoidnih ili štapičastih stanica, koje su često u paru ili asociране u dužim nitima. Ponekad u nitastim oblicima su prisutne i heterociste. Heterociste se razlikuju od vegetativnih stanica prvenstveno po nedostatku fotosintetskih pigmenata, rezervnih tvari i plinskih mjehurića, te po debljoj staničnoj stjenci. U uvjetima smanjene koncentracije dušikovih spojeva dolazi do aktivacije heterocista. Unutar heterociste vladaju anaerobni uvjeti koji enzimu nitrogenazi omogućuju fiksaciju dušika. Fiksiranjem otopljenog dušika cijanobakterije mogu sintetizirati proteine koje im omogućavaju rast. Međutim, ukoliko se koncentracija fosfata u vodi smanji ispod 0,5 mg/l proces fiksacije dušika se zaustavi.



Slika 4. Autofluorescencija cijanobakterija izloženih zelenom svjetlu u epifluorescentnom mikroskopu

Cijanobakterije mogu posjedovati plinske vakuole pomoću kojih reguliraju plutanje stanice u vodenom stupcu. Određene skupine cijanobakterija su pokretne. Njihova prisutnost u morskom okolišu je utvrđena u oceanskim i neritičkim vodama, “morskom snijegu” i fekalnim otpacima (Glover, 1985). Gustoća im se u morskoj vodi kreće u rasponu od  $10^2$  do  $10^5$  ml<sup>-1</sup> (Waterbury i Stanier, 1981). U vodama bogatim organskim tvarima može doći do intenzivnog razmnožavanja cijanobakterija i rezultirati cvjetanjem mora.

Rodovi *Prochlorococcus* i *Synechococcus* su najvažniji predstavnici morskih cijanobakterija. (Slika 1). 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 svjetskih oceana (Partensky i sur., 1999). Dimenzije njihovih stanica se kreću oko 0,6 μm a glavni fotosintetski pigmenti su im divinilklorofil *a* i *b* no ne i fikobiliproteini. Predstavnici ove skupine nalaze se u eufotičkom području od 40° sjeverne do 40° južne geografske širine, na dubinama i preko 200 m gdje je dostupno tek 0,1% sunčeve svjetlosti (Šilović, 2012).

Rod cijanobakterija *Synechococcus* je vrlo važna prokariotska komponenta autotrofnog pikoplanktona (Šilović, 2012). Dimenzije stanica *Synechococcus-a* kreću se oko 0,9 μm (Chisholm i sur., 1988) a glavni fotosintetski pigmenti su im klorofil *a* i fikobiliproteini (fikocijanin, alofikocijanin, alofikocijanin *b*, te fikoeritrin) i zeaksantin (Stainer i Cohen-Bazire, 1977). Vrste ovog roda prisutne su u gotovo svim oceanskim područjima u koncentracijama od nekoliko desetaka do  $10^9$  stanica l<sup>-1</sup>, 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 desetak godina ranije u odnosu na *Prochlorococcus* zbog posjedovanja pigmenta fikoeritrina koji snažno autofluorescira žuto do narančasto pod plavim ili zelenim ekscitacijskim svjetlom (Johnson i sur., 1979, Waterbury i sur., 1979). Iako su filogenetski srodni, predstavnici ova dva roda imaju različite ekološke strategije. 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). Također, predstavnici ova dva roda pokazuju afinitet prema uzimanju nukleozida i aminokiselina iz okoliša te ih se može smatrati fotoheterotrofima (Beja i Suzuki, 2008). Uz rod *Synechococcus* i *Prochlorococcus* još je i nekoliko skupina cijanobakterija u morskom okolišu važno, prvenstveno zbog njihove uloge u fiksaciji atmosferskog dušika (Fuhrman i

Hagström, 2008). Jedna od takvih skupina je rod *Trichodesmium* koji je uglavnom ograničen na tropska i suptropska područja. Iako rijedak, povremeno se njegova brojnost može znatno povećati te se smatra kako može bitno pridonijeti globalnoj zalihi dušika u oceanima (Capone i sur., 2005).

### 3.3. Indikatori fekalnog onečišćenja

Patogeni mikroorganizmi kvantitativno su najznačajnija kategorija alohtonih mikroorganizama koja dospijeva u more putem otpadnih voda (Krstulović i sur., 2006) te uključuju predstavnike bakterija, virusa, gljivica i protista. Uzročnici su širokog spektra bolesti poput kolere, tifusa, dizenterije, gastroenteritisa, hepatitisa te raznih infekcija i mikoza. Gustoća i raznolikost patogena prisutnih u vodama ovisi o broju ljudi na tom području, o sezonalnoj zastupljenosti nekih bolesti i rasprostranjenosti patogena unutar zajednice (Pipes, 1982). Preživljavanje patogena koji dospijevaju u more općenito je relativno kratko i kreće se u rasponu od nekoliko sati do nekoliko dana za bakterije do nekoliko tjedana za viruse i protiste (Krstulović i sur., 2006). Dio patogenih mikroorganizama koji dospije u more može se akumulirati u morskim organizmima, posebno filtratorima kao što su školjkaši, i na taj način doseći koncentracije znatno više nego u okolnoj vodi.

Kako bi se očuvalo ljudsko zdravlje pri korištenju mora za rekreaciju i proizvodnju hrane potrebno je odrediti sanitarnu kvalitetu mora. Ona omogućuje procjenu potencijalnog rizika zaraze patogenim mikroorganizmima, odnosno ukazuje da li broj prisutnih patogena predstavlja neprihvatljiv rizik za zdravlje (Krstulović i sur., 2006). Pri određivanju sanitarne kvalitete mora skupina patogena se ne analizira direktno jer uključuje stotine vrsta mikroorganizama koji pokazuju različitu vjerojatnost uzrokovanja bolesti (Krstulović i sur., 2006). Uz to, metode za njihovo određivanje iz mora još uvijek nisu razvijene ili su vrlo složene pa bi njihovo praćenje predstavljalo velike tehničke i ekonomske zahtjeve. Zbog navedenih razloga se sanitarna kvaliteta mora prati pomoću raznih indikatora koji mogu biti mikrobiološki, kemijski i molekularni.

Indikatori u onečišćenom mediju moraju biti prisutni u koncentraciji koja je proporcionalna koncentraciji patogena. Brzina detekcije i kvantifikacije kao i izostanak patogenosti za čovjeka su također važne osobine indikatora. Ako se radi o mikrobnim

indikatorima, ne smiju se razmnožavati u mediju gdje se mjere, a vrijeme njihovog preživljavanja mora biti slično vremenu preživljavanja patogena kojeg se prati.

Skupine fekalnih koliforma i streptokoka (Slika 5.) kvantitativno su povezane s fekalnim materijalom (Ashbolt, 2001) budući da prosječan čovjek preko fekalija dnevno oslobađa u okoliš oko  $10^{11}$  mikroorganizama, među kojima ima oko  $2 \times 10^9$  koliforma i  $5 \times 10^8$  streptokoka (Ashbolt i sur., 2001). Ove bakterije se univerzalno koriste za određivanje sanitarne kvalitete mora, a prema njima se određuju standardi kvalitete vode u cijelom svijetu. Ukupni koliformi korišteni su dugi niz godina kao glavni pokazatelji sanitarne kvalitete vode za piće, rekreaciju i uzgoj školjaka. Oni predstavljaju skupinu aerobnih i fakultativno anaerobnih Gram-negativnih, nesporogenih štapića koji fermentiraju laktozu na temperaturi od  $35^\circ\text{C}$  i pri tome u razdoblju od 24 sata proizvode kiselinu i plin. U ovu skupinu spadaju rodovi *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* i *Enterobacter*.

U zadnjem desetljeću ova skupina indikatora se sve rjeđe koristi zato što uključuje i koliforme ne-fekalnog porijekla. Također, visoke koncentracije ukupnih koliforma mogu biti utvrđene u uzorcima mora kao rezultat velike količine zemlje s kopna nakon obilnih kiša (Krstulović i sur., 2006). Uz to, neki koliformi imaju sposobnost razmnožavanja u prirodnim vodama i tako mogu pokazati lažno onečišćenje. S obzirom na vrlo kratko preživljavanje ukupnih koliforma u morskom okolišu, prisutnost ovih indikatora ukazuje isključivo na svježije onečišćenje bilo fekalnim materijalom, bilo zemljom nakon kiša.

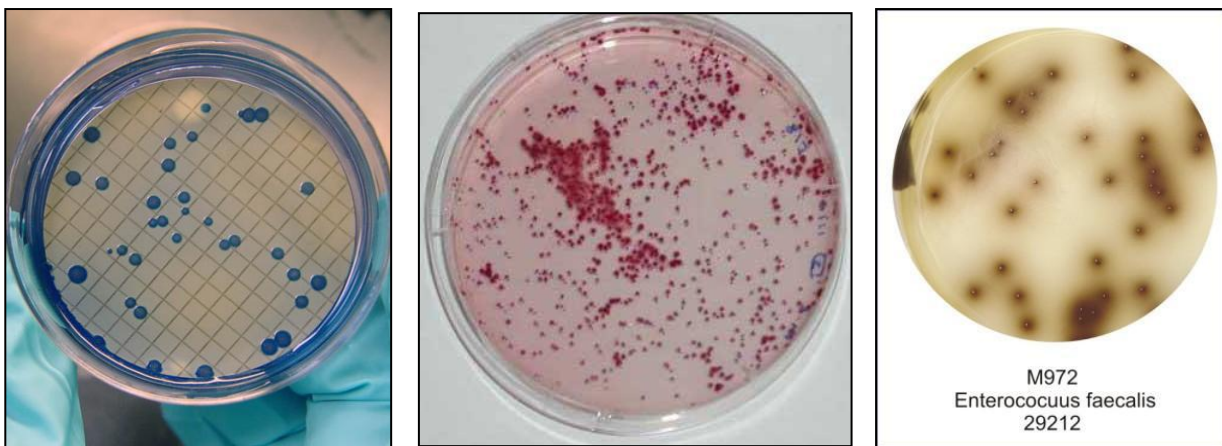
Fekalni koliformi predstavljaju podskupinu ukupnih koliforma koji pokazuju direktnu povezanost s fekalnim zagađenjem iz toplokrvnih životinja (Figueras i sur., 2000). Uključuju rodove *Klebsiella* i *Escherichia* (Dufour, 1977), a operativno su definirani kao aerobni i fakultativno anaerobni Gram-negativni nesporogeni štapići koji fermentiraju laktozu na temperaturi od  $44,5^\circ\text{C}$  i pri tome u razdoblju od 24 sata proizvode kiselinu i plin. Kao i totalni koliformi i fekalni koliformi su indikator svježeg onečišćenja, međutim smatraju se boljim pokazateljima zbog specifičnosti porijekla i minimalne mogućnosti razmnožavanja u morskom okolišu.

