

# Vremenska raspodjela fitoplanktona u Vranskom jezeru na Cresu i Vranskom jezeru kod Biograda

---

Jepure, Viktoria Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:694301>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Viktorija Mia Jepure

**Vremenska raspodjela fitoplanktona u  
Vranskom jezeru na Cresu i Vranskom  
jezeru kod Biograda**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Viktorija Mia Jepure

**Temporal distribution of phytoplankton in  
Vrana Lake at Cres and Vrana Lake near  
Biograd**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za procese taloženja na Zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković pod voditeljstvom dr. sc. Sandija Orlića (Zavod za kemiju materijala, Institut Ruđer Bošković, 10000 Zagreb, Hrvatska) te suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Marije Gligore Udovič (Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

# **Zahvale**

*Za početak, najveća zahvala mentoru dr. sc. Sandiju Orliću na pruženoj prilici i povjerenju tijekom izrade diplomskog rada.*

*Neizmjereno hvala izv. prof. dr. sc. Mariji Gligori Udovič na pomoći, komentarima i sugestijama te uloženom vremenu prilikom izrade rada.*

*Puno hvala svim članovima Zavoda za kemiju materijala na svojoj pomoći i savjetima, a posebno što ste mi uljepšali dane u labosu.*

*Hvala djelatnicima Hrvatskih voda na ustupljenim podacima koji su mi bili potrebni za izradu mog diplomskog rada.*

*Hvala svim kolegama III. osnovne škole Varaždin na svakodnevnoj ogromnoj podršci i razumijevanju tijekom posljednjih mjeseci.*

*Hvala svim mojim prijateljima na svim ovim godinama, za svaki osmijeh, za svaku suzu, svako druženje i učenje, za sve uspone i padove i što ste mi svih ovih godina bili velika podrška.*

*Hvala mojim kumovima, Ines i Kikiju, što ste mi uvijek velika podrška kad mi je to potrebno.*

*I za kraj, najveće hvala mom bratu Sebastijanu, baki Anđeli, a posebno mami i tati, koji su mi omogućili bezbrižno studiranje, koji su mi uvijek bili najveći oslonac u životu i bez kojih ništa od ovoga ne bi postigla. Nadam se da ću vam se jednog dana moći odužiti za sve ovo!*

*...Hodaj, nebo strpljive voli...*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Vremenska raspodjela fitoplanktona u Vranskom jezeru na Cresu i Vranskom jezeru kod Biograda

Viktorija Mia Jepure

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Prisutnost zajednica fitoplanktona i rasprostranjenost fotosintetskih pigmenata utvrđivani su u dva prirodna krška jezera, u Vranskom jezeru kod Biograda i Vranskom jezeru na Cresu. Cilj ovog rada bio je usporediti metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s taksonomskom identifikacijom i kvantifikacijom korištenjem tradicionalne mikroskopije kako bi se odredile fitoplanktonske zajednice s dva različita lokaliteta u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine. Hipoteza ovog rada bila je da će u krškim jezerima u Hrvatskoj dominantne skupine fitoplanktona biti Diatomeae, Chrysophyceae i Dinoflagellata. Sastav fotosintetskih pigmenata može poslužiti za kemotaksonomsku procjenu fitoplanktonskih zajednica pa su iz tog razloga HPLC analizom izmjerene različite koncentracije pigmenata ( $\beta$ -karoten, lutein, fukoksantin) na temelju kojih su određene dominantne skupine u ova dva prirodna krška jezera (Diatomeae, Chlorophyta i Charophyceae). Usporedbom rezultata dobivenih metodom HPLC i standardnom mikroskopijom, u oba jezera dokazana je prisutnost skupina Diatomeae i Chlorophyta kao dominantnih skupina, dok se ostali rezultati nisu poklapali. Iako bi se u budućim istraživanjima trebali mjeriti još neki karakteristični dijagnostički pigmenti kako bi se dokazala prisutnost ostalih skupina utvrđenih mikroskopijom, u ovom istraživanju HPLC metoda se pokazala kao pouzdan i brz alat koji se, uz mikroskopiju, može koristiti za brza istraživanja slatkovodnih ekosustava.

(60 stranica, 21 slika, 7 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Ključne riječi:** HPLC, krška jezera, fotosintetski pigmenti, mikroskopija

**Mentor:** dr. sc. Sandi Orlić

**Komentor:** izv. prof. dr. sc. Marija Gligora Udovič

**Ocjenitelji:** 1. izv. prof. dr. sc. Marija Gligora Udovič

2. izv. prof. dr. sc. Mirela Sertić Perić

3. izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Zamjena: prof. dr. sc. Željka Soldin

**Rad prihvaćen:** 29. 06. 2023.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

## **Temporal distribution of phytoplankton in Vrana Lake at Cres and Vrana Lake near Biograd**

Viktorija Mia Jepure

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The presence of phytoplankton communities and distribution of photosynthetic pigments were determined in two natural karst lakes, Lake Vrana near Biograd and Lake Vrana on Cres. The aim of this work was to compare the results of high-performance liquid chromatography (HPLC method) with taxonomic identification and quantification using traditional microscopy to determine phytoplankton communities from two different localities in the period from April to September 2019. The hypothesis was that in karst lakes in Croatia the dominant phytoplankton groups will be Diatomeae, Chrysophyceae and Dinoflagellata. The composition of photosynthetic pigments can be used for the chemotaxonomic assessment of phytoplankton communities, and for this reason, different concentrations of pigments ( $\beta$ -carotene, lutein, fucoxanthin) were measured by HPLC. The dominant groups in these two natural karst lakes were Diatomeae, Chlorophyta and Charophyceae. By comparing the results obtained by the HPLC method and standard microscopy, the presence of Diatomeae and Chlorophyta groups as dominant groups was proven in both lakes, while the other results did not match. Although in future research some more characteristic diagnostic pigments should be measured to prove the presence of other groups determined by microscopy, in this research the HPLC method proved to be a reliable and fast tool that, together with microscopy, can be used for rapid research of freshwater ecosystems.

(60 pages, 21 figures, 7 tables, 85 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library.

**Keywords:** HPLC, karst lakes, photosynthetic pigments, microscopy

**Mentor:** Sandi Orlić, PhD

**Co-mentor:** Assoc. Prof. Marija Gligora Udovič, PhD

**Reviewers:** 1. Assoc. Prof. Marija Gligora Udovič, PhD  
2. Assoc. Prof. Mirela Sertić Perić, PhD  
3. Assoc. Prof. Draginja Mrvoš-Sermek, PhD  
Replacement: Prof. Željka Soldin, PhD

**Thesis accepted:** 29. 06. 2023.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Fitoplankton.....	1
1.2. Sastav fitoplanktonske zajednice kao bioindikator stanja ekosustava.....	3
1.3. Fotosintetski pigmenti .....	5
1.3.1. Klorofili.....	8
1.3.2. Karotenoidi.....	9
1.3.3. Fikobiliproteini.....	11
1.4. Apsorpcijski spektri fotosintetskih pigmenata .....	12
1.5. Metode određivanja fotosintetskih pigmenata u algama .....	13
1.5.1. Spektrofotometrija.....	13
1.5.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	13
1.5.2.1. Dijelovi i princip rada uređaja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.....	14
1.5.2.2. HPLC na reverznim fazama ili RP-HPLC:.....	15
1.6. Analiza fotosintetskih pigmenata HPLC metodom .....	15
1.7. Opis područja istraživanja .....	17
1.7.1. Vransko jezero kod Biograda.....	17
1.7.2. Vransko jezero na Cresu .....	18
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>20</b>
3.1. Uzorkovanje.....	20
3.2. Filtriranje .....	21
3.3. Ekstrakcija .....	21
3.4. Spektrofotometrija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	21
3.5. Obrada podataka .....	22
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>23</b>
4.1. Pigmenti detektirani metodom HPLC u Vranskom jezeru kod Biograda .....	23



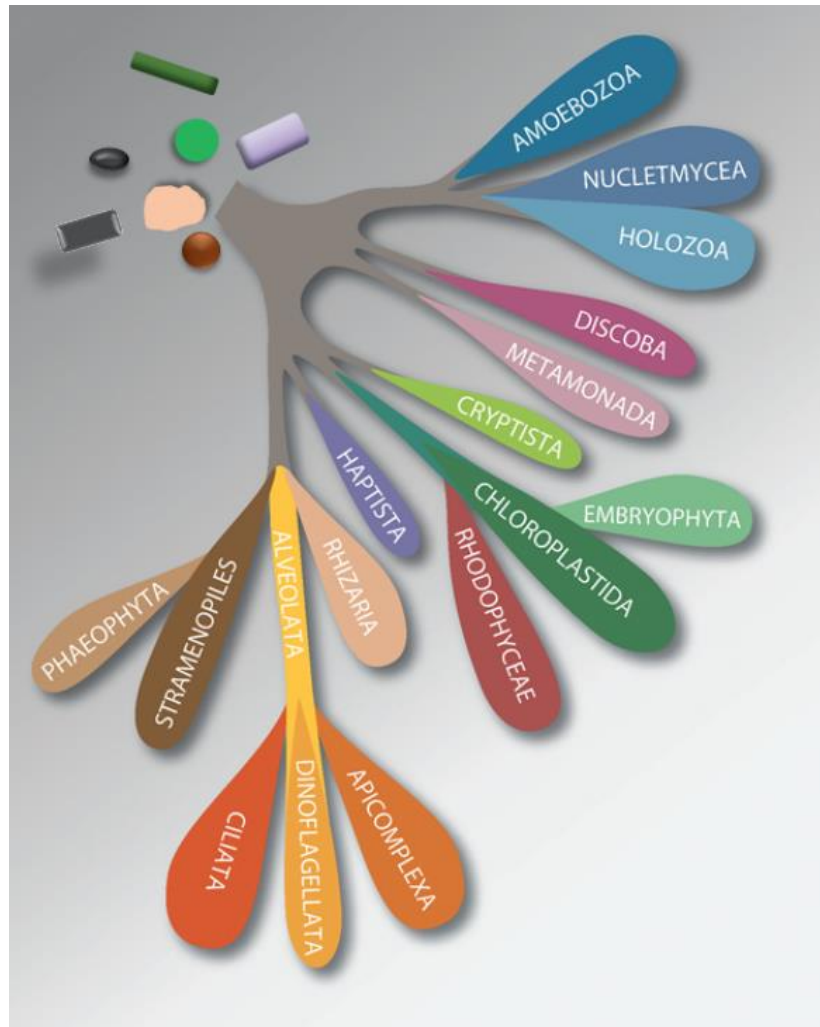
4.2. Pigmenti detektirani metodom HPLC u Vranskom jezeru na Cresu .....	26
4.3. Fitoplanktonska zajednica u Vranskom jezeru kod Biograda .....	28
4.4. Fitoplanktonska zajednica u Vranskom jezeru na Cresu .....	31
4.5. Odnos ukupne biomase fitoplanktona i koncentracije klorofila <i>a</i> .....	34
4.6. Odnos izmjerenih pigmenata s taksonomskim grupama fitoplanktona kojima pripadaju	40
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>46</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>51</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>52</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>60</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Fitoplankton

