

АКТИВНОСТ ФОСФАТАЗА КАО ПОУЗДАН ПОКАЗАТЕЉ У МОНИТОРИНГУ ЕУТРОФИКАЦИЈЕ ПОВРШИНСКИХ ВОДА

Милан Н. Матавуљ, Свјетлана Б. Лолић, Иван М. Матавуљ

¹Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију, Трг д. Обрадовића 2, Нови Сад, Србија (milan.matavulj@dbe.uns.ac.rs),

²Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет, Одсек за биологију, Ул. М. Стојановића, Бања Лука, Република Српска, БиХ

³Prozone d.o.o. IT development and implementation company, Нови Сад, Србија

Abstract

MATAVULJ N. Milan, LOLIĆ B. Svjetlana, MATAVULJ M. Ivan: PHOSPHATASE ACTIVITY AS A RELIABLE INDICATOR OF MONITORING OF SURFACE FRESHWATER EUTROPHICATION. [University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, D. Obradovicaya Square 2 (milan.matavulj@dbe.uns.ac.rs), Serbia, University of Banya Luka, Faculty of Sciences, Department of Biology, M. Stojanovicaya Str, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, Prozone d.o.o. IT development and implementation company, Pushkinova 26 Str., N.Sad]

Experience shows that the majority of biological indicators, density of microbial population or the qualitative composition of microorganisms, stay certain period unchanged in water even when the sources of pollution disappear. This fact frequently causes a contradictory data regarding to the water quality, especially when it has been estimated on the basis of both, biological and chemical parameters. A statistically significant correlation was found between these two groups of parameters, leading us to the conclusion about the possibility of use of the water enzyme, primarily water phosphatase activity level as an indicator of eutrophication degree, or the quality of water and its status from the organic biodegradable matter load point of view. At the same time, in the course of our investigations, water samples having various electrochemical reaction showed the influence of their different pH on the expression of "pH-specific" enzymes: acid, neutral, alkaline, eliminating thus the possibility of use only one of three pH-specific enzyme groups as an universal indicator of phosphatase activity level, and consequently as an universal indicator of the degree of load by biodegradable organic pollutants. From this reason, we have derived a mean value of the level of activity of all three enzyme groups (acid, neutral, and alkaline phosphatase). This "average phosphatase activity", designed as the Phosphatase Activity Index (PAI), "neutralize" the effect of water pH on the level of pH-specific phosphatase activity. In the same time it represents, in fact, the mean value of the "potential activity" of acid, neutral, and alkaline phosphatases, because all three enzyme groups have shown their activity under the optimal experimental conditions, where the pH of reaction mixture is being adjusted to 5.0 for acid, 7.0 for neutral, and 9.0 for alkaline phosphatase. Only by determination of such a potential enzyme activity it was possible to unify the methodology for investigation of various surface freshwater, and for different samples of the same water environment, having very dynamic nature. Some 30 years ago the new standardized system of surface freshwaters categorization according to the water Phosphatase Activity Index (Matavulj, 1986, Matavulj *et al.*, 1988) was proposed.

Key words: Surface freshwater, eutrophication, monitoring, phosphatase activity index, PAI

Сажетак

Загађења природних вода аутохтоним или алохтоним отпадом представљају биолошки феномен, те је логично да их треба мерити биолошким показатељима.

Међутим, због проблема приликом њихове квантификације, ови показатељи често бивају запостављени. Искуство показује да ће већина биолошких индикатора, густина популације микроорганизама или њихов квалитативни састав, остати извесно време непромињени у води, чак и када извори загађења нестану. Ова чињеница често доводи до контрадикторних података, поготово када се квалитет воде процењује на основу и биолошких и хемијских параметара. У ранијим истраживањима нађена је статистички значајна корелација између ове две групе параметара, што је довело до закључка о могућности коришћења ензимске, пре свега фосфатазне активности воде као показатеља степена еутрофикације или квалитета воде и њеног статуса са аспекта оптерећења органским биоразградивим материјама. У исто време, у току наших испитивања, узорци воде различитих електрохемијских реакција показала су утицај различитих рН вредности на експресију "рН-специфичних" ензима: киселих, неутралних и алкалних фосфатаза, елиминишући на тај начин могућност коришћења само једног од три рН-специфичне групе ензима, као универзалног индикатора нивоа фосфатазне активности, а самим тим и као универзалног показатеља степена оптерећења воде биоразградивим органским загађујућим материјама. Из тог разлога, изведена је средња вредност нивоа активности све три групе ензима (киселих, неутралних, и алкалних фосфатаза). Ова "просечна фосфатазна активност", дефинисана као „Индекс фосфатазне активности“ (ИФА), "неутралише" ефекат различитих електрохемијских реакција воде на активност рН-специфичних фосфатаза. У исто време ова вредност представља, средњу вредност "потенцијалних активности" киселих, неутралних и алкалних фосфатаза, јер су све три групе ензима показале своје дејство под оптималним експерименталним условима, где се рН реакционе смеше прилагођава на 5,0 за киселе, на 7,0 за неутралне, и на 9,0 за алкалне фосфатазе. Само одређивањем те потенцијалне активности ензима било је могуће обједињавање методологије за истраживање различитих узорака различитих површинских слатководних екосистема, иначе веома динамичне природе.