Fekalni streptokoki ili crijevni enterokoki su Gram-pozitivni, izduženi ili ovalni koki koji dolaze u parovima ili kratkim lancima. S obzirom da fekalni streptokoki najčešće vode porijeklo iz crijeva toplokrvnih organizama, njihova prisutnost u morskom okolišu također ukazuje na onečišćenje fekalnim materijalom. Međutim ove bakterije mogu se naći i u nekim biljkama kao i biljnim proizvodima, što znači da bi otpadne vode prehrambene industrije

mogle biti nefekalni izvor streptokoka u moru. U ovu skupinu spadaju rodovi *Enterococcus* i *Streptococcus* (Holt i sur., 1993).

Fekalni streptokoki su otporniji na morsku vodu tako da u ovom mediju preživljavaju duže u odnosu na koliforme (Evison i sur., 1980) te pokazuju postojanost sličnu raznim patogenim bakterijama. Zbog te su osobine fekalni streptokoki pokazatelji nešto starijeg onečišćenja u usporedbi s drugim indikatorima. Dodatno, fekalni streptokoki mogu pružiti precizniju informaciju o izvoru onečišćenja s obzirom da neke vrste unutar ove skupine imaju specifične domačine. Na taj način je moguće, utvrđivanjem kvalitativnog sastava fekalnih streptokoka, razlikovati da li određeni izvor fekalnog otpada potječe iz domaćinstava ili životinja.

Omjer između koncentracija fekalnih koliforma i fekalnih streptokoka (FK:FS) u uzorku može se upotrijebiti kao pokazatelj porijekla fekalnog onečišćenja. FK:FS omjer koji je manji od 0.7 pokazatelj je životinjskog porijekla, dok FK:FS omjer veći od 4.0 pokazatelj ljudskog porijekla fekalnog materijala, s tim da ovi odnosi vrijede isključivo za svježi fekalni otpad, odnosno ne stariji od 24 sata (Krstulović i Šolić, 2006).

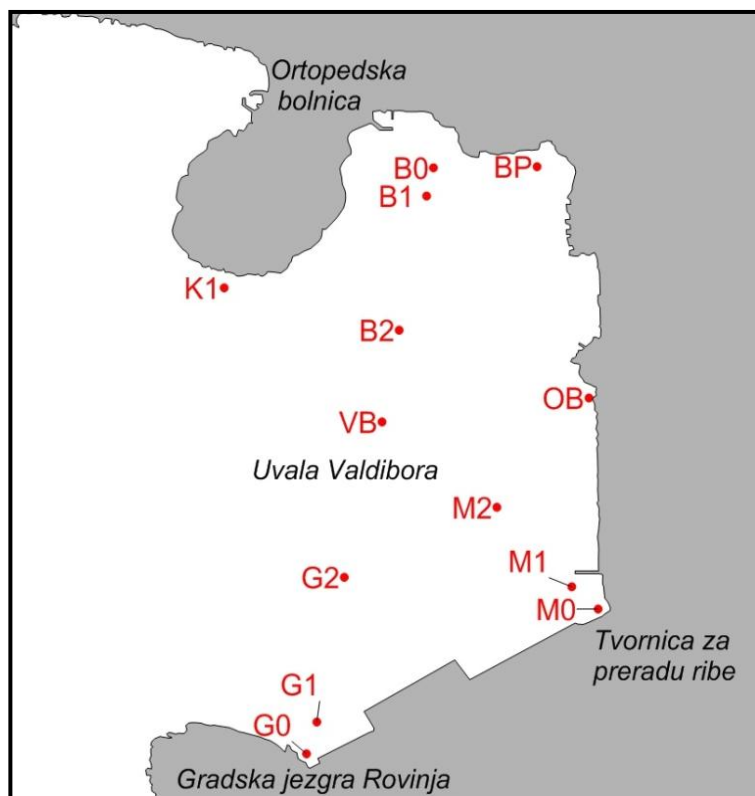


Slika 5. Bakterijski indikatori fekalnog onečišćenja: Fekalni koliformi (lijevo), Fekalni streptokoki (sredina) i Fekalni enterokoki (desno).

## 4. Materijali i metode

### 4.1. Područje istraživanja

Uvala Valdibora, smještena na sjevernoj strani grada Rovinja, proteže se od starogradske jezgre do ortopedске bolnice. Površina uvale iznosi oko 1,5 km<sup>2</sup> a dubine se kreću između 10 m i 20 m. Morsko dno je dosta homogeno, sastavljeno uglavnom od pijeska, s iznimkom istočne strane gdje prevladavaju stijene većih dimenzija. Dubina uvale postepeno i ravnomjerno se povećava prema zapadu do najdublje točke na 23 m. Valdibora je izložena raznim vjetrovima, pogotovo buri, prema kojoj je dobila i ime, jugozapadnjaku i zapadnjaku. Zbog toga se ne koristi kontinuirano za sidrene brodova. U uvali postoji nekoliko izvora kanalizacijskih voda. Najveća količina otpadnih voda dolazi iz tvornice za preradu ribe koja je smještena u jugoistočnom dijelu uvale. Na sjevernoj strani Valdibore, na oko 70 m od obale, nalazi se jedan od glavnih gradskih kanalizacijskih ispusta koji prima otpadne vode iz bolnice i bolničkog naselja. Na istočnoj obali uvale nalazi se i kanal koji pridonosi oborinske vode, dok duž starogradske jezgre kraj tržnice postoji nekoliko manjih ispusta kanalizacije.



Slika 6. Raspored postaja u uvali Valdibora



## 4.2. Uzorkovanje

Uzorci vode prikupljeni su Niskinovim crpcima od 5 l na 13 lokacija. Postaje M0, M1 i M2 smještene od industrijskog kanalizacijskog ispusta (0 m), na 50 m i na 300 m udaljenosti prema sredini uvale. Za praćenje onečišćenja kod bolnice odabrane su postaje B0, B1 i B2, na 0 m, 50 m i 300 m udaljenosti od bolničkog ispusta prema sredini uvale. U blizini gradske jezgre odabrane su postaje G0, G1 i G2 također na 0 m, 50 m i 300 m od ispusta. Dodatno su prikupljeni uzorci sa postaje K1 koja je služila kao kontrola, kod postaje OB gdje se slijevaju oborinske vode, kod postaje BP gdje se nalazi kupalište i u sredini uvale (postaja VB). Na svim lokacijama uzorkovalo se na površini (0 m) i 5 m dubine vodenog stupca s izuzetkom postaje OB (zbog pličine).



Slika 7. Niskinov crpac od 5 l za uzorkovanje morske vode

### 4.3. Hidrografski uvjeti

Osnovni hidrografski parametri, temperatura i salinitet izmjereni su pomoću CTD sonde, a podaci su kasnije obrađeni u programima excel i surfer.



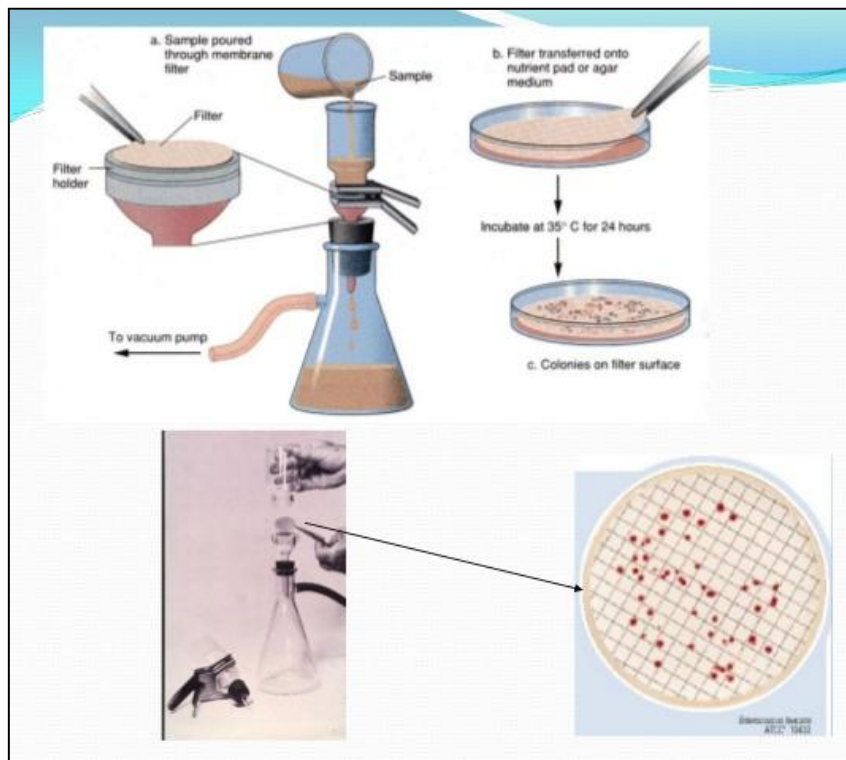
Slika 8. CTD sonda (engl. *Conductivity, Temperature, Depth*) koja se koristi za mjerenje osnovnih hidrografskih parametara.