Fitoplankton čine fotosintetske, autotrofne i miksotrofne alge koje slobodno žive u stupcu vode (Viličić 2002, Graham i Wilcox 2009), a razvijaju se u svim tipovima vodenih ekosustava (Viličić 2003). Obitavaju u osvjetljenom ili eufotičkom sloju vodenog stupca gdje je dostupna dovoljna količina svjetlosti za fotosintezu (Popić 2011). Fitoplanktonski organizmi su primarni proizvođači i prva su karika hranidbenih lanaca, a njima se mogu hraniti drugi organizmi poput zooplanktona, manjih riba i nekih kitova (Bellinger i Sigeo 2010). Osim u hranidbenom lancu, zauzimaju također važnu ulogu i u biogeokemijskom ciklusu kruženja tvari (Kramer i Siegel 2019).

Prema starijoj taksonomiji, vrste koje pripadaju fitoplanktonu dijele se u dva carstva, Monera i Protoctista. Carstvu Monera u kontekstu fitoplanktona pripadaju prokariotski organizmi Cyanophyceae, a carstvu Protoctista sve ostale eukariotske skupine. Prema najnovijoj taksonomiji napravljenoj na osnovi molekularne filogenije (Slika 1) eukarioti tvore dvije domene, Amorphea i Diaphoretickes. Prema tome domenu Amorphea čine glavne podskupine: Opisthokonta, te Breviatea i Apusomonadida koje su formirane pod nazivom Obazoa. Opisthokonta obuhvaća Holozoa i Nucleomyces. Archaeplastida, Sar, Excavata te nekoliko drugih grupa zajedno čine monofiletsku skupinu unutar domene Diaphoretickes. Ove grupe uključuju različite skupine organizama kao što su: Cryptista, Chloroplastida, Emryiophyta, Rhodophyceae, Haptista, Rhizaria, Alveolata (Apicomplexa, Dinoflagellata, Ciliata). Stramenopiles i Phaeophyta čine domenu Diaphoretickes (Adl i sur. 2019).



**Slika 1.** Pregled raznolikosti protista među eukariotima. Preuzeto i prilagođeno prema Adl i sur. 2019.

Organizmi koji pripadaju u fitoplankton svrstavamo u monofiletske skupine Archaeplastida, SAR, Alveolata i Discoba koje se nalaze unutar domene Diaphoretickes (Adl i sur. 2019).

Fitoplankton je izrazito raznolik unutar pojedinih ekosustava (Cloern i Jassby 2010), a vrste između različitih fitoplanktonskih grupa razlikuju se u veličini, obliku, fotosintetskim pigmentima, evolucijskom i filogenetskom položaju te potrebom za hranjivim tvarima. S obzirom na razlike, fitoplankton obuhvaća širok raspon veličina i formi, kako jednostaničnih tako i višestaničnih, odnosno pojedinačnih i kolonijalnih oblika. Sama veličina stanica fitoplanktona ima važnu ulogu u fiziologiji fitoplanktona te veliko značenje za ekologiju i biogeokemijski ciklus vodenih ekosustava (Finkel i sur. 2010).

Prema veličini stanica, fitoplankton se može podijeliti u tri veličinske frakcije: mikrofitoplankton (20-200  $\mu\text{m}$ ), nanofitoplankton (2-20  $\mu\text{m}$ ) i pikofitoplankton (0,2-2  $\mu\text{m}$ ) (Sieburth i sur. 1978).

Fitoplanktonske zajednice slatkovodnih ekosustava najčešće čine alge iz skupina Cyanophyceae (cijanobakterije), Cryptophyceae (kriptofita), Diatomeae (dijatomeje), Dinoflagellata (svjetleći bičai), Euglenozoa (zeleni bičai) i Chlorophyta (zelene alge) (Henle i sur. 2006).

## **1.2. Sastav fitoplanktonske zajednice kao bioindikator stanja ekosustava**

Očuvanje ekološkog stanja vodenih ekosustava jedan je od globalnih ekoloških izazova. Sve veći ljudski utjecaji na kopno i more, zagađenja i promjene klime, mijenjaju ekološki integritet i biološku raznolikost rijeka, jezera i obalnih sustava (Sala i sur. 2000). Fitoplankton je važan biološki element za procjenu ekološkog stanja kvalitete vode, s obzirom da ima sposobnost brze reakcije na promjene u okolišu. Prema tome, analiza fitoplanktona može pružiti važne informacije o ekološkom stanju vodenog ekosustava. Promjene u sastavu, brojnosti ili biomasi fitoplanktona mogu ukazivati na različite ekološke promjene, kao što su onečišćenje vode, eutrofikacija ili klimatske promjene (Narasimha 2013). Praćenje fitoplanktona kao indikatora ekološkog stanja vode omogućuje bolje razumijevanje promjena u okolišu i pomaže u donošenju informiranih odluka o upravljanju vodenim ekosustavima (Giovanardi i sur. 2018).

Brojni čimbenici utječu na strukturu fitoplanktonske zajednice u slatkovodnim ekosustavima, a neki od tih čimbenika uključuju različite kemijske, fizikalne i biološke parametre. Jedan od ključnih čimbenika za fotosintezu fitoplanktona je intenzitet svjetlosti. Intenzitet svjetlosti utječe na sposobnost fitoplanktona da apsorbira energiju za rast i razvoj. Prekomjerna ili nedovoljna količina svjetlosti može utjecati na distribuciju fitoplanktona u vodenom stupcu. Zatim, vrlo važan čimbenik je i količina hranjivih tvari, a to su dušik i fosfor, elementi bitni za rast i razvoj fitoplanktona. Veća dostupnost hranjivih tvari potaknut će brži rast i razvoj fitoplanktona, dok će im nedostatak ograničiti. Temperatura vode ima utjecaj na regulaciju bioloških procesa fitoplanktona. Različite vrste fitoplanktona imaju različite preferencije prema optimalnim

temperaturnim vrijednostima za svoj rast, metabolizam i reprodukciju (Brown 1971, Ariyadey i sur. 2004, Graham i Wilcox 2009). Na kemijski sastav vode, također veliki utjecaj ima i geološka podloga, jer različiti tipovi geoloških podloga uključuju prisutnost različitih minerala i drugih elemenata u vodenom stupcu. S obzirom na čimbenike koji utječu na rast i razvoj, može se reći da fitoplankton ima značajnu korelaciju sa otopljenim kisikom i mineralnim tvari, alkalitetom, pH i CO<sub>2</sub> (Gasse i sur. 1983). Količina otopljenog kisika je vrlo bitna, jer fitoplankton koristi otopljeni kisik za proces disanja, ali i fotosintezom ga proizvodi kao nusprodukt. Promjene u alkalitetu i pH vrijednostima mogu utjecati na kemijsku ravnotežu vode, a time i na sposobnost fitoplanktona da obavljaju fotosintezu. Različite vrste imaju različite tolerancije na promjene alkaliteta i pH, što može utjecati i na relativnu dominaciju pojedinih vrsta. S obzirom da fitoplankton apsorbira CO<sub>2</sub> tijekom fotosinteze za proizvodnju organskih spojeva i proizvodnju kisika, njegova koncentracija utječe na sami proces fotosinteze i rast fitoplanktona. Svi ovi čimbenici međusobno djeluju i kompleksno utječu na strukturu fitoplanktonske zajednice u vodenim ekosustavima (Graham i Wilcox 2009).