Кључне речи: Слатке воде, еутрофикација, мониторинг, индекс фосфатазне активности, ИФА

УВОД

Не тако давно прокламовани орживи развој упућује нас да још више пажње посветимо загађењима површинских вода, као и њиховој заштити, очувању и унапређењу квалитета површинских слатких вода. У току последњих деценија све већи број еколошких студија бави се сложеним процесима у акватичним екосистемима. Један од резултата је повећано интересовање за улогу водених микроорганизама и за биохемијске процесе којима се загађујуће органске материје преводне у микроорганизмима доступне нутријенте. Метаболизам сапротрофних микроорганизама представља кључну тачку на којој се одигравају битни процеси метаболизма хранљивих материја, као што су циклуси кружења нутријената, трансформације и минерализације органске материје и проток енергије кроз екосистеме. Мерење активности хетеротрофних микроорганизама у природним водама је стога веома важно за разумевање путева и динамике трансформације органског угљеника и других органских материја између различитих трофичких нивоа у површинским слатким водама. Метаболичка активност сапротрофних микроорганизама важна је и из других разлога: мали организми, као што су бактерије, микроалге и микрогљиве имају кратко време генерације и најинтензивније метаболичке процесе по јединици биомасе.

Оптерећења природних вода аутохтоним или антропогеним отпадом представљају биолошки феномен, те је логично да их треба мерити биолошким показатељима (James, 1979). Праћење квалитета површинских вода, међутим, врши се најчешће или само са биолошког или пак само са физичко-хемијског аспекта. Такви

искључиви приступи не узимају у обзир различитост информација које те две врсте анализа пружају. Већина биолошких параметара су индикатори еколошке равнотеже или степена неравнотеже, проузроковане дуготрајнијим или комплексним деловањем различитих фактора. Хемијским методама мере се резултантне, тренутне концентрације појединих полутаната који су само потенцијално одговорни за стање и квалитет воде. Према нашим искуствима, независан физичко-хемијски, или независан биолошки приступ, често ограничен само на санитарни бактериолошки аспект, из много разлога су недовољни и неадекватни за процену стања и квалитета воде.

На основу концентрације полутаната не може се проценити стање биоценозе воденог екосистема као значајног фактора стања воде и ресурса водоснабдевања; с друге стране, биолошки индикатори, нарочито показатељи санитарног статуса, не мењају се квантитативно и квалитативно напореда са променом концентрације других контаминаната.

Управо због тога се често добијају контрадикторни подаци о стању воде. Отуд се биохемијски приступ приликом мониторинга стања и квалитета вода намеће се као карика која ће повезати биолошке и хемијске методе у оваквим истраживањима. Оваква повезаност могућа је из разлога што индикаторски организми остају присутни у води још извесно време након нестанка хранљивог супстрата; што са појавом веће концентрације нутријената не долази до истовремене и истопросторне промене квалитативног и квантитативног састава популација индикаторских организама; и што је биохемијски одговор затечене популације, заснован на индуковању продукције и активности адаптивних ензима скоро тренутчан.

Савремене биохемијске методе, од којих је једна мерење ензимске активности воде, омогућавају квантификацију трансформације органских полутаната присутних у испитиваном узорку воде од стране органотрофне компоненте водене микрофлоре. Оваква информација повезује концентрацију органских загађујућих материја и брзину њихове минерализације с једне, са физиолошким стањем хетеротрофних сапротрофа с друге стране, што обезбеђује увид у “екофизиолошко стање воде” уколико је посматрамо као специфичан “биосистем”. Резултати наших ранијих истраживања (Matavuls и сар., 1976, 1978, 1990; Gajin и Matavuly, 1977), указују на универзално присуство фосфомоноестар-хидролаза (киселих, неутралних и алкалних фосфатаза) код водених микроорганизама. Фосфатазе се код њих јављају као слободни у њиховом воденом окружењу (егзоензими), или причвршћени за ћелију (ектоензими), или за честице супстрата, тзв. партикуларни ензими. Такође се налазе и као интрацелуларни ендоензими; конститутивни и/или адаптивни.