### 4.4. Sanitarna kvaliteta mora

Sanitarna kvaliteta mora određena je pomoću fekalnih koliforma i fekalnih streptokoka metodom membranske filtracije (WHO, 1994). Na svakoj lokaciji prikupljeno je 500 ml morske vode pomoću sterilnih staklenih boca. Uzorci su sačuvani i transportirani do laboratorija prijenosnim frižiderom kako bi ih se zaštitilo od svjetla i promjena u temperaturi. Iz svake boce filtrirano je 100 ml, 10 ml i 1 ml kroz membranske filtre (47 mm) veličine pora od 0,45 $\mu$ m.

Za određivanje fekalnih koliforma membranski filtri su postavljeni na površini hranjive podloge m-FC agar u petrijevim zdjelicama te inkubirani 24 sata na temperaturi od 44,5°C. Kolonije koje su izrasle i pokazale karakterističnu plavu boju izbrojane su. Izračunata je srednja vrijednost svih razrijeđenja i rezultat je izražen kao broj bakterija po 100 ml.

Fekalni streptokoki određeni su postavljanjem filtra na površini hranjive podloge Slanetz-Bartley agar u petrijevim zdjelicama te inkubiranjem trajanja 48 sati pri temperaturi od 36 °C. Filtri na kojima su bile vidljive crvene kolonije premješteni su u petrijevkama s hranjivom podlogom agar bile aesculin za potvrdno testiranje. Podloge s filtrima su inkubirane 2 sata na temperaturi od 44,5 °C. Kolonije koje su poprimile tamnu boju ili koje su oko sebe stvorile tamni krug izbrojane su. Nakon što je izračunata srednja vrijednost svih razrijeđenja rezultati su izraženi kao broj fekalnih streptokoka po 100 ml.



Slika 9. Shematski prikaz metode membranske filtracije.

#### **4.5. Brojnost heterotrofnih bakterija, flagelata i cijanobakterija**

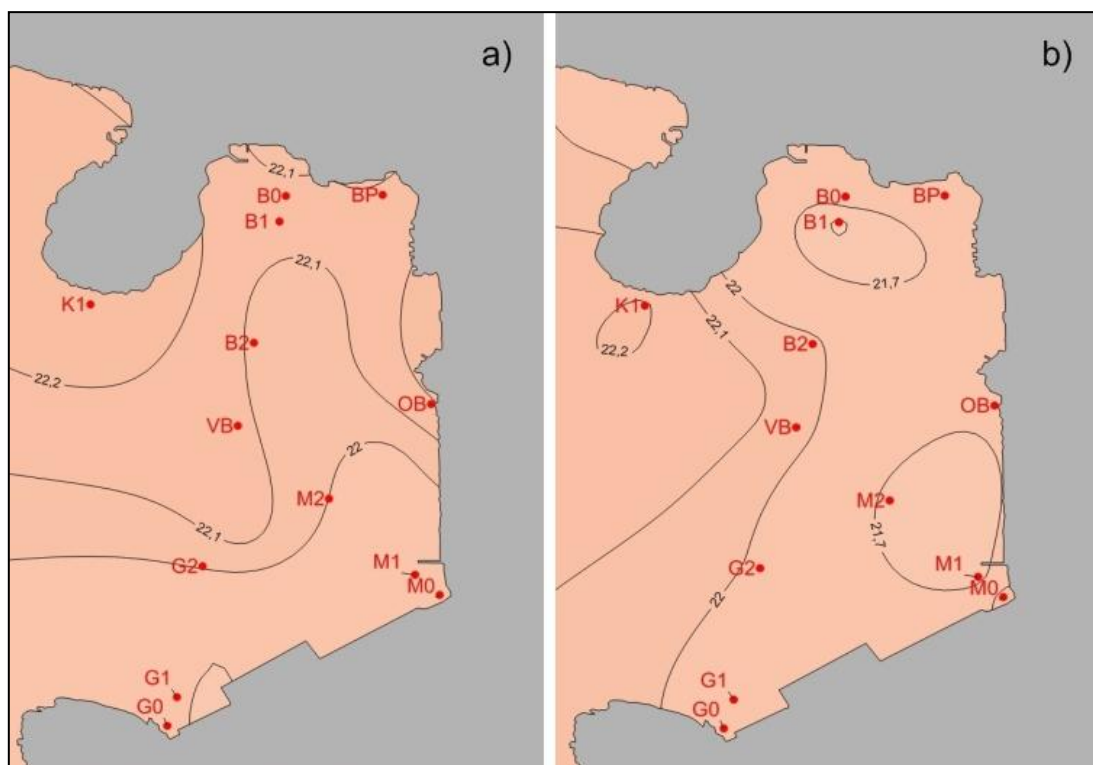
Za određivanje brojnosti morskih bakterija, flagelata i cijanobakterija 20 ml morske vode sa svake postaje i dubine spremljeno je u polietilenskim bočicama. Uzorci su odmah fiksirani dodatkom 1 ml 36% formaldehida i sačuvani u frižideru na 4°C do analize. Za analizu bakterija dodano je 100 µl DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boje u 2ml uzorka. Ova fluorescentna boja ulazi unutar stanica i veže se za DNA. Nakon 15 minuta, obojani uzorci su profiltrirani kroz crne polikarbonatne filtre promjera 25 mm i veličine pora od 0,2 µm. Filtri su postavljeni na mikroskopsko stakalce, dodano im je imerzijsko ulje i pokrovno stakalce. Priprema uzoraka za flagelate i cijanobakterije jako je slična prethodnoj, a razlikuje se po tome da je filtriran volumen veći (10 ml) kao i količina dodane boje (500 µl DAPI). Uz to koriste se crni polikarbonatni filtri promjera 25 mm s porama od 0,4 µm. Za cijanobakterije nije potrebno dodavati DAPI budući da njihovi fotosintetski pigmenti prirodno fluoresciraju kad su izloženi zelenom svjetlu.

Nakon pripreme uzoraka, abundancija bakterija, flagelata i cijanobakterija određena je epifluorescentnim mikroskopom. Uzorci su osvijetljeni UV-svjetlom prouzročivši fluorescenciju DAPI boje koja je emitirala plavu (vidljivu) boju te omogućila brojanje mikroorganizama. Bakterije su bile vidljive kao okrugle ili izdužene sitne točkice s dimenzijama od 0,2µm do 2 µm. Flagelati su bili prepoznatljivi po velikoj jezgri (od 2 do 20 µm) i po flagelima (2 ili 4). S druge strane za brojanje cijanobakterija korištena je ekscitacija zelenim svjetlom koja je prouzročila fluorescenciju pigmenata cijanobakterija narančasto-crvene boje. Za svaki uzorak određena je srednja vrijednost abundancije po vidnom polju mikroskopa i pomnožena specifičnim faktorom konverzije mikroskopa kako bi se dobio broj mikroorganizama po ml.

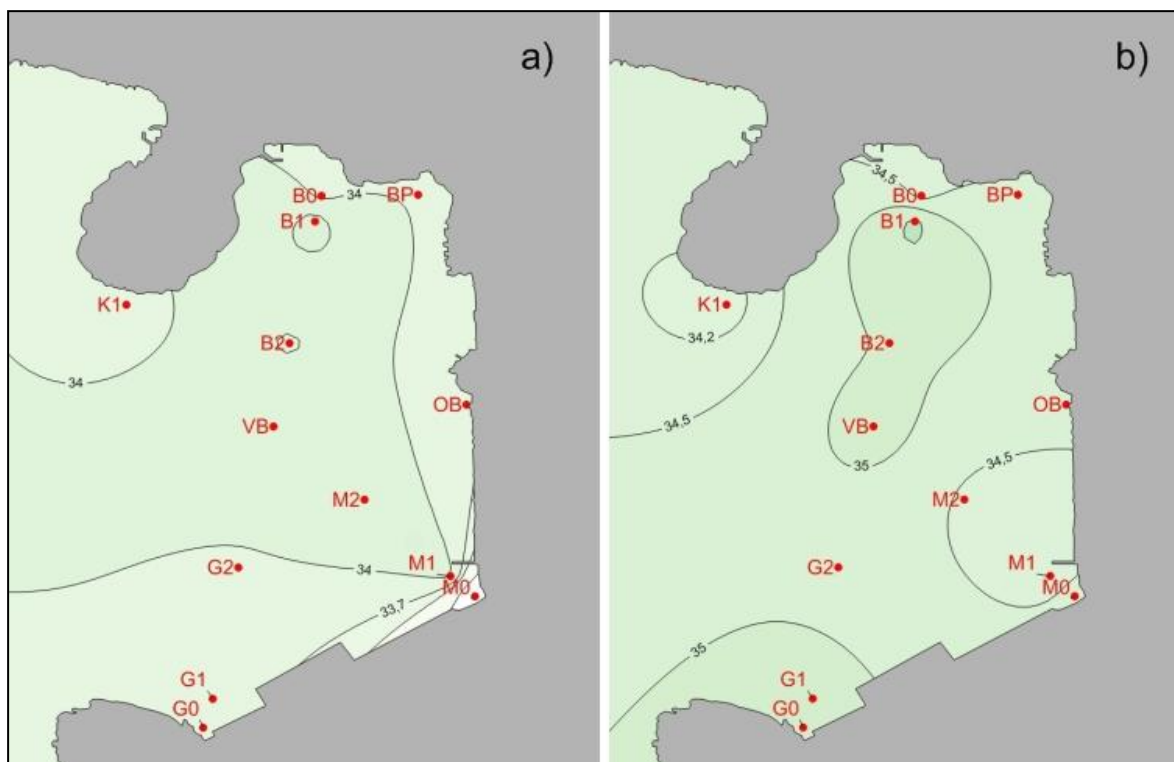
## 5. Rezultati i diskusija

### 5.1. Hidrografski uvjeti

Vrijednosti saliniteta i temperature u vodenom stupcu uvali Valdibora bile su tipične za istočno priobalje sjevernog Jadrana. Na tom području u toplijem dijelu godine dolazi do zagrijavanja površine što otežava miješanje sa dubljim slojevima. S vremenom debljina sloja koji se zagrijava postepeno se povećava zbog donosa topline iz atmosfere. U lipnju topli sloj iznosi nekoliko metara dok u rujnu može obuhvatiti cijeli vodeni stupac (do 30 m dubine). Istovremeno, ljeti dolazi do smanjivanja vrijednosti saliniteta u površinskom sloju mora najviše zbog utjecaja voda rijeka zapadne i sjeverne obale sjevernog Jadrana. Tijekom jeseni dolazi do hlađenja vodenog stupca pa površinska voda postaje teža i tone. Na taj način aktivira se proces miješanja koji vodi ujednačavanju i smanjivanju temperature u cijelom vodenom stupcu. Tijekom zime more je izotermno i dodatno se hladi. U proljeće, kada se zrak počinje grijati, opisani ciklus se ponavlja.