Promjene raznolikosti i brojnosti fitoplanktonske zajednice ovisne o abiotičkim i biotičkim čimbenicima u određenom vremenu na određenom prostoru nazivaju se sezonska sukcesija fitoplanktona. Od abiotičkih čimbenika, kao što je već opisano na sezonsku sukcesiju utječu temperatura vode, dostupna količina svjetlosti, te količina hranjivih tvari u vodi, odnosno ukupna koncentracija dušika i fosfora (Reynolds 2006). Od najznačajnijih biotičkih čimbenika koji utječe na strukturu fitoplanktonske zajednice treba istaknuti interspecijske i intraspecijske odnose te sam utjecaj fitoplanktona. Tijekom godine, zajednica fitoplanktona prolazi kroz značajne promjene sastava i brojnosti. Jedan od opisa sukcesijskih promjena je matematički PEG model (*Plankton Ecology Group*) koji se koristi za proučavanje i simulaciju dinamike fitoplanktonskih zajednica u slatkovodnim i morskim ekosustavima. PEG-model opisuje interakcije između različitih vrsta fitoplanktona, zooplanktona i drugih organizama u vodenom okolišu. Model uzima u obzir različite faktore poput svjetlosti, temperature, hranjivih tvari i konkurencije za resurse kako bi simulirao rast, populacijsku dinamiku i interakcije unutar fitoplanktonskih zajednica. Također, pruža okvir za razumijevanje dinamike fitoplanktonskih zajednica i promjena u biomasi fitoplanktona tijekom godišnjih doba. Razumijevanje ovih ciklusa ključno je za procjenu ekološkog stanja slatkovodnih ekosustava i njihovo upravljanje. Prema PEG-modelu krajem zimskog razdoblja zbog povećanog dotoka hranjivih tvari i veće količine svjetlosti dolazi do rasta i razvoja fitoplanktona. Tijekom

dominacije herbivornog zooplanktona dolazi do opadanja populacije algi malih dimenzija („grazing“), a kada herbivorni zooplankton prekorači reprodukciju i brojnost fitoplanktona, dolazi do naglog smanjenja biomase fitoplanktona. Ovo se često događa tijekom proljeća i tu fazu nazivamo „faza bistre vode“. Tijekom ljetnih mjeseci dolazi do povećane aktivnosti riba i smanjenja populacije zooplanktona. Tijekom jeseni dolazi do smanjenja biomase fitoplanktona zbog nižih temperatura vode i manje količine svjetlosti, dok tijekom zimskih mjeseci dolazi do recikliranja hranjivih tvari te njihove ponovne akumulacije, a to stvara povoljne uvjete za rast i razvoj fitoplanktona u sljedećem ciklusu (Sommer 1989). Također, antropogeni utjecaj, može uzrokovati varijacije u hidrologiji, fizikalnim i kemijskim svojstvima vode što može dovesti do promjena u sezonskoj dinamici fitoplanktonske zajednice. Pretjerani rast i akumulacija fitoplanktona može ponekad i loše utjecati na bioraznolikost i funkciju vodenih ekosustava te dovesti do njegova narušavanja (Abonyi i sur. 2018).

### **1.3. Fotosintetski pigmenti**

Podjela algi može se temeljiti na sastavu pigmenata koje alge imaju u svojim stanicama (Tablica 1), a kao posljedica različitog sastava i omjera u količini pigmenata javlja se velika raznolikost u obojanosti kod algi (Koletić 2011). Doprinos svake skupine algi odražava se u njezinim tzv. pigmentnim potpisima. Fotosintetski pigmenti su molekule koje imaju važnu ulogu u fotosintezi, procesu u kojem se uz pomoć sunčeve energije sintetiziraju organski spojevi iz anorganskih. Uloga fotosintetskih pigmenata u procesu fotosinteze je apsorpcija sunčeve svjetlosti određenih valnih duljina i prijenos energije na druge molekule. Svi aktivni pigmenti fotosinteze nalaze se u tilakoidnim membranama kloroplasta, vezani uz proteinske komplekse-fotosustave. Pigmenti su organizirani u „kompleks antene“ koje apsorbiraju svjetlost te prenose energiju do molekule klorofila *a* u reakcijskom središtu u kojem se događa pretvorba svjetlosne energije u kemijsku (Taiz i Zeiger 2010). Osim što su odgovorni za hvatanje sunčeve energije koja je potrebna za proces fotosinteze, također imaju važnu ulogu u fotozaštitnim procesima te pokazuju antioksidativno djelovanje, pomažući stanici da se obrani od štetnih učinaka svjetlosti i oksidativnog stresa.

Fotosintetski pigmenti su obično obojani kompleksni organski spojevi čije se optičke osobine zasnivaju na kemijskoj strukturi njihovih molekula. Apsorpcija vidljivog dijela spektra, a samim time i boja pigmenata, ovisi o prisustvu sustava konjugiranih dvostrukih veza u njihovim molekulama:  $-C=C-$ ,  $-C=N-$ ,  $-N=N-$ ,  $-N=O-$ ,  $-C=S-$ . Fotosintetski pigmenti su prisutni u svim fotosintetskim algama omogućavajući fitoplanktonu da se odvoji od ostalih komponenata mikrobne zajednice. Iako se većina bioloških pigmenata može klasificirati u ne više od pet ili šest većih strukturnih grupa, tri su osnovne grupe pigmenata koje mogu „uhvatiti“ energiju koja je potrebna za reakciju fotosinteze: klorofili, karotenoidi i fikobiliproteini. Oni zajedno omogućuju fitoplanktonu da apsorbira različite dijelove spektra svjetlosti i efikasno koristi energiju za fotosintezu. Kombinacija ovih pigmenata pruža raznolikost u obojanosti fitoplanktona, od zelene do crvene, narančaste i žute boje, ovisno o njihovom sastavu i omjeru. Klorofili su najznačajniji i najrasprostranjeniji fotosintetski pigmenti. Klorofil *a* je zajednički pigment svih algi i biljaka te ima ključnu ulogu u pretvaranju svjetlosne energije u kemijsku energiju tijekom fotosinteze. Karotenoidi su druga grupa pigmenata i daju crvene, narančaste i žute boje mnogim algama, te djeluju kao dodatni fotosintetski pigmenti koji apsorbiraju svjetlost u dijelu spektra koji nije pokriven klorofilom. Fikobiliproteini su specifični pigmenti koji se nalaze kod cijanobakterija i crvenih algi. Oni apsorbiraju svjetlost u plavom i zelenom dijelu spektra (Viličić 2002).

**Tablica 1.** Sastav glavnih fotosintetskih pigmenata (X) kod algi (prilagođeno prema Adl i sur. 2019).

	Cyanophyceae	Cryptophyceae	Glaucophyta	Rhodophyceae	Chlorophyta	Chrysophyceae	Raphidophyceae	Xantophyceae	Diatomeae	Dinoflagellata	Euglenozoa	Charophyceae
Klorofil <i>a</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Klorofil <i>b</i>			X		X						X	X
Klorofil <i>c</i>						X			X			
Alofikocijanin	X											
Fikocijanin	X	X	X	X			X					
Fikoeritrin	X	X	X	X		X						
$\alpha$ -karoten	X	X			X							
$\beta$ -karoten	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Zeaksantin	X	X					X				X	
Neoksantin					X						X	X
Nostoksantin	X											
Diadinoksantin						X			X	X		
Peridinin										X		
Aloksantin		X										
Fukoksantin						X		X	X	X		
Lutein				X	X	X						X
Siphonoksantin					X						X	
Vaucheriaksantin				X				X				
Violaksantin	X											X



Klorofili



Fikobiliproteini



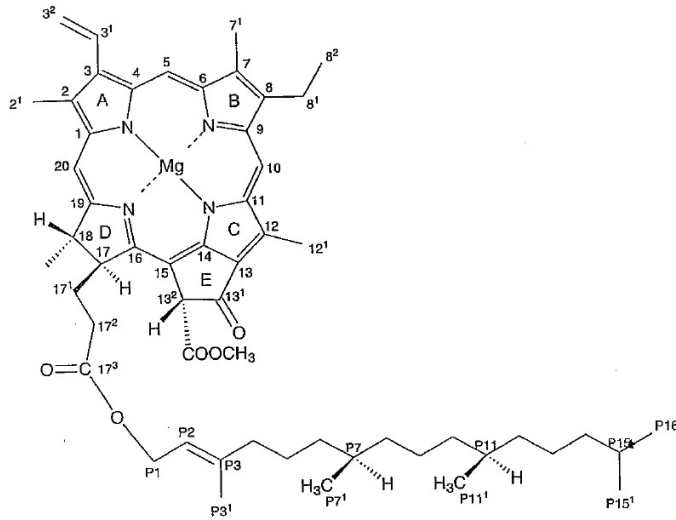
Karotenoidi



### 1.3.1. Klorofili

Fitoplankton sadrži jedan ili više tipova klorofila kao dio fotosustava u njihovim kloroplastima. Pripadaju skupini spojeva koji se nazivaju tetrapiroli (Willows 2004). Osnovna struktura klorofila je porfirinski sustav koji čine četiri pirolska prstena međusobno povezana metilnim skupinama u prstenasti sustav. Prstenasta struktura sadrži labavo vezane elektrone i to je dio molekule odgovoran za prijenos elektrona i redoks reakcije. U središtu porfirinskog prstena nalazi se atom magnezija koji je koordiniran sa četiri atoma dušika pirolskih prstena (A-D) (Pevalek-Kozlina 2003). Za pirolski prsten označen slovom D (Slika 2) vezan je alkohol fitol-terpenoid esterskom vezom. Fitol-terpenoid se sastoji od četiri izoprenske jedinice što ga čini vrlo hidrofobnim i upravo je on odgovoran za topljivost kloroplasta u lipidima. Tim repom se klorofil pričvršćuje za proteine u membrani. Za razliku od fitolnog repa, porfirinska jezgra je hidrofilna.