Будући да повећана концентрација комплексних органских полутаната индукује продукцију и повећан ниво активности ових ензима, степен њихове активности у води одражава ниво хетеротрофне активности присутних микроорганизама и посредно указује на концентрацију органофосфатних полутаната. Пошто је овај тип органских једињења релативно пропорционално заступљен у укупним комплексним полутантима, ниво фосфатазне активности воде осликава стање укупног органског оптерећења водених екосистема.

Упоредним анализама квалитета вода класичним микробиолошким и модерним биохемијским (ензимолошким) методама установили смо висок степен подударности микробиолошких и ензимолошких индикатора оптерећења воде органским контаминантима (Matavuly, 1986; Matavuly и Flint, 1987; Matavuly и сар., 1982, 1984b, 1988, 1989).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Одређивање фосфатазне активности воде

Предност биохемијских, ензимолошких метода у одређивању степена оптерећености воде органским полутантима над другим, посебно микробиолошким методама, је у томе што се релативно брзо (највише за два сата од приспећа узорка у лабораторију) долази до резултата на основу којих је могуће извршити прелиминарну процену стања воде. Уз елементарно опремљену покретну лабораторију, снабдевену спектро-фотометром и воденим купатилом, овакве анализе могуће су и на терену.

Потребан материјал: стерилне епрувете или реагенс бочице; стерилне пипете (1 ml и 10 ml); стерилна дестилована вода; стерилан ТТА пуфер (раствор који се састоји од: 0,33 mol/dm³ Трис (трис-хидроксиметил-аминометан - Tris-Hydroxymethyl-Aminomethane), 0,33 mol/dm³ TES (N-трис-хидроксиметил-метил-2-аминоетансулфонска киселина - N-tris-Hydroxymethyl-Methyl-2-Aminoethanesulfonic Acid) и 0,33 mol/dm³ глацијалне сирћетне киселине) рН 5,0, 7,0 и 9,0, које треба подесити помоћу 2N HCl и 2N NaOH; 10N раствор NaOH за прекидање ензимске реакције; водено купатило; центрифуга, спектрофотометар; стерилан 5% раствор паранитрофенилфосфата (pNPP) у дестилованој води (прави се непосредно пред употребу хладном стерилизацијом кроз милипор-филтре); шприц боца са дестилованом водом.

Поступак: У три реагенс бочице или епрувете додати по 2,4 ml узорка воде, по 0,3 ml стерилног раствора пуфера одговарајућег рН (редом 5, 7 и 9) и по 0,3 ml раствора pNPP. За сваки узорак ово урадити у три понављања (по три пута за сваки рН). Као контролу, уместо узорка користити стерилну дестиловану воду. Промућкана мешавина у бочицама се инкубира један сат у воденом купатилу на 30°C. Реакцију прекинути додавањем 0,1 cm³ 10N NaOH. Центрифугирати 5-10 минута на 3000 рпм. Као последица реакције, смеша ће се обојити у жуто услед настанка пара-нитрофенола (pNP). Интезитет жуте боје сразмеран је нивоу фосфатазне активности узорка. Екстинкцију прочитати на 420 nm за узорке и контроле при чему се као слепа проба користи стерилна дестилована вода.

Фосфатазна активност воде се изражава као индекс фосфатазне активности - ИФА који се израчунава применом коефицијента моларне екстинкције према следећој формули:(Flint, 1974) при чему је:

$$IFA(\text{molpNP} / \text{s} / \text{dm}^3) = \frac{D \cdot V \cdot C \cdot 1000}{v \cdot t \cdot d}$$

D = разлика у екстинкцији на 420 nm између пробе и контроле;

V = укупна запремина реакционе смеше (cm³);

C = коефицијент моларне екстинкције (за рН изнад 8,5 он износи 90,9);

v = запремина узорка (cm³);

t = време трајања реакције у секундама ;

d = дужина пута светлости кроз кивету (cm);