Slika 10. Raspodjela temperature u površinskom sloju mora (a) i na 5 m dubine (b) u lipnju 2014. u uvali Valdibora

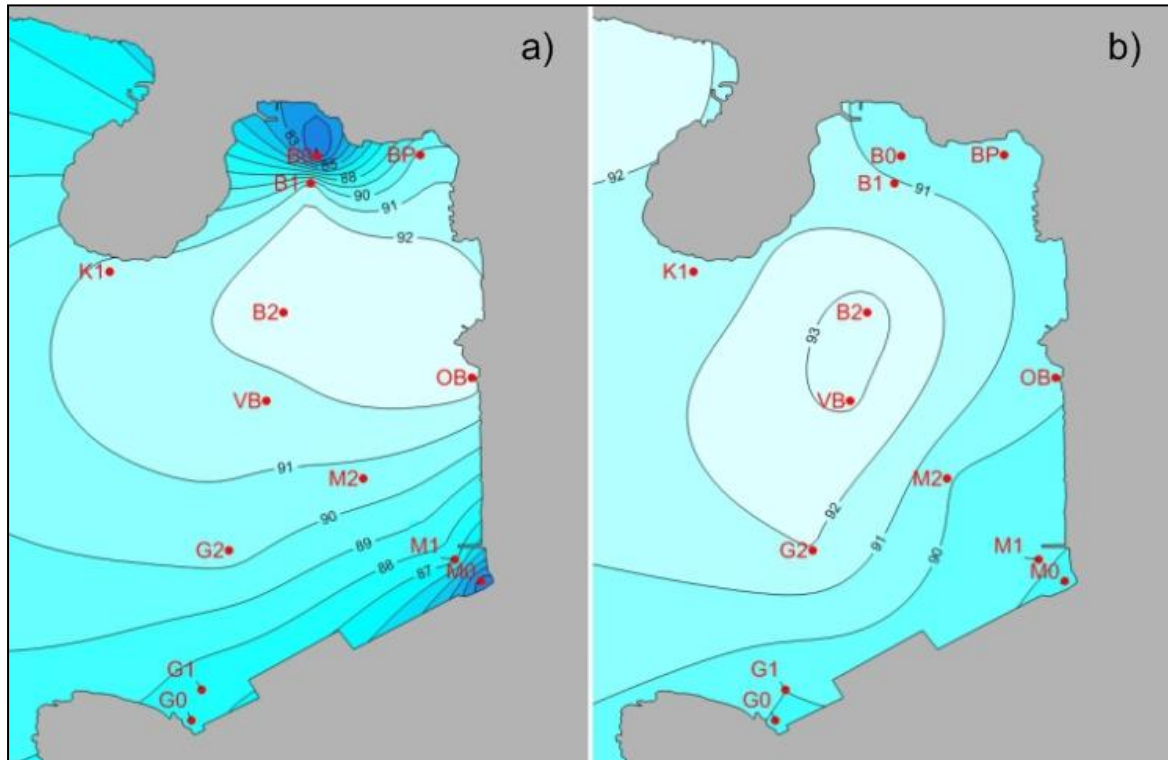


Slika 11. Raspodjela saliniteta u površinskom sloju mora (a) i na 5 m dubine (b) u lipnju 2014. u uvali Valdibora.

U lipnju 2014. temperature mora u uvali Valdibora (Slika 10.) kretale su se oko 22,03 °C sa najnižim vrijednostima kraj svih ispusta. Prosjek saliniteta je iznosio 33,86 a najniža vrijednost (32,21) registrirana je kod industrijskog ispusta (Slika 11.). Takve vrijednosti temperature i saliniteta su bile rezultat unosa hladnije i slatke vode kraj svih ispusta. Utjecaj tog unosa je bio značajniji kod industrijskog ispusta zbog znatno većeg volumena (oko 20000 m<sup>3</sup>/mjesečno) unesenih voda. Generalno razlike između površine mora i sloja na 5 m nisu bile izražene osim za salinitet na područje industrijskog ispusta. Sadržaj kisika, odnosno zasićenje kisikom (Slika 12.) u istraženom području uglavnom je bio relativno visok s vrijednostima zasićenja između 81,2 i 92,75 % na 0 m te između 88,7 i 93,4% na 5 m.

Najniže koncentracije kisika zabilježene su na području oko industrijskog ispusta tvornice za preradu ribe zbog unosa organske tvari i njene degradacije u moru. Saturacija kisikom na tom području je bila bliska donjoj granici tipičnih prirodnih vrijednosti za rovinjsko priobalno more. Također i na području kanalizacijskog ispusta bolničkog naselja

saturacija kisikom je bila dosta niža u odnosu na ostatak uvala. Primijećena je razlika između saturacije kisika na 0 m i na 5 m pogotovo oko glavnih ispusta kanalizacije.



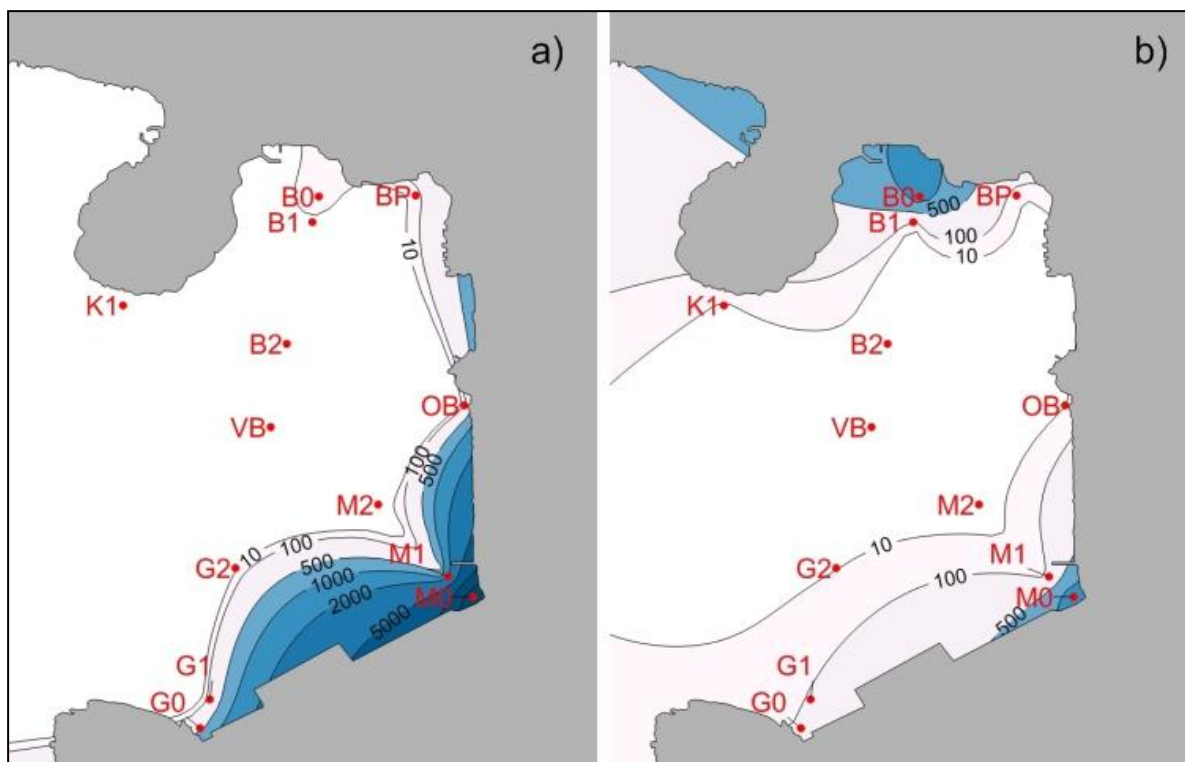
Slika 12. Zasićenje kisikom u površinskom sloju mora (a) i na 5 m dubine (b) u lipnju 2014. u uvali Valdibora.

## 5.2. Sanitarna kvaliteta mora

Sanitarna kvaliteta mora procijenjena je pomoću bakterijskih indikatora fekalnog onečišćenja: fekalni koliformi i fekalni streptokoki s namjerom da se utvrdi koliko je opterećenje i rasprostranjenost otpadnih materijala u uvali Valdibora. Procjena stanja okoliša napravljena je prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 87/2010) koje se ispuštaju u površinske vode a koje se koriste za kupanje i rekreaciju. U Tablici 2b, Pravilnika, granične vrijednosti su za koliforme fekalnog porijekla (FK) 500 CFU 100 ml<sup>-1</sup> a za streptokoke fekalnog porijekla (FS) 200 CFU 100 ml<sup>-1</sup>.