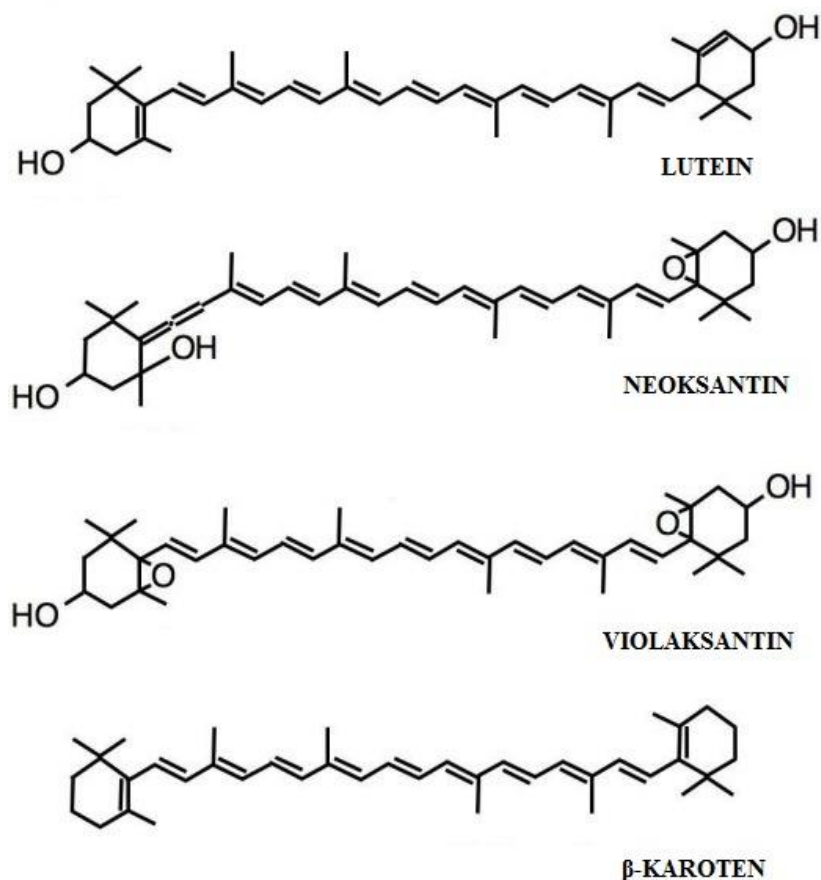
S obzirom na strukturu, postoji nekoliko različitih vrsta klorofila – klorofil *a*, *b*, *c* i *d* te bakterioklorofili koji su nađeni u određenim vrstama bakterija. Pojedini klorofili međusobno se razlikuju po ostalim supstituentima: klorofil *a* na drugom pirolnom prstenu ima vezanu metilnu skupinu, a klorofil *b* aldehidnu skupinu. Molekulska formula klorofila *a* je  $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$ , dok je molekulska formula klorofila *b*  $C_{55}H_{72}N_4O_6Mg$  kojega sadrže sve biljke te alge koje pripadaju skupinama Chlorophyta (zelene alge) i Euglenozoa (zeleni bičaši). Klorofil *a* je plavozeleni pigment, dok je klorofil *b* žutozelene boje i pruža dodatnu apsorpciju svjetlosti u dijelovima spektra koji se ne apsorbira tako učinkovito klorofilom *a* (Pevalek-Kozlina 2003). Primarni i najznačajniji fotosintetski pigment je klorofil *a* jer se nalazi u reakcijskom središtu fotosistema i omogućuje pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku, dok sve ostale klorofile i druge fotosintetske pigmente nazivamo sekundarnima zbog pomoćne i zaštitne uloge (Taiz i Zeiger 2010).



**Slika 2.** Struktura klorofila *a*. Preuzeto i prilagođeno prema Wright i Jeffrey 2006.

### 1.3.2. Karotenoidi

Karotenoidi pripadaju skupini terpenoida koji su nastali spajanjem jednostavnih izoprenskih jedinica (Slika 3). Imaju sposobnost apsorbirati svjetlost žute i zelene valne duljine (420-550 nm) te su obojani žuto, narančasto ili crveno zbog brojnih konjugiranih dvostrukih veza. Njihova struktura se temelji na tetraterpenu, spoju s 40 ugljikovih atoma, koji je sastavljen od osam izoprenskih jedinica od 5C atoma, s molekulskom formulom  $C_{40}H_{56}$  (Britton 1983).



**Slika 3.** Strukture najvažnijih karotenoida. Preuzeto i prilagođeno prema Diretti i sur. 2006.

Karotenoidi se nalaze u tilakoidnim membranama kloroplasta, gdje apsorbiraju fotone svjetlosti i prenose energiju do klorofila *a* u reakcijskom središtu fotosinteze. Oni djeluju kao pomoćni fotosintetski pigmenti, podržavajući proces apsorpcije svjetlosti i prenošenje energije na klorofil. Također, imaju važnu ulogu u zaštiti klorofila od fotooksidacije, te djeluju kao antioksidansi koji štite stanice od oksidativnog stresa smanjujući oštećenja fotosintetskog aparata. Na taj način, karotenoidi pomažu održati stabilnost i funkcionalnost fotosinteze te pridonose održavanju optimalne stope fotosintetske aktivnosti (Pevalek-Kozlina 2003).

Razlikujemo dvije skupine: karotene koji su čisti ugljikovodici i ksantofile koji pored vodika i ugljika, sadrže i kisik (Lepeduš i Cesar 2010). Karoteni koji se nalaze u višim biljkama i zelenim algama su  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten. Od ksantofila poput luteina, violaksantina i neoksantina prisutni su u

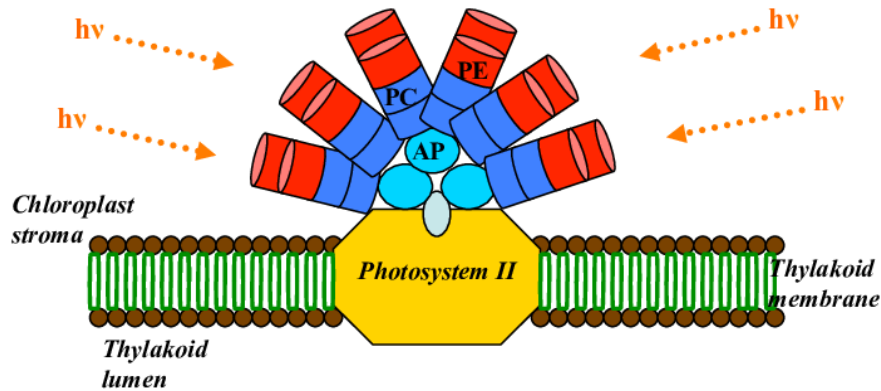
kloroplastima u većoj količini zajedno uz  $\beta$ -karoten, za razliku od zeaksantina, anteraksantina i luteinoksida koji su prisutni u manjim količinama (Lichtenthaler 1987).

### **1.3.3. Fikobiliproteini**

Kod cijanobakterija razlikujemo i pomoćne antenalne komplekse koji se nazivaju fikobilisomi. Glavna uloga fikobilisoma je apsorpcija i transdukcija svjetlosti, a smatra se da mogu poslužiti kao izvor hranjivih tvari u slučaju ako dođe do nedostatka dušika, ugljika ili sumpora (Parmar i sur. 2011). Fikobilisomi se sastoje od pigmentiranih proteinskih podjedinica koji se nazivaju fikobiliproteini (Slika 4).

Cijanobakterije uglavnom sadrže plave fikobiliproteine-fikocijanini (PC) i alofikocijanini (AP) dok određene vrste sadrže fikoeritrine (PE) i fikoeritrocijanine koji stanicama cijanobakterija daju karakterističnu crvenu boju (Grossman i sur. 1993).

Za cijanobakterije je karakteristično svojstvo koje se naziva komplementarna kromatska adaptacija. To je pojava kada alge stvaraju pretežno fotosintetske pigmente kako bi maksimalno iskoristili raspoloživu svjetlost u okolišu. Kada su izložene svjetlu određene valne duljine, cijanobakterije će stvarati pretežno fotosintetske pigmente koji najbolje apsorbiraju tu vrstu svjetlosti. Na taj način, cijanobakterije usklađuju svoj fotosintetski sustav s intenzitetom i spektrom svjetlosti u okolišu.



**Slika 4.** Struktura fikobilisoma u cijanobakterija. Preuzeto i prilagođeno prema Vernès i sur. 2015.

#### 1.4. Apsorpcijski spektri fotosintetskih pigmenata

Svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama (Britton 1983). Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra pa je tako apsorpcijski maksimum za klorofil *a* u plavom dijelu spektra na otprilike 430 nm, a u crvenom dijelu na 660 nm. Što se tiče klorofila *b*, pozicija apsorpcijskih maksimuma je između dvaju maksimuma klorofila *a* (na otprilike 450 i 640 nm). Precizne vrijednosti valnih duljina za dva glavna apsorpcijska maksimuma oba klorofila ovise o polarnosti otapala u kojem se ti pigmenti nalaze. Naime, s povećanjem polarnosti i/ili u prisutnosti vode, ove vrijednosti se pomiču prema duljim valnim duljinama (Lichtenthaler 1987).

Fotosintetski aktivni karotenoidi apsorbiraju svjetlost u plavo-zelenom području spektra (400-550 nm) (Viličić 2002). Apsorpcijski spektar pokazuje tri karakteristična apsorpcijska maksimuma (violaksantin i neoksantin) u plavom dijelu spektra. Apsorpcijski maksimumi, za karotene koji nemaju kisikove atome, pomaknuti su prema većim valnim duljinama, dok kod ksantofila kod kojih su prisutne hidroksilne skupine, apsorpcijski maksimumi su pomaknuti prema kraćim valnim duljinama. Položaj apsorpcijskih maksimuma, kao i kod klorofila, ovisi o tipu otapala i udjelu vode (Lichtenthaler 1987).

Fikobiliproteini apsorbiraju zeleni dio spektra u rasponu od 450 do 670 nm što predstavlja dio spektra koji ne može apsorbirati klorofil *a*. S obzirom da svaki protein sadrži vlastite kromofore, svaki fikobiliprotein ima i svoj apsorpcijski spektar. Ova sposobnost fikobiliproteina da apsorbiraju svjetlost u zelenom dijelu spektra omogućuje cijanobakterijama da iskoriste svjetlost koju ne mogu apsorbirati klorofili, dodatno povećavajući ukupnu apsorpcijsku sposobnost stanica i poboljšavajući učinkovitost fotosinteze (Grossman i sur. 1993).

## **1.5. Metode određivanja fotosintetskih pigmenata u algama**

### **1.5.1. Spektrofotometrija**

U istraživanjima fotosintetskih pigmenata, veliku važnost ima svojstvo apsorpcije svjetlosti. Spektrofotometrija je metoda kojom se intenzitet apsorpcije zračenja ispitivane molekule za bilo koju valnu duljinu izražava kao apsorbancija koja je ovisna o koncentraciji molekule u otopini. Pomoću Beer-Lambertovog zakona može se lako izračunati koncentracija neke molekule u otopini ako se uzme u obzir put koji prijeđe svjetlost, molarni apsorpcijski koeficijent ispitivane molekule te izmjerenu apsorbanciju (Skoog i sur. 1999).