Поштујући горе описани поступак, при чему се читавање врши у киветама код којих је $d=1$ cm формула добија скраћени облик:

$$IFA(\text{mol} / \text{s} / \text{dm}^3) = 33,667 \cdot D$$

Јединица ензимске активности дефинише се као количина трансформисаног супстрата (pNPP и pNP) у mol у секунди по јединици запремине од 1 dm³.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Будући да повећана концентрација комплексних органских полутаната индукује продукцију и повећан ниво активности ових ензима, степен њихове активности у води одражава ниво хетеротрофне активности присутних микроорганизама и посредно указује на концентрацију органофосфатних полутаната. Пошто је овај тип органских једињења релативно пропорционално заступљен у укупним комплексним полутантима, ниво фосфатазне активности воде осликава стање укупног органског оптерећења водених екосистема као рецепијената.

Статистички значајну корелацију између класичних микробиолошких (укупан број бактериопланктона, број хетеротрофних и број факултативно олиготрофних бактерија, број продуцента фосфатаза, Т/Н индекс сапробности, О/Н индекс), хемијских (количина органских фосфата, количина ортофосфата) и биохемијских (ВРК₅) показатеља квалитета површинских вода, сматрали смо релевантном основом за предлагање и увођење нивоа фосфатазне (фосфомоноестар-хидролазне) активности воде као допунског биохемијског индикатора у мониторингу квалитета вода.

Пошто је код вода са варијабилном електрохемијском реакцијом уочен утицај рН на активност рН-специфичних ензима за индиковање органског оптерећења, израчунат је индекс фосфатазне активности као средња вредност активности киселих, неутралних и алкалних фосфомоноестар-хидролаза, и то њихове потенцијалне активности, пошто је одређивана при подешеним рН оптимумима и температури од 30°C.

Одређивањем овакве “потенцијалне активности” униформисана је методологија за испитивање различитих вода, као и динамичке природе вода истог станишта и локалитета.

Упоредним анализама квалитета вода класичним микробиолошким и модерним биохемијским (ензимолошким) методама установљен је висок степен подударности микробиолошких и ензимолошких индикатора оптерећења воде органским контаминантима (Matavuly, 1986; Matavuly и сар., 1982, 1984b, 1987, 1988, 1989a,b). Статистички сигнификантну корелацију између класичних микробиолошких (укупан број бактериопланктона, број хетеротрофних и број факултативно олиготрофних бактерија, број продуцента фосфатаза, Т/Н индекс сапробности, О/Н индекс), хемијских (количина органских фосфата, количина ортофосфата) и биохемијских (БПК₅) показатеља квалитета површинских вода, сматрали смо релевантном основом за предлагање и увођење нивоа ензимске (фосфатазне) активности воде као допунског биохемијског индикатора у мониторингу квалитета вода..

Будући да је код вода са варијабилном електрохемијском реакцијом уочен утицај рН на активност рН-специфичних ензима за индиковање органског оптерећења израчунат је “Индекс фосфатазне активности” као средња вредност активности киселих, неутралних и алкалних фосфомоноестар-хидролаза, и то њихове потенцијалне активности пошто је одређивана при подешеним рН оптимумима и температури од 30°C. Одређивањем овакве “потенцијалне активности” униформисана је методологија за испитивање различитих вода, као и веома динамичке природе вода истог станишта и локалитета.

Поређењем са раније установљеним системима класификације и карактеризације слатких површинских вода на основу микробиолошких и других индикатора (Matavuly и сар., 1982, 1984a,b), пре око 30 година објавили смо први стандардизован систем за одређивање квалитета површинских вода у смислу њиховог оптерећења биоразградљивим, нетоксичним органским полутантима, а на основу индекса фосфатазне активности (ИФА) (Matavuly, 1986), или PAI (Phosphatase Activity Index) (Matavuly и сар. 1990) (Табела 1). Током протеклих деценија ова нова биохемијска метода коришћена је у мониторингу стања и квалитета воде река (Gajin

и сар., 1982, 1984, 1985, 1987, 1989а, б, 1990а,с, 1992б, 1993а, б, 1995; Матавуљ и сар., 1989а,б; Petrović и сар. 1996) и језера (Матавуљ и сар., 1984; Gajiћ и сар. 1989, 1990б, 1991, 1992а, 1994а, б; Матавуљ и Flint, 1987; Dyukić и сар., 1991) наших географских простора. Фосфатна активност хетеротрофне микрофлоре испитивана је и као показатељ процеса пречишћавања отпадних вода, како у лабораторијским уређајима, тако и у системима за пречишћавање отпадних вода производних погона (Petrović и сар. 1982, 1985, 1995; Матавуљ и сар., 1983, Gantar и сар., 1986).