Fekalni koliformi su skupina enterobakterija koja potječe iz probavnog trakta toplokrvnih organizama i pokazuje vrlo visoku korelaciju sa stupnjem fekalnog onečišćenja. Ove se bakterije generalno smatraju indikatorima vrlo svježeg onečišćenja mora s fekalnim materijalom. U lipnju 2014. registrirana je prisutnost visokih koncentracija fekalnih koliforma na 0 m i na 5 m dubine u određenim dijelovima uvale Valdibore (Slika 13.). Najveće razine kontaminacije zabilježene su kraj postaje M0 odnosno kod ispusta tvornice za preradu ribe gdje je koncentracija koliforma prelazila za 25 puta propisane granice sa maksimalnim vrijednostima od 12800 FK/100 ml. Koncentracija fekalnih indikatora bila je povišena i kraj ispusta staroga grada (380 FK/100 ml) i kod ispusta bolničkog naselja (1300 FK/100 ml na 5m). Udaljavanjem od svih izvora otpadnih voda došlo je do značajnog smanjenja koncentracije fekalnih indikatora. Usporedbom rezultata dobivenih na površini mora i na 5 m primijećeno je da su koncentracije fekalnih bakterija u površinskim vodama na području industrijskog i gradskog ispusta bile znatno više. Razlog tome može se naći u ispuštanju otpadnih voda na samoj površini mora, koje su se zbog manje slanosti i gustoće širile preferencijalno u horizontalnom smjeru. Kod bolničkog naselja ispuštavanje je bio locirano na 9 m dubine pa je koncentracija izmjerena na 5 m dubine bila veća u odnosu na površinu mora. Koncentracije fekalnih koliforma na kontrolnoj postaji K1 na rtu Muča, i na postajama u sredini uvale (B2, G2 i VB) bile su jako niske i nisu ukazale na prisutnost fekalnog onečišćenja. U uvali Valdibora osim antropogenih doprinosa fekalnih bakterija treba uzeti u obzir i prirodne izvore. Među njima u prvom redu treba naglasiti i prisutnost populacije od nekoliko stotina galebova koji se stalno zadržavaju na području u okolici industrijskog ispusta. Galebov je izmet izuzetno bogat s fekalnim bakterijama (Noblet i sur., 2004), pogotovo koliformima, a budući da u prosjeku galebovi ispuštaju svoj otpad oko 50 puta u jednom danu, njihov doprinos onečišćenju najvjerojatnije nije zanemariv (Paliaga i sur., 2015).

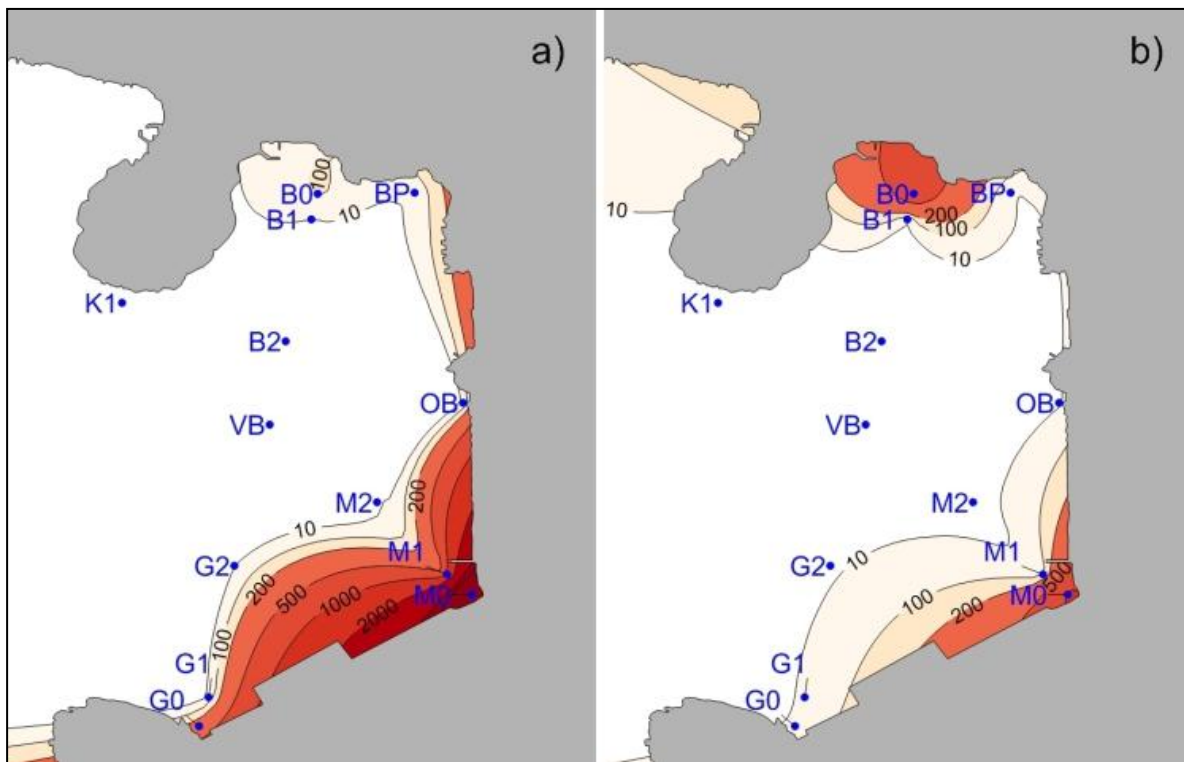




Slika 13. Raspodjela fekalnih koliforma (CFU/100 ml) u površinskom sloju mora (a) i na 5 m dubine (b) u lipnju 2014. u uvali Valdibora.

Fekalni streptokoki se često koriste zajedno sa fekalnim koliformima za procjenu razine fekalnog onečišćenja u vodama. Ova skupina bakterija živi u probavilu toplokrvnih životinja no može se naći i u crijevima riba. Fekalni streptokoki su Gram pozitivne bakterije koje mogu preživjeti u morskom okolišu duže u odnosu na fekalne koliforme i mogu pružiti dodatne informacije o izvoru onečišćenja te omogućavaju bolje praćenje širenja otpadnih voda u okolišu (Krstulović i Šolić, 2006). U uvali Valdibora koncentracija fekalnih streptokoka (Slika 14.) pokazala je sličnu distribuciju fekalnim koliformima na 0 m i na 5 m sa najvišim razinama kraj ispusta (M0, G0 i B0) i postepenim smanjenjem udaljavanjem od izvora onečišćenja. Na postaji M0 izmjerene su izrazito visoke koncentracije streptokoka (6.500 FS/100 ml) koje su prelazile za više od 30 puta granične vrijednosti propisane po zakonu. Dok su kod staroga grada i bolničkog naselja visoke koncentracije oba indikatora posljedica ljudskog fekalnog onečišćenja na postajama M0 industrijska obrada ribe može se smatrati glavnim uzročnikom mikrobiološkog onečišćenja što je potvrđeno pomoću kemijskih indikatora fekalnog onečišćenja u studiji o utjecaju otpadnih voda u uvali Valdibora (Paliaga i sur., 2015). Udaljavanjem od kanalizacionih ispusta razine onečišćenja ubrzo su se smanjile

za oko red veličine i u većini slučajeva bile su ispod propisanih granica. Samo su na postaji M1 na 50 m udaljenosti od industrijskog ispusta u površinskom sloju zabilježene visoke razine indikatora (FK 540 CFU/100 ml i FS 476 CFU/100 ml). Velika količina masnog partikulata porijeklom iz industrijskog ispusta bila je podloga za transport i preživljavanje velikog broja alohtonih bakterija među kojima je bilo i veliki broj fekalnih indikatora (Paliaga i sur., 2015). Mjerenja kod postaje OB na kraju kanala oborinskih voda, kod kontrolne postaje K1 i u sredini uvala (G2, VB, B2 i M2) nisu pokazala prisutnost fekalnog onečišćenja.



Slika 14. Raspodjela fekalnih streptokoka (CFU/100 ml) u površinskom sloju mora (a) i na 5 m dubine (b) u lipnju 2014. u uvali Valdibora.

Omjer između koncentracija fekalnih koliforma i fekalnih streptokoka (FK/FS) u određenom uzorku može se upotrijebiti kao pokazatelj porijekla onečišćenja (Krstulović i Šolić, 2006). FK/FS omjer koji je manji od 0,7 pokazuje životinjsko porijeklo, dok FK/FS veći od 4,0 pokazuje ljudsko porijeklo fekalnog materijala, s tim da ovi odnosi vrijede isključivo za svježi fekalni otpad, odnosno ne stariji od 24 sata. Omjeri FK/FS za postaje u Valdibori su generalno imali vrijednosti između 0,7 i 4,0 ukazujući na miješano porijeklo

otpadnih voda. Najniže vrijednosti omjera registrirane su na postajama koje su bile najudaljenije od izvora kanalizacije (K1 i VB), dok su najviše vrijednosti zabilježene kraj starog grada (G0, G1 i G2). Postaje oko industrijskog i kanalizacijskog ispusta imale su osobinu uzoraka u kojima je ljudski i životinjski fekalni materijal izmiješan.

Tabela 1. Omjer FK/FS za vodeni stupac u uvali Valdibora na 0m i na 5 m.