### **1.5.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

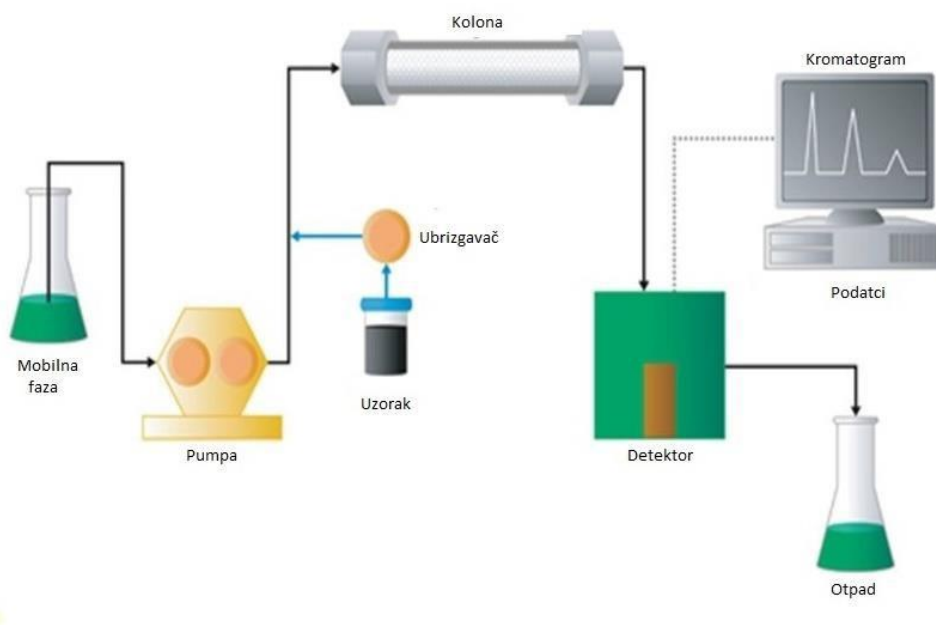
Kromatografija je metoda razdvajanja smjese na temelju različite raspodjele između stacionarne i mobilne faze. Postoji više različitih vrsta kromatografija koje ovise o fazi i načinu razdvajanja koje se izvodi. Primjerice, ako je stacionarna faza kruta, a mobilna faza je tekuća, onda se radi o tekućinskoj kromatografiji. Ako je stacionarna faza kruta, a mobilna faza je plinska, onda se radi o plinskoj kromatografiji (Džambić 2019).

Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. HPLC ili *High Performance Liquid Chromatography*) se najčešće koristi kako bi se odredili polarni spojevi u različitim industrijama, a ima važnu ulogu i za karakterizaciju fitoplanktona u terenskim populacijama (Wright i Jeffrey 2006). HPLC je zapravo moderniji tip tekućinske kromatografije (eng. LC ili *Liquid Chromatography*) u kojoj se koristi kolona s malim česticama (stacionarna faza) kroz koju

se pod visokim tlakom upumpava mobilna faza (Bogner 2020). Glavna razlika između njih je što u LC otapalo putuje silom gravitacije, a kod HPLC pod visokim tlakom koji stvara pumpa kako bi se prevladao pad tlaka u stupcu što ujedno smanjuje vrijeme razdvajanja (Džambić 2019).

### 1.5.2.1. Dijelovi i princip rada uređaja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Glavni dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti su: spremnik za mobilnu fazu, pumpa, sustav za unošenje uzoraka, kolona, detektor, spremnik za otpad te uređaj za analitički zapis (Slika 5).



**Slika 5.** Shematski prikaz uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti. Preuzeto i prilagođeno prema Džambić 2019.

U spremniku za mobilnu fazu nalazi se otapalo. Od otapala se najčešće koriste voda, metanol ili neka druga organska otapala.

Pumpa generira protok mobilne faze pod visokim tlakom što omogućuje prolazak otapala. Korištenjem visokog tlaka poboljšava se rezolucija kromatograma. Otapalo prolazi kroz električni ulazni ventil koji je sinkroniziran s velikim klipom kako bi se spriječilo stvaranje zračnih

mjehurića. Sustav za unošenje uzoraka injektira uzorak koji želimo analizirati u mobilnu fazu koja taj uzorak odnosi na kolonu.

Kolona je punjena stacionarnom fazom. Stacionarnu fazu čine sitne čestice (veličine 5-15  $\mu\text{m}$ ) čime se povećava površina za interakciju uzorka iz stacionarne faze. Zbog tih specifičnih fizičkih i kemijskih interakcija dolazi do zadržavanja komponenata smjese, a samo vrijeme zadržavanja komponenti smjese će biti različito i ovisiti o prirodi tvari koja se analizira. Sama brzina eluiranja i razdvajanja molekula iz uzorka koji se analizira ovisi o interakciji mobilne faze i samog uzorka sa stacionarnom fazom. Vrijeme koje je potrebno da se tvar eluira naziva se retencijsko vrijeme te je ono specifično za određenu tvar. Upravo iz tog razloga, komponente sa kolone se eluiraju različitom brzinom.

Detektor je spojen na računalni sustav na kojemu se obrađuju podaci i koji na temelju električnog signala prikazuje grafički zapis na ekranu koji se naziva kromatogram (Džambić 2019).

#### **1.5.2.2. HPLC na reverznim fazama ili RP-HPLC:**

RP-HPLC (eng. *Reverse phase* HPLC) je oblik tekućinske kromatografije u kojoj je stacionarna faza nepolarna, dok je mobilna faza polarna. Stacionarna faza se sastoji od čestica silikagela koje na površini, preko silanoilnih skupina (Si-O-H) imaju vezane ugljikovodične lance od 18 C atoma, dok je mobilna faza smjesa organskih otapala i vode. Za analizu fotosintetskih pigmenta je bolji upravo ovaj tip kromatografije zbog njihove prirode odnosno strukture. Pigmenti koji su manje polarni će se pri analizi dulje zadržati na koloni za razliku od polarnijih koji izlaze prvi i prema tome imaju kraće retencijsko vrijeme (Skoog i sur. 1999).

### **1.6. Analiza fotosintetskih pigmenta HPLC metodom**

Analiza fotosintetskih pigmenta postala je integralna komponenta u ekološkim i fiziološkim istraživanjima s obzirom da se sastav i karakteristike fotosintetskih pigmenta mogu koristiti za kemotaksonomsku procjenu zajednica algi. Koncentracija klorofila *a* koristila se, a koristi se još uvijek, kako bi se procijenila biomasa zajednica algi, no naknadni razvoj koncepta dijagnostičkih



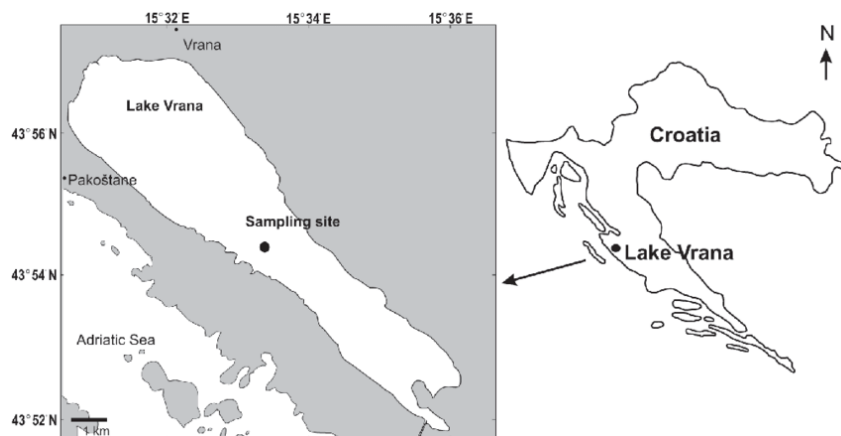
pigmenata omogućio je detekciju i procjenu određenih taksonomskih grupa i vrsta (Schlüter i sur. 2000). Klorofili i karotenoidi su široko rasprostranjeni u okolišu. Klorofili te  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten su uglavnom sveprisutni među algama, za razliku od ostalih karotenoida, uglavnom ksantofila, koji su karakteristični za određene razrede algi (primjerice, aloksantin i  $\alpha$ -karoten za Cryptophyceae (kriptofita), fukoksantin za Diatomeae (dijatomeje), Chrysophyceae (krizofita) i Prymnesiophyceae (haptofiti), lutein za Charophyceae (harofiti) i Chlorophyta (zelene alge) te peridinin za Dinoflagellata (svjetleće bičaste)). No, separacija fotosintetskih pigmenata u prirodnim uzorcima fitoplanktona i mikrofitobentičkih zajednica, bila je izrazito izazovna (Brotas i Plante Cuny 1998). Složene smjese vrsta algi sadrže pigmente različitih molekularnih struktura (od polarnih klorofila do nepolarnih karotenoida) koji se teško mogu razdvojiti s obzirom da se neki pigmentni parovi razlikuju samo u prisutnosti i poziciji dvostruke veze (Zapata i sur. 2000). Kvalitativna i kvantitativna analiza mikroalgi pomoću optičke mikroskopije se uobičajeno koristila za procjenu biomase ili bioraznolikosti (Aktan i sur. 2005). Unatoč tome, mikroskopska analiza oduzima mnogo vremena te zahtjeva taksonomsko iskustvo kako bi se identificirali organizmi na razini roda ili vrste (Naik i sur. 2011). Nadalje, mikroalge piko- i nano- veličine, uključujući zelene alge, cijanobakterije i flagelate koji općenito dominiraju u estuarijima i slatkim vodama, je vrlo teško identificirati korištenjem mikroskopije, što obično vodi do pogrešaka ili propusta u identifikaciji vrsta (Jeffrey i sur. 1997). Za brojanje mikroalgi, fotosintetski pigmenti fitoplanktona piko- i nano- veličine mogu se bez problema detektirati tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (metodom HPLC), koja može pružiti podatke komplementarnima onima iz izravnog brojanja stanica (Wright i Jeffrey 2006). Od predstavljanja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti 1980-tih godina, postala je široko primjenjivana za separaciju i identifikaciju klorofila i karotenoida te njihovih derivata (Zapata i sur. 2000). Primjenom ove suvremene kromatografske tehnike mogu se utvrditi specifični pigmenti za pojedine taksonomske kategorije fitoplanktona te je na taj način analiza pigmenata kao dijagnostičkih markera temelj suvremene taksonomije s obzirom da se sastav fitoplanktona može odrediti na osnovi sastava pigmenata (Viličić 2002). Ovom tehnikom se mjere koncentracije pigmenata fitoplanktona, od kojih su neki korisni kemotaksonomski markeri za fitoplanktonske skupine (Zapata i sur. 2000).