Сазнања и уверења истраживача о недоречености и мањкавости постојећих система процене стања и квалитета површинских вода резултовала су предлозима увођења нових, и по мишљењу предлагача комплетнијих и поузданијих. Један од таквих система је и Water Quality Index (WQI), предложен од стране Engineering Division of the Scottish Development Department (1976) (Ћирић и Николић, 1995). Значајно је и интересантно нагласити да је висок степен подударности фосфатне активности и класичних микробиолошких показатеља квалитета воде уочен код различитих типова испитиваних површинских вода (реке, реципијентне воде, отпадне воде итд. – Petrović и сар., 1982., Petrović и сар., 1995; 1996; 1997б).

Табела 1. Категоризација воде према оптерећености органским полутантима а на основу индекса фосфатне активности воде ИФА (PAI) (Матавуљ, 1986, Матавуљ и сар., 1990)

Индекс фосфатне активности (ИФА) (mol/s/dm ³ pNP) 30 °C	Предлог назива категорије	Особине воде (условно)	одговара класификацији по		
			Kohl-y (1975)	Tümping-y (1969)	Pantle-Buck-y (1955)
испод 0.01	IA	максимално чиста	I	I	катаробна зона
0.01-0.10	IB	веома чиста			
0.10-0.25	I-II	чиста			
0.25-0.50	IIA	задовољавајуће чиста	I-II		олигосапробна зона
0.50-1.00	IIB	слабо загађена	II		
1.00-2.50	II-III	умерено загађена	II-III	II	- мезосапробна
2.50-5.00	IIIA	загађена	III	III	-
5.00-7.50	IIIB	веома загађена	III-IV		мезосапробна
7.50-10.00	III-IV	прљава	IV	IV	- мезосапробна
10.00-15.00	IVA	веома прљава			
15.00-20.00	IVB	максимално прљава			
изнад 20.00	V	изван категорија за воде			

Лабораторије неких земаља које припадају Међународној асоцијацији за истраживање Дунава (IAD) већ су објавиле системе за процену квалитета воде са санитарне тачке гледишта. Један од таквих система објавили су Кавка и сарадници (Кавка и сар., 1996), предлажући -глукуронидазну активност воде као специфичног показатеља присуства колиформних бактерија. Према другим подацима у литератури (Miković и сар., 1984, Gardinovachki и сар., 1995.), предлажу ниво активности ензима, као што су -глукозидазе, дехидрогеназе, аминокептидазе, протеиназе, липазе, целулазе, и друге, који такође могу да буду од користи као показатељи специфичних загађења вода.