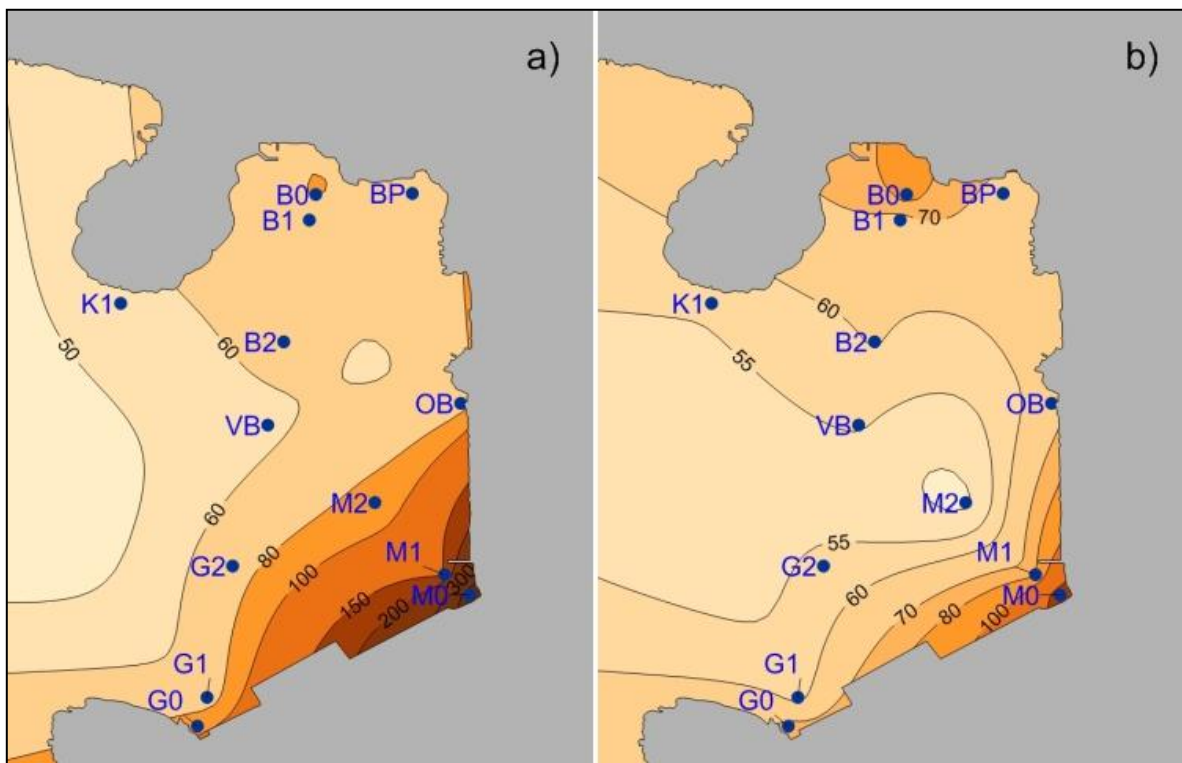
Postaja	0 m	5 m
M0	2,12	1,27
M1	1,13	1,71
M2	1,67	0
VB	0,50	0
K1	0	0,50
G0	1,33	6,47
G1	10,33	5,19
G2	0,36	4,00
B2	3,00	0,50
B1	0	0,67
B0	0,44	1,63
BP	1,28	1,57
OB	1,63	2,50

### 5.3. Brojnost heterotrofnih bakterija

Heterotrofne bakterije su najbrojnija komponenta morskih mikrobnih zajednica (Sanders i sur., 1992). One su sveprisutne u moru te imaju temeljnu ulogu u kruženju nutrijenata u hranidbenim mrežama (Azam, 1998). Bakterije brzo odgovaraju na promjene u okolišu, stoga mogu poslužiti i kao dobar pokazatelj perturbacija u morskom ekosustavu (Cavari i Colwell, 1988). Na području Rovinja raspon brojnosti bakterija u ljetnim mjesecima u površinskim vodama varira od  $3,75 \cdot 10^5$  bakterija/ml do  $2,428 \cdot 10^6$  bakterija/ml, dok je srednja vrijednost  $1,159 \cdot 10^6$  stanica/ml (Ivančić i sur., 2014). Postaje (M0, M1, M2) oko ispusta tvornice za preradu ribe pokazale su najveću koncentraciju heterotrofnih bakterija, pogotovo postaja M0 gdje je iznosila  $3 \cdot 10^6$  bakterija/ml (Slika 15.). Ovakve brojnosti su izrazito visoke i prelaze granice prirodnih varijacija brojnosti bakterija u rovinjskom

akvatoriju. Na postaji M1 i M2 brojnost bakterija je također bila povišena u odnosu na druge postaje, ali ipak unutar prirodnih granica. Kraj ispusta staroga grada i kanala oborinskih voda nije izmjereno povećanje broja bakterija u odnosu na postaje koje su bile izvan onečišćenog područja.

Na postaji B0 brojnost bakterija je bila povećana na površini i na 5 m dubine najvjerojatnije zbog obogaćivanja organskim materijalom iz kanalizacijskog ispusta. Usporedivši distribuciju heterotrofnih bakterija u površinskom sloju i na 5 m dubine uočene su velike razlike, pogotovo na postajama M0, M1, M2, G0, B0 i B1. Budući da je veoma sličan trend primijećen za indikatore fekalnog onečišćenja može se pretpostaviti da su promjene u brojnosti heterotrofnih bakterija bile direktno korelirane sa stupnjem fekalnog i industrijskog onečišćenja.

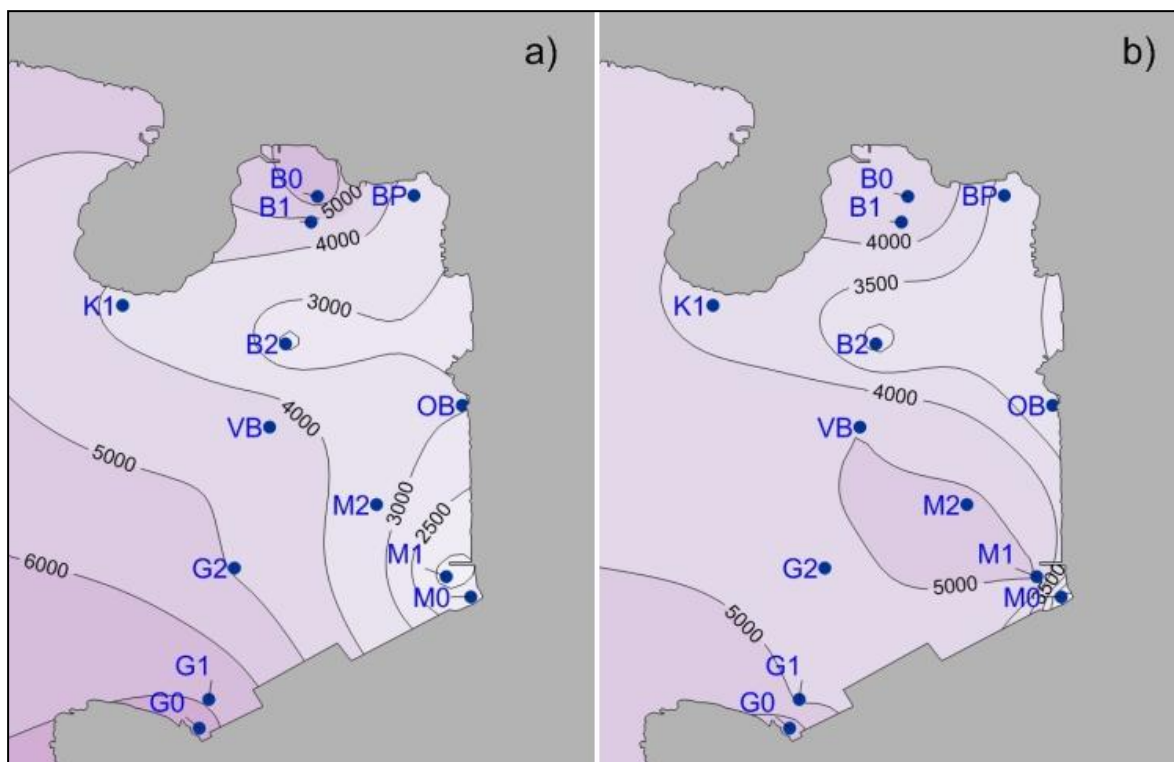


Slika 15. Raspodjela heterotrofnih bakterija (broj stanica  $\cdot 10^7/l$ ) u površinskom sloju mora (a) i na 5 m dubine (b) u lipnju 2014. u uvali Valdibora.

## 5.4. Brojnost heterotrofnih nanoflagelata

Heterotrofni nanoflagelati su jednostanični eukariotski organizmi veličine od 2 do 20  $\mu\text{m}$  koji su najznačajniji predatori bakterija, cijanobakterija i pikoplanktonskih algi. Distribucija nanoflagelata u Valdibori tijekom lipnja 2014. godine na 0 m i na 5 m dubine (Slika 16.) nije se znatno razlikovala. Na obje dubine uočeno je povećanje koncentracije heterotrofnih flagelata kod samih kanalizacijskih ispusta bolničkog naselja i staroga grada. S druge strane u blizini ispusta tvornice za preradu ribe njihova je brojnost bila smanjena. Takav rezultat bio je neočekivan budući da HNF ovise uglavnom o broju heterotrofnih bakterija. Sommarunga i Kandolf (2014) pokazali su da velika prisutnost suspendiranih mineralnih čestica otežava prehranu nanoflagelata i vodi k smanjenju njihove brojnosti. U slučaju industrijskog ispusta većina je materijala bila sastavljena od masnoće i ostataka ribe. Budući da nanoflagelati imaju generalno razvijenu sposobnost lijepljenja na organski materijal u moru i da se hrane bakterijama koje žive na tim česticama, iznenađuje činjenica da su oni detektirani u tako malom broju. Najvjerojatnije je sastav organskog partikulata iz industrijskih otpadnih voda, koji se razlikuje od tipičnog morskog, inhibirao naseljavanje heterotrofnih nanoflagelata na partikulat, i na taj način otežavao njihovu ishranu bakterijama (Paliaga i sur., 2015). S izuzetkom područja pod direktnim utjecajem industrijskog ispusta brojnost heterotrofnih nanoflagelata bila je u skladu sa tipičnim vrijednostima izmjerenim na referentnoj postaji RV001.