## 1.7. Opis područja istraživanja

Vransko jezero kod Biograda i Vransko jezero na Cresu su jedna od poznatijih krških, prirodnih jezera u Hrvatskoj. Ova jezera su kao i ostala jezera nastala tijekom glacioeustaičkih procesa nakon posljednjeg ledenog doba prije 10000 do 12000 godina zbog dizanja razine mora. Jezera su ujedno i kriptodepresije, odnosno udubljena čije je dno ispod, a površina iznad razine mora. Najveća kriptodepresija u Hrvatskoj je upravo Vransko jezero na Cresu (Damijanjević 2022). Oba jezera se svrstavaju u slatkovodni mediteranski ekosustav. Zbog promjena saliniteta može doći do narušavanja osnovnih uvjeta života, odnosno, kada dođe do promjena saliniteta, neke vrste koje su prilagođene specifičnim uvjetima slatkovodnih ekosustava mogu imati poteškoće u prilagodbi na nove uvjete. To može dovesti do smanjenja broja ili čak izumiranja takvih vrsta, što rezultira gubitkom biološke raznolikosti. Također, jedan od glavnih učinaka promjene saliniteta je stvaranje viška organske tvari u jezerskom sustavu, što uzrokuje veći stupanj trofije jezera, a time može doći i do ubrzavanja ekoloških sukcesija i daljnje degradacije jezerskog sustava (Knežević 2020). Oba jezera su oligotrofna, odnosno karakterizira ih niski stupanj produktivnosti te su siromašna hranjivim tvarima. Samo najsjeverniji dio Vranskog jezera kod Biograda pripada mezotrofnom tipu jezera zato što ima zabilježene veće koncentracije hranjivih tvari zbog korištenja gnojiva na okolnim poljoprivrednim zemljištima (Suske 2010).

### 1.7.1. Vransko jezero kod Biograda

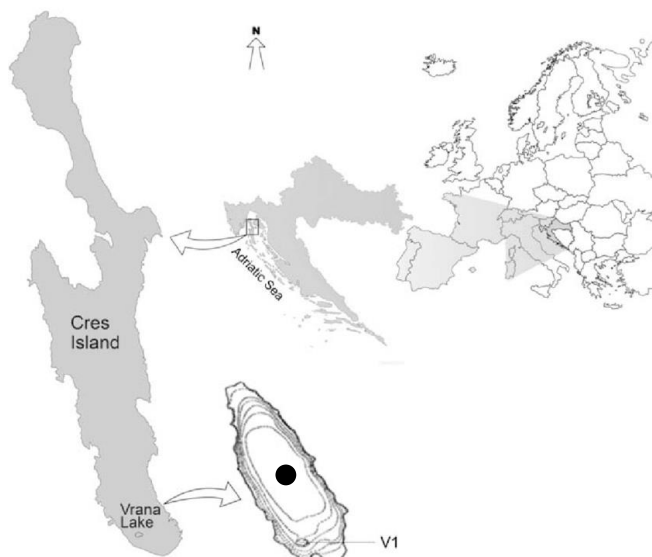
Vransko jezero kraj Biograda je najveće hrvatsko plitko prirodno jezero i jedno od najvećih močvarnih područja u mediteranskoj Hrvatskoj. Zahvaljujući svojim prirodnim vrijednostima 1999. godine je proglašeno parkom prirode. Ovo jezero se nalazi u sjevernoj dalmatinskoj regiji, u zaleđu Pakošтана, a cjelokupna vodena površina administrativno pripada Zadarskoj županiji. Jezero je potopljena aluvijalna dolina, predstavlja najnižu točku Ravnih kotara, dugačko 13,6 km sa širinom 1,4 do 3,4 km (Suske 2010). Ukupna površina jezera je 30,16 km<sup>2</sup>, dok dubina varira između 2 i 5 metara (Slika 6).



**Slika 6.** Položaj mjesta uzorkovanja u Vranskom jezeru kod Biograda. Preuzeto i prilagođeno prema Bosak i sur. 2015.

### 1.7.2. Vransko jezero na Cresu

Vransko jezero na Cresu se nalazi u središnjem dijelu istoimenog otoka te ima izuzetnu važnost za otoke Cres i Lošinj te njihovo stanovništvo zbog opskrbljivanja pitkom vodom. Dužina ovog jezera jest 5,5 km, a širina 1,5 km (Stražićić 1985). Ukupna površina jezera je 5,8 km<sup>2</sup>, a najveća dubina iznosi 84 metara (Slika 7).



**Slika 7.** Položaj mjesta uzorkovanja u Vranskom jezeru na otoku Cresu. Preuzeto i prilagođeno prema Primc i sur. 2018.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada bio je prema sastavu fotosintetskih pigmenata odrediti najzastupljenije fitoplanktonske skupine u sukcesivnom razdoblju od 6 mjeseci (od travnja do rujna 2019. godine) u dva prirodna krška jezera (Vranskom jezeru kod Biograda i Vranskom jezeru na Cresu). Hipoteza ovog istraživanja je da će u krškim jezerima u Hrvatskoj dominantne fitoplanktonske skupine biti Diatomeae (Mediophyceae i Bacillariophyceae), Chrysophyceae i Dinoflagellata.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. HPLC metodom odrediti koncentracije fotosintetskih pigmenata u dva prirodna krška jezera (Vranskom jezeru kod Biograda i Vranskom jezeru na Cresu) u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine.
2. Prema sastavu fotosintetskih pigmenata odrediti najzastupljenije fitoplanktonske skupine u sukcesivnom razdoblju od 6 mjeseci (od travnja do rujna 2019. godine).
3. Usporediti rezultate najzastupljenijih fitoplanktonskih skupina dobivenih analizom fotosintetskih pigmenata i standardnom metodom morfološke analize zajednice fitoplanktona.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Uzorkovanje

Uzorci su od strane djelatnika Instituta Ruđer Bošković prikupljeni u periodu od travnja do rujna 2019. godine u sklopu redovnog monitoringa Hrvatskih voda. Istraživani vertikalni profili jezera uzorkovani su iznad najdubljeg dijela svakog pojedinog jezera, Vranskog jezera kod Biograda i Vranskog jezera na Cresu. Kompozitni uzorci prikupljeni su prema Metodologiji uzorkovanja, laboratorijskih analiza i određivanje omjera ekološke kakvoće bioloških elemenata kakvoće (NN 73/13, 151/14, 78/15, 61/16 i 80/18) za potrebe morfološke analize. Usporedno s uzorcima za analize pigmenata, prikupljeni su i direktni uzorci fitoplanktona koji su obrađeni Utermöhl metodom od strane djelatnika Instituta za vode Josip Juraj Strossmayer. Navedenom metodom određena je brojnost stanica vrsta u fitoplanktonu u jezerima. Dobivena ukupna biomasa fitoplanktona izračunata je od strane djelatnika Instituta za vode Josip Juraj Strossmayer na način da je svakoj vrsti fitoplanktona pridruženo najbližije geometrijsko tijelo. Pri određivanju dimenzije vrste barem 20 jedinki iste vrste izmjereno je kako bi se osiguralo da standardna pogreška bude manja od <math><10\%</math>. Na temelju računanja volumena pripadajućih geometrijskih tijela algi i cijanobakterija dobiven je biovolumen. Biovolumen se izražava u jedinicama  $\text{mm}^3/\text{L}$ . S pretpostavkom da je gustoća algi i cijanobakterija jednaka gustoći vode ( $1\text{g}/\text{cm}^3$ ), biomasa se iz biovolumena preračunala u  $\text{mg}/\text{L}$ . Ukupna biomasa stanica pojedine svojte dobivena je tako da se izračunata biomasa stanice pomnožila s ukupnim brojem stanica. Ukupna biomasa fitoplanktona jednog uzorka zbroj je svih biomasa utvrđenih svojti i izražena je u  $\text{mg}/\text{L}$ .

Paralelno s uzorkovanjem kompozitnih uzoraka je provedeno uzorkovanje za analize pigmenata od strane djelatnika Instituta Ruđer Bošković u sukcesivnom razdoblju u trajanju od 6 mjeseci, jednom mjesečno od travnja do rujna 2019. godine.

## **3.2. Filtriranje**

Uzorci vode (volumena od 0,3 do 5 litara, ovisno o jezeru) filtrirani su GF/F (Whatam) filterima unutar 30 minuta korištenja vakuumske pumpe. Nakon filtriranja, višak vode uklonjen je papirnatim ručnikom, a filteri su odmah stavljeni na suhi led te pohranjeni u zamrzivaču na -80°C.