Као закључак, подвлачимо наша позитивна искуства у коришћењу метаболичке активности акватичних микроорганизама у виду нивоа њихове фосфатазе активности у води као добар и поуздан индикатор за брзу прелиминарну процену процеса еутрофикације површинских слатких вода, што потврђују и радови других истраживача (Olsson, 1990; Newman и сар., 2003; Trojanowska, 2005; Song и сар., 2006; Touchette и сар., 2007; Todorova и Topalova, 2009; Zlatković и сар., 2010).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ћирић, Б., М. Николић (1995): Прилог југословенској легислацији из области контроле квалитета водотока. Зборник конференције „Заштита вода '95“: 412-415.
2. Dyukicy, D., M. Matavuly, G. Markovicy, L. Mandicy, S. Simonovicy, I. Jurishicy (1997) : Saprobiological analysis of the River Zapadna Morava water quality. Proc. 32. Konferenz der IAD der SIL, Wien, Österreich, pp. 423-426.
3. Flint, K.P., J.W. Hopton (1977): Substrate specificity and ion inhibition of bacterial and particle associated alkaline phosphatase of waters and sewage sludges. Eur. J. Appl. Microbiol., 4: 195-204.
4. Gardinovachki, G., G. Grubor-Lajshicy, M. Matavuly, O. Petrovicy, A. Jovanovicy (1995): Microbial ectoenzyme activity in the water quality estimation. Proc. VII Yug. Congr Microbiol., Herceg Novi, p.197.
5. Gajin, S., O. Petrovicy, M. Matavuly, M. Gantar (1982): Die Bewertung der Wasserqualität der Jugoslawischen Donaustrecke aufgrund einiger Mikrobiologischen Parameter. 23. Arbeitstagung der IAD der SIL, Wissenschaftliche Kurzreferate, 62-64.
6. Gajin, S., M. Matavuly, O. Petrovicy, M. Gantar (1985): Die Mikrobiologischen kennziffern des Einflusses der Stauwerk auf die Wasserqualität des Theissflusses. 25. Arbeitstagung der IAD der SIL Wissenschaftliche Kurzreferate, 155-158.
7. Gajin, S., M. Matavuly, O. Petrovicy, M. Gantar, Z. Obrecht (1987): Ergebnisse mikrobiologischer Untersuchungen des Donauwassers im Jugoslawischen Flussabschnitt. 26. Arbeitstagung der IAD der SIL, Wissenschaftlichen Kurzreferate, 481-484.
8. Gajin, S., M. Gantar, M. Matavuly, Z. Obrecht, M. Erbezhnik (1989): The dominant bacterioflora in the water of the river Tisa and the Mrtva Tisa. Tiscia (Szeged), 23: 37-42.
9. Gajin, S., M. Gantar, M. Matavuly, O. Petrovicy (1990): The long term investigation of the river Danube water quality in the Yugoslav section according to microbiological parameters. Water Sci. Techn. 22, 5, p. 39-44.
10. Gajin, S., M. Gantar, M. Matavuly, O. Petrovicy, Z. Obrecht, D. Radnovicy (1992): Microbiological indicators of the water quality of backwater Tisza with special reference to the oligotrophic microflora. Tiscia (Szeged), 26: 43-48

11. Gajin, S., M. Matavuly, O. Petrovicy, D. Radnovicy, Z. Obreht (1994a): Eutrophisierung des Bergstausees Sot. Der XXX Arbeitstagung der IAD der SIL, Zuoz, Switzerland:407.1 - 407.4.
12. Gajin, S., O. Petrovicy, M. Matavuly, D. Radnovicy, Z. Obreht (1994b): Eutrophisierung des Bergstausees Borkovac. XXX. Arbeitstagung der IAD der SIL, Zuoz, Switzerland, p. 405-407.
13. Gajin, S., M. Matavuly, O. Petrovicy, D. Radnovicy, Z. Svirchev, Z. Jovanovicy, I. Tamash (1996): Mikrobiologische Wassergüte der Donau bei der Stadt Novi Sad (1991-1995). 31. Konferenz der IAD der SIL, Baja/Ungarn, 25-29 August,1996. Wissenschaft. Referate, Band I: 363-367.
14. Гајин, С., С. Ћурчић, Љ. Чомић, О. Петровић, М. Матавуљ (2003): Хидроакмулације и проблем еутрофизације воде. „Хидроакмулације, мултидисциплинарни приступ одрживом развоју“. ПМФ Универзитета у Новом Саду. Уредници: А. Иванц и Б. Миљановић, стр.: 145-155.
15. James, A. (1979): The value of biological indicators in relation to other parameters of water quality. In "Biological indicators of water quality, A. James and L. Evison eds., John Wiley and sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto.
16. Jones, J.G. (1972): Studies of freshwater microorganisms phosphatase activity in lakes of differing degrees of eutrophication. *J. Ecol.*, 60: 777-791.
17. Kavka, G.G., B. Berger, B.M. Hoch, G.J. Herndl (1996): assessment of microbiological water quality in the austrian section of the river danube. *Arch. Hydrobiol., Suppl. 113. Large Rivers 1-4*: 79-86.
18. Kohl, W. (1975): Über die bedeutung Bakteriologischer Untersuchungen für die Beurteilung von fleissgewässern, dargestellt am beispil der Österreich donau. *Arch. Hydrobiol.*, 44: 392-461.
19. Matavuly, M., V. Palanachki, O. Ristic (1976): Phosphatase activity of heterotrophic bacteria from the river and sea water. *Mikrobiologija (Belgrade)*, 13, (1): 89-95.
20. Matavuly, M., G. Grubor, V. Palanachki (1978): Activity of extracellular phosphomonoester-hydrolases in acid, alkaline and neutral media of some heterotrophic bacteria isolated from the river Danube water. *Mikrobiologija (Belgrade)*, 15 (1): 49-57.
21. Matavuly, M., S. Gayin, M. Gantar, O. Petrovicy (1982): Enzyme activity as a parameter for the water condition estimation. *Vodoprivreda (Belgrade)*, 14, 78-79(1982/4-5): 225-235 .
22. Matavuly, M., O. Petrovicy, B. Dalmaciya, S. Gayin, S. Stoyilkovicy (1983): Phosphatase activity as an indicator of the process of purification of oil refinery waste water in a laboratory pilot plant. *Vodoprivreda (Belgrad)* 15, 82-83(1983/2-3): 165-172.
23. Matavuly, M., O. Petrovicy, S. Gayin, M. Gantar, M. Bokorov, M. Erbezhnik, S. Stoyilkovicy (1984a): Korrelation zwischen Phosphatase-Aktivität und mikrobiologischen kennzifern der qualität des Donauwasser. 24. Arbeitstagung der IAD - Wissenschaftliche Kurzreferate I, p.57-60.
24. Matavuly, M., S. Gayin, M. Gantar, O. Petrovicy, M. Erbezhnik, M. Bokorov, S. Stoyilkovicy (1984b): Phosphatase activity as an additional parameter of water condition estimate in some lakes of Voyvodina Province. *Mikrobiologija*, 21, 1: 53-61.
25. Matavuly, M. (1986): the nonspecific phosphomonoester-hydrolases and their importance in phosphorus cucle in aquatic environments. PhD Thesis, Faculty of Sciences, University of Zagreb.
26. Matavuly, M., K.P. Flint (1987): A model for acid and alkaline phosphatase activity in a small pond. *Microbial Ecology*, 13 (2): 141-158.