U lipnju 2014. prosječan broj HNF-a u uvali Valdibori je bio 4253 stanica/ml što je malo niži ali usporediv sa rezultatima dobivenim tijekom ljeta 2009. i 2010. godine u površinskim vodama (0 m i 5 m) na postaji RV001 gdje je prosječan broj HNF-a bio je 6335 stanica /ml. Iz dobivenih rezultata može se pretpostaviti da sastav kanalizacijskih voda igra ključnu ulogu u određivanju odgovora nanoflagelata i ostalih komponenti mikrobne zajednice u moru na ovu vrstu antropogenog pritiska.



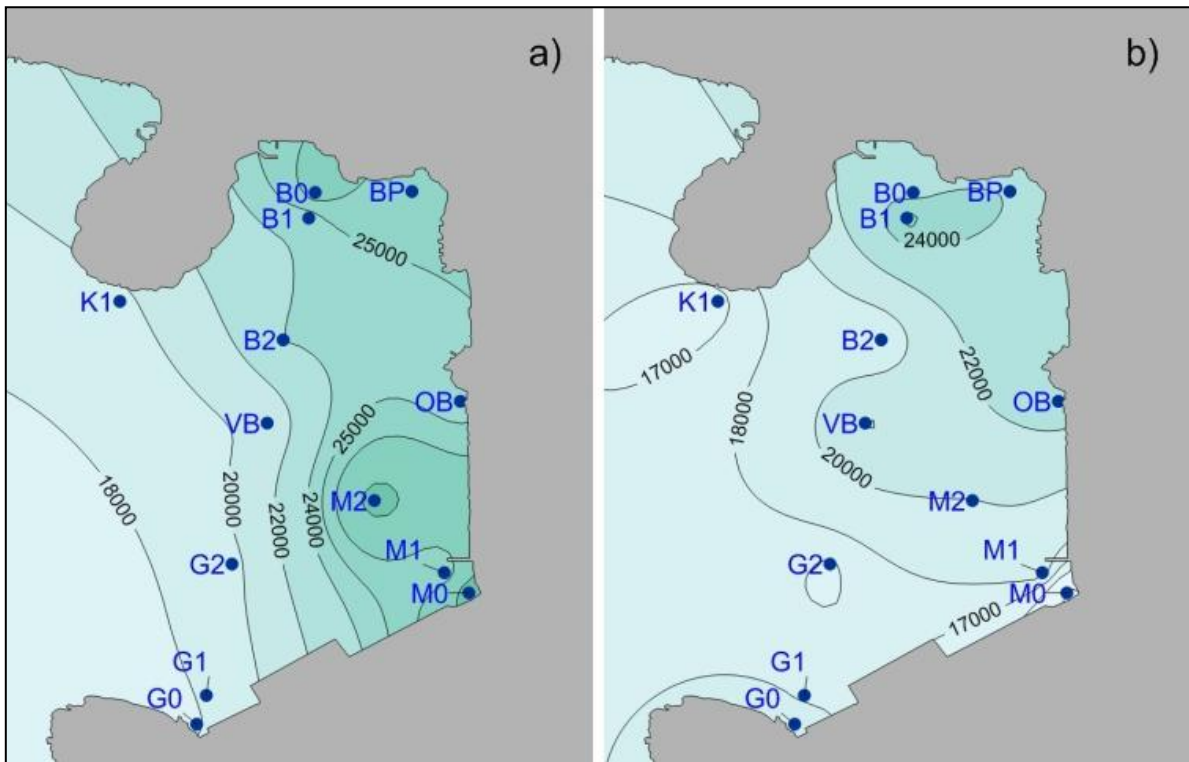
Slika 16. Raspodjela heterotrofnih nanoflagelata (broj stanica/ml) u površinskom sloju mora (a) i na 5 m dubine (b) u lipnju 2014. u uvali Valdibora.

## 5.5. Brojnost cijanobakterija

Cijanobakterije, poput heterotrofnih bakterija su sveprisutne u morskom okolišu. One spadaju u autotrofne prokariote i mogu poslužiti kao indikatori eutrofikacije u slatkovodnim i morskim sustavima. Gustoća im se u morskoj vodi kreće u rasponu od  $10^2$  do  $10^5$  ml<sup>-1</sup> no, u toplijem dijelu godine, njihova se brojnost može znatno povećati zbog unosa hranjiva.

Rezultati su pokazali (Slika 17.) da je koncentracija cijanobakterija na 0 m u Valdibori bila veća na cijeloj istočnoj strani uvale, pogotovo na postajama B0, M2 i M0. Može se pretpostaviti da je obogaćenje hranjivim solima koji dolaze otpadnim vodama i ispiranjem kopna pogodovala njihovom rastu. Na 5m dubine cijanobakterije su bile najbrojnije na postajama B0 i B1 kraj kanalizacijskog ispusta bolničkog naselja. Generalno koncentracija cijanobakterija na 5m bila je manja u odnosu na površinu u cijeloj uvali, što je bilo i očekivano budući da su cijanobakterije fotosintetični mikroorganizmi. Osim dubine, na brojnost cijanobakterija je utjecala i smanjena prozirnost mora koja je posljedica ispuštanja kanalizacijskog i naročito masnog industrijskog partikulata koji znatno smanjuje prodiranje

svjetla u vodenom stupcu. Navedeni rezultati upućuju da otpadne vode mogu imati kompleksni i višestruki učinak na morske autotrofne mikroorganizme. Usporedba rezultata sa literaturnim podacima ukazuje da uvala Valdibora bez obzira na uočljiv antropogeni pritisak nema karakteristike eutrofiziranog područja.



Slika 17. Raspodjela cijanobakterija (broj stanica/ml) u površinskom sloju mora (a) i na 5 m dubine (b) u lipnju 2014. u uvali Valdibora.

## 6. Zaključci

Hidrografski uvjeti u vodama uvala Valdibora bili su tipični za istočno priobalje sjevernog Jadrana. Na području kod industrijskog ispusta razina saliniteta je generalno bila niža zbog unosa slatke vode dok je temperatura bila malo niža u odnosu na okolne postaje. Slična situacija, iako manje izražena, zabilježena je kraj kanalizacijskog ispusta bolničkog naselja. Zasićenje kisikom je bilo najniže kraj industrijskog i kanalizacijskog ispusta i blizu nižoj granici prirodnih varijacija za rovinjsko more zbog unosa antropogenog organskog materijala. Ispust tvornice za preradu ribe identificiran je kao glavni izvor onečišćenja koji jako utječe na sanitarnu kvalitetu mora do udaljenosti između 50 m i 150 m. Razine fekalnog onečišćenja kraj industrijskog i gradskog ispusta bolničkog naselja bile su nezadovoljavajuće i usporedive s onima oko glavnog gradskog kanalizacijskog ispusta u uvali Cuvi (Ivančić i sur., 2014) unatoč znatno manjoj količini ispuštenih otpadnih voda. Manja razina onečišćenja zabilježena je i kraj gradske tržnice zbog direktnog ispuštanja kanalizacijskih voda iz djela starogradske jezgre koji nisu spojeni na glavni gradski kolektor. Ostale lokacije na kojima je provedeno istraživanje kao na primjer uvala rt Muča, i središnji dio Valdibore pokazale su dobru ili čak izvrsnu sanitarnu kvalitetu mora. Također kraj kanala oborinskih voda nije zabilježeno pogoršanje sanitarne kvalitete mora.

Osim opterećenja alohtonim mikroorganizmima uvala Valdibora prima znatne količine organske tvari koje se bez odgovarajućeg tretmana ispuštaju u more. Kao posljedica toga, brojnost mikrobne zajednice bila je značajno izmijenjena u odnosu na prirodne uvjete. Brojnost heterotrofnih bakterija u onečišćenom području prelazila je granice prirodnih varijacija za rovinjsko priobalno more i bila je za red veličine veća u odnosu na kontrolne postaje (Paliaga i sur. 2015). Ostale izmjerene komponente mikrobne zajednice pokazale su suprotan trend u odnosu na bakterije, tj. broj cijanobakterija i heterotrofnih nanoflagelata bio je znatno manji na području oko industrijskog ispusta kao posljedica nepovoljnih uvjeta za njihovu fotosintetsku aktivnost i heterotrofnu ishranu.



## 7. Literatura

- Adingra AA i Arfi R.** 1998. Organic and bacterial pollution in the Ebrie' Lagoon, Côte d'Ivoire. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 36, pp: 689-695.
- Ammerman, J. W., J. A. Fuhrman, A. Hagstrom and F. Azam.** 1984. Bacterioplankton growth in seawater: 1. Growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 18: 31-39.
- Andersson AF, Riemann L, Bertilsson S.** 2010. Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Sea bacterioplankton communities. *ISME J.* **4**:171–181.
- Ashbolt, N.J., Grabow, W.O.K., Snozzi, M.** 2001. Indicators of microbial water quality. *Water Quality: Guidelines, standards and health*, World health organization (WHO), pp: 289-316.
- Azam, F.** 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science*, Vol. 280 no. 5634, pp: 694-696.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Meyer-Reil, L.A., Thingstad, F.** 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*, Vol. 10, pp: 257-263.
- Azam, F. i Smith, D.C.** 1991. Bacterial influence on the variability in the ocean's biogeochemical state: a mechanistic view. *Particles analysis in oceanography*, pp: 213-236.
- Béja O, Suzuki MT.** 2008. Photoheterotrophic marine prokaryotes, str. 131–158. *U Kirchman, DL (prir.), Microbial Ecology of the Oceans*, 2. izd. Wiley-Blackwell.
- Capone DG, Burns JA, Montoya JP, Subramaniam A, Mahaffey C, Gunderson T, Michaels AF, Carpenter EJ.** 2005. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochem. Cycles* **19**:1–17.
- Carlson CA, Morris R, Parsons R, Treusch AH, Giovannoni SJ, Vergin K.** 2009. Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwestern Sargasso Sea. *ISME J.* **3**:283–295.
- Caron, D.A., Lim, E.L., Miceli, G., Waterbury, J.B., Valois, F.W.** 1992. Grazing and utilization of chroococcoid cyanobacteria and heterotrophic bacteria by protozoa in laboratory cultures and a coastal plankton community. *Marine ecology progress series*, Vol. 76, pp: 205-217.