## **3.3. Ekstrakcija**

Smrznute filtere sam izrezala na manje komade te ekstrahirala u 5 mL mješavine acetona i metanola u omjeru 7:2 korištenjem Erlenmeyerove tikvice. Nakon toga sam uzorke sonificirala u hladnoj vodenoj kupelji u trajanju od 3 minute. Ekstrakt sam nakon toga centrifugirala u centrifugi (Thermo Scientific SL16R) na 12000 rpm u trajanju od 3 minute kako bi se uklonili ostaci filter papira, a 1 mL supernatanta sam pipetirala u tamne kivete.

## **3.4. Spektrofotometrija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

Koncentracije klorofila *a* izmjerili su djelatnici Hrvatskih voda pomoću metode spektrofotometrije, dok sam ostale pigmente analizirala pomoću visokoprotodne tekućinske kromatografije na Institutu Ruđer Bošković. Kromatografija je provedena na Vanquish Core (Thermo Scientific) uređaju, a uzorci su injektirani na kolonu pomoću uređaja za automatsko unošenje uzoraka (autosampler) koji je držao temperaturu uzoraka na +4°C. Sva otapala korištena za HPLC su bila visoke čistoće. Pomoću crpke se postiže određeni tlak te omogućava opskrblijevanje kolone otapalima koja su, prije dolaska na kolonu, prošla kroz sustav za otplinjavanje.

Pigmenti su odvojeni pomoću modificirane metode predložene od Van Heukelem i sur. 2001 na ugrijanoj (40°C) Phenomenex Luna (3µm C8 (2) 100 Å) koloni koristeći binarni sustav otapala. Mobilna faza sastojala se od dvije komponente - otapala A i otapala B. Otapalo A je bila smjesa otopina 80% - tneg metanola i 28 mM amonijeva acetata, dok je otapalo B bio metanol. Pigmenti

su eluirani korištenjem linearnog gradijenta udjela otapala A i B: u početku je bilo 100% otapala A, a na kraju elucije 100% otapala B. Gradijentna elucija trajala je 20 minuta te je zatim uslijedila izokratna elucija s otapalom B (100%) u trajanju od 25 minuta. Nakon toga je slijedila 27 minuta elucija s linearnim gradijentom od 100% B do 100% A i na kraju izokratna elucija sa 100% A sljedećih 30 minuta radi reekvilibracije kolone s otapalom A prije analize novog uzorka. Protok, odnosno brzina otapala bila je 0,8 mL/min. Uređaj za HPLC analizu sadrži UV-VIS detektor pomoću kojega je provedena detekcija pri određenim valnim duljinama. Identifikacija i kvantifikacija pikova zasnivala se na apsorpcijskom spektru. Klorofil *a* i bakterioklorofili su detektirani i na 665 i na 770 nm. U-HPLC sustav kalibriran je (Roy i sur. 2011) upotrebom standarda pigmenta OHI Lab Products (Danska).

### 3.5. Obrada podataka

Analizu fotosintetskih pigmenata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti provela sam na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu korištenjem programa Chromeleon™. Nadalje, u Hrvatskim vodama pripremljeni su podaci o biomasi po fitoplanktonskim skupinama, ukupna biomasa fitoplanktona te koncentracije klorofila *a* u oba jezera za razdoblje od 6 mjeseci. Dobivene podatke prikazala sam tablično i grafički te statistički obradila korištenjem programa Microsoft Excel (2016). U programu Microsoft Excel koristila sam i statistički postupak korelacije za izračunavanje povezanosti dviju varijabli. Kako bi vrijednost korelacije između ove dvije varijable prikazala brojčano, koristila sam Pearsonov koeficijent korelacije koji sam izračunala u programu Microsoft Excel. Ovaj koeficijent koristi se za varijable na intervalnoj ili omjernoj ljestvici (brojčani podaci) koji su u linearnom odnosu. Linearni odnos ovih dviju varijabli očitava se s točkastog dijagram (eng. *scatter diagram*). Pearsonov koeficijent korelacije označava se malim slovom *r* ili  $r_p$ , a može poprimiti vrijednost od -1 do +1. Ako je vrijednost koeficijenta korelacije od 0 do 1, onda imamo pozitivnu korelaciju što označava sukladan rast vrijednosti obje skupine podataka. Ako je vrijednost korelacije od -1 do 0, onda imamo negativnu korelaciju, odnosno sukladan porast vrijednosti jedne varijable, dok vrijednost druge varijable pada. Ako koeficijent korelacije iznosi 0, tada ne postoji linearna povezanost, odnosno poznavajući vrijednost jedne varijable, ne možemo zaključiti o vrijednostima druge (Udovičić 2007).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Pigmenti detektirani metodom HPLC u Vranskom jezeru kod Biograda

Pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (metodom HPLC) izmjereni su pigmenti iz uzoraka Vranskog jezera kod Biograda, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 2 te na slici 8. Metodom HPLC izmjereni su pigmenti  $\beta$ -karoten, fukoksantin i lutein.

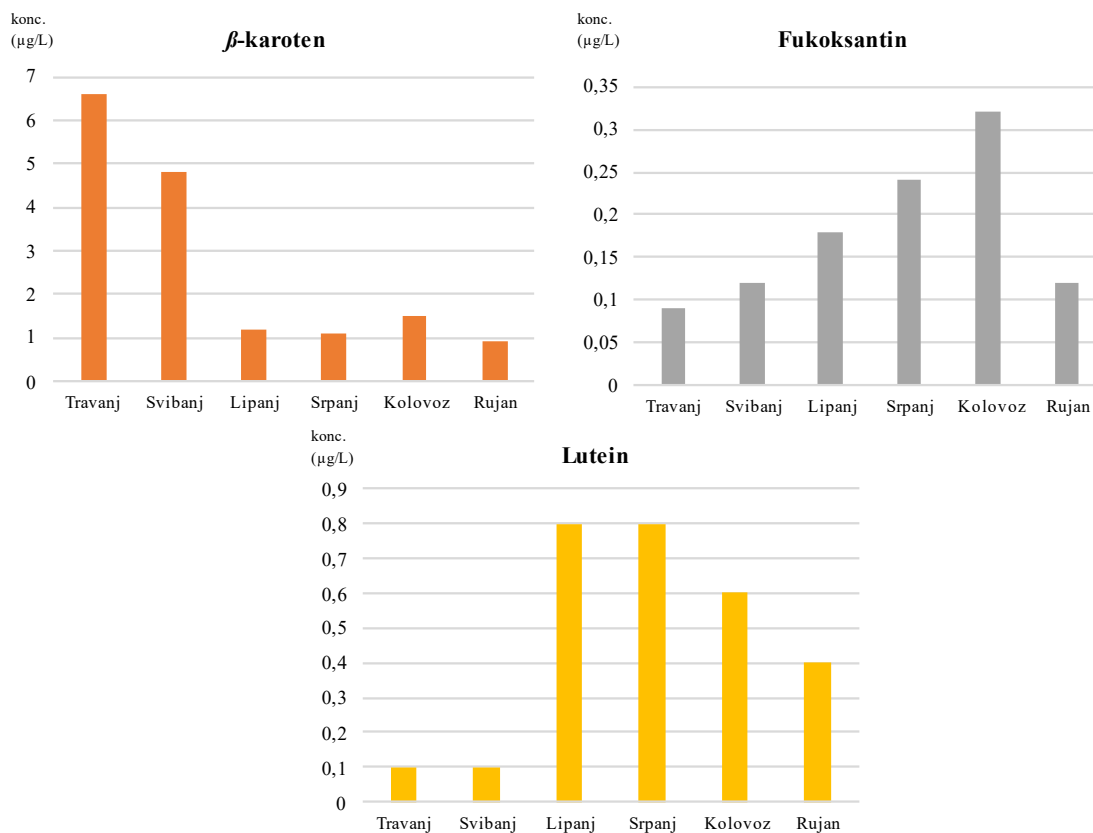
**Tablica 2.** Koncentracije pigmenata u  $\mu\text{g/L}$  dobivene analizom uzoraka Vranskog jezera kod Biograda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (metodom HPLC).

	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan
$\beta$ -karoten ( $\mu\text{g/L}$ )	6,6	4,8	1,2	1,1	1,5	0,9
Fukoksantin ( $\mu\text{g/L}$ )	0,09	0,12	0,18	0,24	0,32	0,12
Lutein ( $\mu\text{g/L}$ )	0,1	0,1	0,8	0,8	0,6	0,4

Koncentracije pigmenta  $\beta$ -karotena u istraživanom razdoblju kretale su se u rasponu od 0,9 do 6,6  $\mu\text{g/L}$ . Najveća koncentracija ovog pigmenta izmjerena je tijekom mjeseca travnja (6,6  $\mu\text{g/L}$ ), dok je najmanja koncentracija ovog pigmenta izmjerena tijekom mjeseca rujna (0,9  $\mu\text{g/L}$ ) (tablica 2 i slika 8).

Koncentracije pigmenta fukoksantina u istraživanom razdoblju kretale su se u rasponu od 0,09 do 0,32  $\mu\text{g/L}$ . Najveća koncentracija ovog pigmenta izmjerena je tijekom mjeseca kolovoza (0,32  $\mu\text{g/L}$ ), dok je najmanja koncentracija ovog pigmenta izmjerena tijekom mjeseca travnja (0,09  $\mu\text{g/L}$ ) (tablica 2 i slika 8).





**Slika 8.** Raspodjela koncentracija pigmenata u Vranskom jezeru kod Biograda od travnja do rujna 2019. godine u µg/L izmjerenih metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Koncentracije pigmenta luteina u istraživanom razdoblju kretale su se u rasponu od 0,1 do 0,8 µg/L. Najveća koncentracija ovog pigmenta izmjerena je tijekom mjeseca lipnja i srpnja (0,8 µg/L), dok je najmanja koncentracija ovog pigmenta izmjerena tijekom mjeseca travnja i svibnja (0,1 µg/L) (tablica 2 i slika 8).