27. Matavuly, M., M. Bokorov, S. Stoyilkovicy, S. Gayin, M. Gantar, M. Erbezhnik, O. Petrovicy (1988): Water enzyme activity as a monitoring parameter. Proc. Yug. Conf. "Water protection '88":182-192.
28. Matavuly, M., S. Gayin, M. Erbezhnik, M. Bokorov, O. Petrovicy (1989): Phosphatase activity of water as a parameter of the river Tisa water monitoring. Tiscia (Szeged), 23, 29-36.
29. Matavuly, M. M. Bokorov, S. Gayin, M. Gantar, S. Stoyilkovicy, K.P. Flint (1989): Phosphatase activity of water as a monitoring parameter I. Proc. International Conference on water pollution control in the basin of the river Danube, Novi Sad, 20- 23.06.1989, pp.378-384.
30. Matavuly, M., M. Bokorov, S. Gayin, M. Gantar, S. Stoyilkovicy, K.P. Flint (1990): Phosphatase activity of water as a monitoring parameter II. Water Science and Technology, 22 (5): 63-68.
31. Matavuly, M., S. Gayin, M. Bokorov (1990): Seasonal dynamics of phosphomineralizers in the fishpond water and their relationship with another members of microbocenosis. I – Fishpond Futog 2. Proc. II. Yug. Symp. Microb. Ecol., Zagreb , 16- 19.10.1990: 219-227.
32. Matavuly, M., M. Bokorov (1991): A critical review of the method of phosphomineralizing microorganisms identification according to their acidogenesis capability. Proc. Nat. Sci. Matica Srpska (Novi Sad), 81: 99- 118.
33. Matavuly, M., S. Gayin, O. Petrovicy, Z. Svirchev, D. Radnovicy, M. Bokorov, I. Tamash (1996a): Water Quality of the Danube-Tisa-Danube canal at the Bezdan - Vrbas section according to microbiological and enzymological parameters. 31. Konferenz der IAD der SIL, Baja/Ungarn, 25-29 August 1996, Wissenschaftliche Referate, Band I: 29-34.
34. Mikovicy, Z., V. Palanachki, M. Matavuly, S. Gajin, M. Gantar, O. Petrovicy (1984): The possibility of use of dehydrogenase activity as an indicator in water condition estimation. Proc. 3rd Congr. Ecol. Yug., Book 1, p.186.
35. Nemes, K, M. Matavuly, S. Gajin, R. Bugarski, J. Simeunović , Z. Lozanov-Crvenković , B. Dalmacija (2008): Phosphatase activity index: A reliable parameter for monitoring the point sources of pollution and sustainable development. BALWOIS 2008 CD-ROM of Proc. Conf. on Water Observation and Information System for Decision Support“, Ohrid, 27-31. 05, No 382: 1-8.
36. Newman, S, P.V. McCormick, J.G. Backus (2003): Phosphatase activity as an early warning indicator of wetland eutrophication: problems and prospects. Journal of Applied Phycology, 15, 1: 45-59.
37. Olsson, H. (1990): Phosphatase activity in relation to phytoplankton composition and pH in Swedish lakes. Freshwater Biology, [23, 2: 353–362](#) .
38. Pantle, R., H. Buck (1955): die biologische Überwachung der gewässer und die darstellung der ergebnisse. Gas und Wasserfach, 96: 604-609.
39. Petrovicy, O., M. Matavuly, B. Dalmacija: Joint purification of the oil refinery and municipal waste water in laboratory pilot plant. Vodoprivreda (Belgrade),14, 78-79 (1982/4-5): 341-348 (1982) .
40. Petrovicy, O, S. Gajin, M. Matavuly, M. Gantar, B. Dalmacija (1985): Microbiological investigations of process of purification of the oil refinery waste water. Mikrobiologija (Belgrade), 22, 1: 85-96.
41. Petrovicy, O, D. Radnovicy , M. Matavuly (1994) : Fähigkeit der Bakterien aus Donauwasser zur produktion der Grenzenflächenaktiven stoffe. XXX. Arbeitstagung der IAD der SIL, Zuoz: 297-299 .
42. Petrovicy, O., S. Gajin, M. Matavuly, D. Radnovicy, Z. Svirchev, I. Tamash (1996): Mikrobiologische Überwachungsergebnisse über die Gewässergüte