**Cavari, B. i Colwell, R.R.** 1988. Effect of pollution on the bacterial community structure in the coastal waters of the eastern Mediterranean sea. *Progress in oceanography*, Vol. 21, pp: 147-157.

**Chisholm SW, Olson RJ, Zettler ER, Goericke R, Waterbury J, Welshmeyer N.** 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* **334**: 340-343.

**Cohan FM.** 2001. Bacterial Species and Speciation. *Syst. Biol.* **50**:513–524.

**Cottrell MT, Kirchman DL.** 2000. Natural Assemblages of Marine *Proteobacteria* and Members of the *Cytophaga-Flavobacter* Cluster Consuming Low- and HighMolecular-Weight Dissolved Organic Matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1692–1697.

**Cottrell MT, Yu L, Kirchman DL.** 2005. Sequence and expression analyses of Cytophaga-like hydrolases in a Western arctic metagenomic library and the Sargasso Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8506–8513.

**De Corte D, Yokokawa T, Varela MM, Agogué H, Herndl GJ.** 2009. Spatial distribution of *Bacteria* and *Archaea* and amoA gene copy numbers throughout the water column of the Eastern Mediterranean Sea. *ISME J.* **3**:147–158.

**Dufour, A.P.** 1977. *Escherichia coli*: the fecal coliform. Bacterial indicators/Health hazards associated with water. American society for testing and materials, Philadelphia, pp: 48-58.

**Evison, L.M., Tosti, E.** 1980. „An appraisal of bacterial indicators of pollution in seawater“ *Progress in water technology*, vol.12, pp: 591-599.

**Fenchel, T.** 1980. Relation between particle size selection and clearance in suspension feeding ciliates. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 733-738.

**Figueras, M.J., Borrego, J.J., Pike, E.B., Robertson, W., Ashbolt, N.** 2000. Sanitary inspection and microbiological water quality. Monitoring bathing waters-A practical guide to the design and implementation of assessments and monitoring programmes, WHO.

**Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB.** 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**:14683–14688.

**Francisco, D.E., R.A. Mah and A.C. Rabin.** 1973. Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria. *Trans. Am. Microscopy Soc.*, 92: 416-421.

- Fuhrman JA, 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.
- Fuks, D.** 1995. Uloga bakterioplanktona u ekosustavu sjevernog Jadrana. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 155p.
- Fuks, D., Radić, J., Radić, T., Najdek, M. Blažina, M., Degobbis, D., Smodlaka, N.** 2005. Relationships between heterotrophic bacteria and cyanobacteria in the northern Adriatic. *Sci.Total Environ.* 353:178-188
- Garrido-Perez, M.C., Anfuso E., Acevedo, A., Perales-Vargas-Machuca, J.A.** 2008. Microbial indicators of faecal contamination in waters and sediments of beach bathing zones. *International journal of Hygiene and environmental health*, Vol. 211, 5-6; pp:510-517.
- Giovannoni SJ, Stingl U.** 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437:343–348.
- Glockner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R.** 2000. Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of *Actinobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5053–5065.
- Glover, H. E.** 1985. The physiology and ecology of the marine cyanobacterial genus *Synechococcus*. U: *Advances in Aquatic Microbiology*, H.W.Jannasch and P.J.Williams (Eds.), Vol.3, Academic Press Inc.London, pp. 49-107.
- Gonzalez-Fernandez, D., Garrido-Perez, M.C., Nebot-Sanz, E., Sales-Marquez, D.** 2010. „Fecal pollution in coastal marine sediments from a semi-enclosed deep embayment subjected to anthropogenic activities: An issue to be considered in environmental quality management frameworks development“ *EcoHealth*, vol. 7, pp: 473-484.
- Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF.** 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5:1571–1579.
- Herndl GJ, Reinthaler T, Teira E, van Aken H, Veth C, Pernthaler A, Pernthaler J.** 2005. Contribution of *Archaea* to Total Prokaryotic Production in the Deep Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2303–2309.
- Hobbie, J. E., R. J. Daley and S. Jasper:** 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 1225-1228.

**Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T.** 1993. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins, Co., Baltimore.

**Ivančić, I., Paliaga, P., Orlić, Matošević, K., Najdek Dragić, M., Gašparović, B., Šilović, T.** 2014. Preliminarna studija utjecaja fekalnog zagađenja i organske tvari iz otpadnih voda na rovinjski akvatorij: podmorski ispust „Cuvi“ u Rovinju. Institut Ruđer Bošković, Centar za Istraživanje Mora Rovinj.

**Johnson PW, Sieburth JM.** 1979. Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Oceanogr.* **24**:928–935.

**Kirchman DL.** 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**:91–100.

**Kirchman DL.** 2008. Introduction and overview, str. 1–26. u Kirchman, DL (prir.), *Microbial Ecology of the Oceans*, 2. izd. Wiley-Blackwell, New Jersey.

**Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA.** 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**:543–546.

**Korlević M.** 2015. Detaljna analiza bakterijske raznolikosti jadranskoga mora. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, PMF.

**Krstulović N., Šolić, M.** 2006. „Mikrobiologija mora“ Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split, pp:199-253.

**McManus, G.B. and J.A. Fuhrman,** 1988. Clearance of bacteria-sized particles by natural populations of nanoplankton in the Chesapeake Bay outflow plume. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **42**: 199-206.

**Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S.** 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**:14–49.

**Noblet, J.A., Young, D.L., Zeng, E.Y. i Ensari, S.** 2004. Use of fecal steroids to infer the sources of fecal indicator bacteria in the lower Santa Ana River watershed, California: Sewage is unlikely a significant source. *Environmental science and technology*, Vol. 38, pp: 6002-6008.

**Paliaga P., Najdek Dragić M., Fuks D.,** 2015. Akumulacija i postojanost fekalnog onečišćenja u Rovinjskom proibalju

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

**Pipes, W.O.** 1982. Indicators and water quality. Bacterial indicators of pollution, CRC Press Inc., Boca Raton, pp: 83-95.

**Riemann L, Leitet C, Pommier T, Simu K, Holmfeldt K, Larsson U, Hagström A.** 2008. The native bacterioplankton community in the central Baltic sea is influenced by freshwater bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:503–515.

**Sanders, R. W. and K. G. Porter.** 1988. Phagotrophic phytoflagellates. *Adv. Microbial Ecol.* **10**: 167-192.

**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, pp: 1-14.

**Schattenhofer M, Fuchs BM, Amann R, Zubkov M V, Tarran GA, Pernthaler J.** 2009. Latitudinal distribution of prokaryotic picoplankton populations in the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* **11**:2078–2093.

**Stainer RJ, Cohen-Bazire G.** 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**:225-274.

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

**Šolić, M. i Krstulović, N.** 2000. Ekologija morskog bakterioplanktona. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split

**Turk, V., N. Fanuko, U. Larsson, A. Malej and A. Hagstrom.** 1992. Timescale of microbial foodweb dynamics in the shallow Gulf of Trieste (North Adriatic). U: *The microbial food web: Time scales and nutrient dynamics in the Gulf of Trieste*. V. Turk (Ed.), University of Umea, Sweden, pp. 1-21.

**Vergin KL, Beszteri B, Monier A, Cameron Thrash J, Temperton B, Treusch AH, Kilpert F, Worden AZ, Giovannoni SJ.** 2013. High-resolution SAR11 ecotype dynamics at the Bermuda Atlantic Time-series Study site by phylogenetic placement of pyrosequences. *ISME J.* **7**:1322–1332.

**Wang Y, Lin W, Li J, Pan Y.** 2013. High Diversity of Magnetotactic Deltaproteobacteria in a Freshwater Niche *Appl. Environ. Microbiol.* (2013) vol.79, 8, pp:2813-2817.

**Waterbury JB, Watson SW, Guillard RRL, Brand LE.** 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature* **277**:293–294.

**Waterbury, J.B. and R.Y. Stanier.** 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.

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

**Williams, P.M.** 1986. Chemistry of the dissolved and particulate phases in the water column. U.; Plankton dynamics of the Southern California Bight, R.W.Eppley (Ed.), Springer/Verlag, Berlin. pp. 53-83.

**Zhang R, Baozhong L, Lau SCK, Ki J-S, Quian P-Y.** 2007 Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbour, Hong Kong" FEMS Microbiol. Ecol. vol. 61, pp. 496-508.

Izvori slika:

Slika 1. [http://fulir.irb.hr/2087/1/Korlevi%C4%87\\_2015.pdf](http://fulir.irb.hr/2087/1/Korlevi%C4%87_2015.pdf)

Slika 2. [http://fulir.irb.hr/283/1/Silovic\\_ZS3V\\_2011.pdf](http://fulir.irb.hr/283/1/Silovic_ZS3V_2011.pdf)

Slika 3. <http://www.io-warnemuende.de/bio-ag-molbio-aquatic-protists.html>

Slika 4. [http://www.bionet.nsc.ru/misc/ecopro/eng/4\\_4.html](http://www.bionet.nsc.ru/misc/ecopro/eng/4_4.html)

Slika 5.

<http://hoopmanscience.pbworks.com/w/page/47828206/Water%20Monitoring%3A%20%20C%20oliform>

[http://www.ozcoasts.gov.au/indicators/marine\\_pathogens.jsp](http://www.ozcoasts.gov.au/indicators/marine_pathogens.jsp)

<http://www.himedialabs.com/intl/en/products/Microbiology/Dehydrated-Culture-Media-Diagnostic-Animal-based-Media-Bacterial/Bile-Esculin-Agar-M972>

Slika 7.

<http://www.osil.co.uk/Products/Ignore/tabid/56/agentType/View/PropertyID/66/Default.aspx>

Slika 8. <http://www.mbelectronique.fr/Oceanography%20-%20CTD%20Calibration.pdf>

Slika 9. <http://www.slideshare.net/HamaNabaz/water-microbiology-21923074>