- der Oberflächengewässer. 31. Konferenz der IAD der SIL, Baja, Ungarn, 25-29. Aug. 1996., Wiss. Ref., Band I: 391-393.
43. Petrović, O., D. Radnović, T. Galonya, M. Matavuly (1997a) : Myxobacteria and phosphatase activity as an indicators of the organic pollution of the river Danube organic pollution of the river Danube water near Novi Sad. Proc. Yug."EKO-Conf. '97", Novi Sad: 121-124.
 44. Petrović, O., D. Radnović, Z. Svirčev, S. Stojković, V. Krunić (1995): Microbiological indicators of sugar refinery wastewater selfpurification. Proc. I Regional Symposium: Chemistry and the Environment, Vrnyachka banya: 879-882.
 45. Sladeček, V. (1973) : sistem of water quality from the biological point of view. Ergebnisse der Limnologie, 7: 1-218.
 46. Smith, R.E.H., J. Kalff (1981): The effect of phosphorus limitation on algal growth rates: evidence from alkaline phosphatase. Can. J. Fish. aquat. Sci., 38: 1421-1427.
 47. Song, C., X. Cao, J. Li, Q. Li, G. Chen, Y. Zhou (2006): Contributions of phosphatase and microbial activity to internal phosphorus loading and their relation to lake eutrophication. Science in China Series D: Earth Sciences Volume 49, Supplement 1: 102-113.
 48. Todorova, Y., Y. Topalova (2009): Microbial response to accidental organic pollution in selected part of Iskar river. XI Anniversary Scientific Conference. Biotechnol. & Biotechnol. EQ. 23/2009/SE. 120 years of academic education in biology; 45 years of the Faculty of Biology, Sofia University "St. Kliment Ohridski", Faculty of Biology, Sofia, Bulgaria, pp. 433-438. Special edition/on line.
 49. Touchette, B.W., A.M. Burkhold (2007): Effects of temperature and nitrate on phospho-monoesterase activities between carbon source and sink tissues in *Zostera marina* L. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 342, 2: 313-324.
 50. Trojanowska, A. (2005): Alkaline phosphatase: Role in phosphorus regeneration and cyanobacterial blooms formation. Ecohydrology and Hydrobiology, 5, Issue SUPPL.:71-81 .
 51. Tümpling, W. (1969): zur klassifizierung der wasserbeschaffenheit aus biologischer sicht. Wiss. Z. Univ. Rostock, 18: 793-798.
 52. Vernichenko, A.A. (1984): classification of surface freshwaters based on quality estimation. In: Complex estimate of surface freshwater quality, Leningrad, Gidrometeoizdat, pp: 14-24 (in Russian).
 53. [Zlatković S.](#), D. [Šabić](#) , M. [Milinčić](#) , J. [Knežević-Vukčević](#) , S. Stanković (2010): Geographical and biological analysis of the water quality of Bovan Lake, Serbia. Archives of Biological Sciences, 62, 4: 1083-1089.

Примљено: 02. 12. 2010.

Одобрено: 21. 07. 2011.