## 4.2. Pigmenti detektirani metodom HPLC u Vranskom jezeru na Cresu

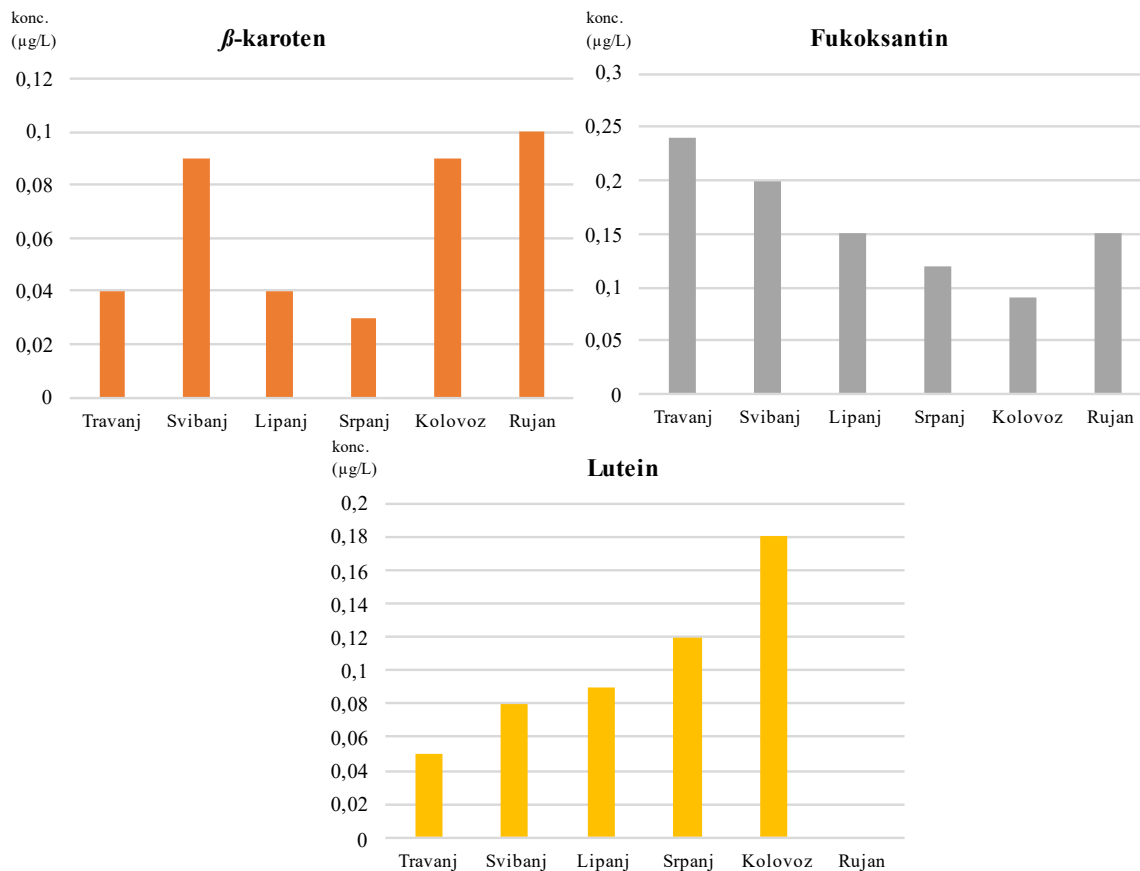
Pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (metodom HPLC) izmjereni su pigmenti iz uzoraka Vranskog jezera na Cresu, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 3 te na slici 9. Metodom HPLC izmjereni su pigmenti  $\beta$ -karoten, fukoksantin i lutein.

**Tablica 3.** Koncentracije pigmenata dobivene analizom uzoraka Vranskog jezera na Cresu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (metodom HPLC).

PIGMENT	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan
$\beta$ -karoten ( $\mu\text{g/L}$ )	0,04	0,09	0,04	0,03	0,09	0,1
Fukoksantin ( $\mu\text{g/L}$ )	0,24	0,2	0,15	0,12	0,09	0,15
Lutein ( $\mu\text{g/L}$ )	0,05	0,08	0,09	0,12	0,18	0,0

Koncentracije pigmenta  $\beta$ -karotena u istraživanom razdoblju kretale su se u rasponu od 0,03 do 0,1  $\mu\text{g/L}$ . Najveća koncentracija ovog pigmenta izmjerena je tijekom mjeseca rujna (0,1  $\mu\text{g/L}$ ), dok je najmanja koncentracija ovog pigmenta zabilježena tijekom mjeseca srpnja (0,03  $\mu\text{g/L}$ ) (tablica 3 i slika 9).

Koncentracije pigmenta fukoksantina u istraživanom razdoblju kretale su se u rasponu od 0,09 do 0,24  $\mu\text{g/L}$ . Najveća koncentracija ovog pigmenta zabilježena je tijekom mjeseca travnja (0,24  $\mu\text{g/L}$ ), dok je najmanja koncentracija ovog pigmenta zabilježena tijekom mjeseca kolovoza (0,09  $\mu\text{g/L}$ ) (tablica 3 i slika 9).



**Slika 9.** Raspodjela koncentracija pigmenata u Vranskom jezeru na Cresu od travnja do rujna 2019. godine u  $\mu\text{g/L}$  izmjerenih metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Koncentracije pigmenta luteina u istraživanom razdoblju kretale su se u rasponu od 0,0 do 0,18  $\mu\text{g/L}$ . Najveća koncentracija ovog pigmenta izmjerena je tijekom mjeseca kolovoza, dok je najmanja koncentracija ovog pigmenta izmjerena tijekom mjeseca rujna (0,0  $\mu\text{g/L}$ )

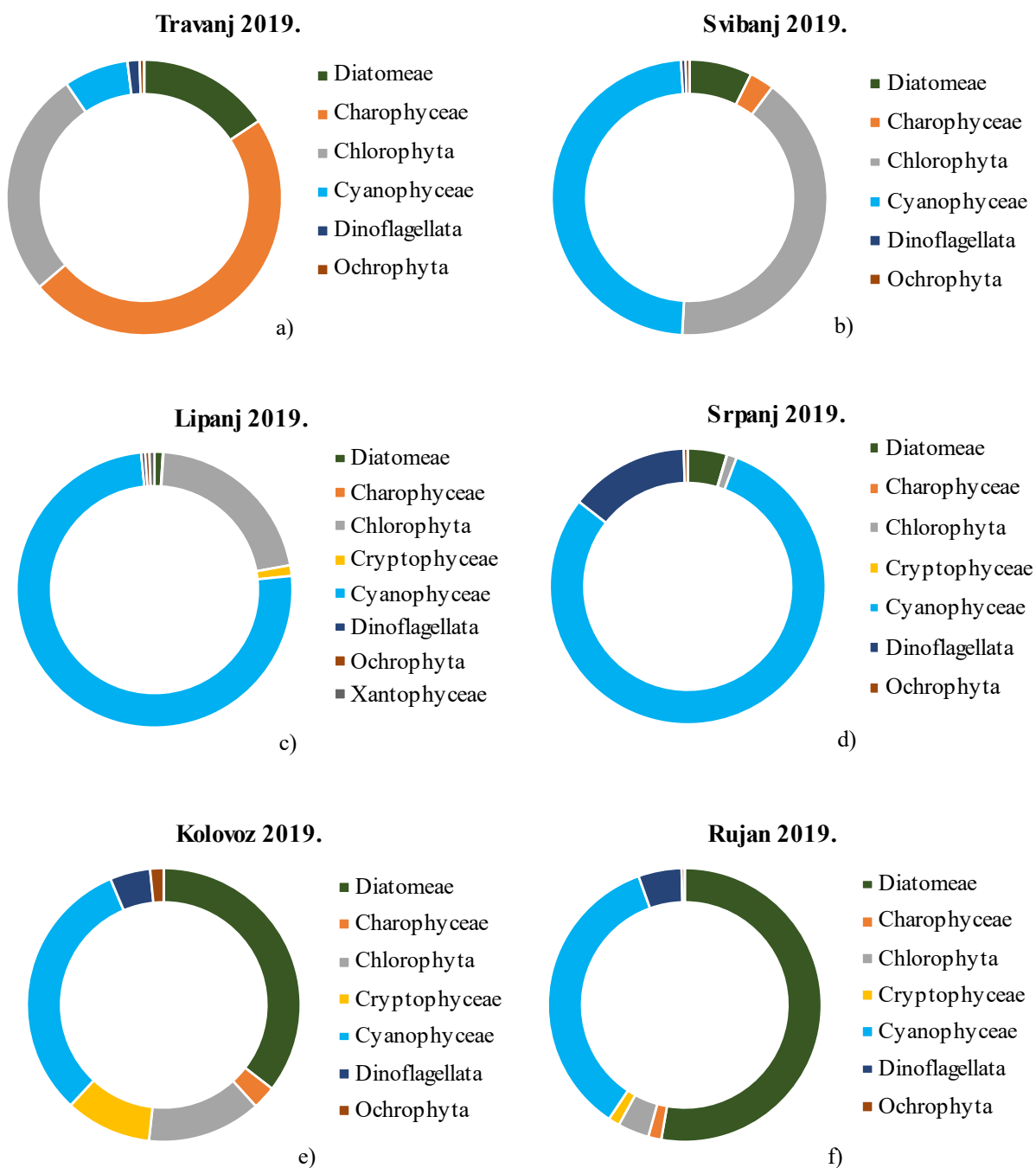
### 4.3. Fitoplanktonska zajednica u Vranskom jezeru kod Biograda

Na temelju dobivenih podataka iz Hrvatskih voda o prisutnosti fitoplanktonskih skupina u pojedinim uzorcima jezera (Tablica 4) određen je udio pojedine fitoplanktonske skupine u ukupnoj biomasi fitoplanktona. Fitoplanktonske skupine u Hrvatskim vodama detektirane su pomoću morfološke metode upotrebom svjetlosnog invertnog mikroskopa.

**Tablica 4.** Rezultati analize fitoplanktonske zajednice u prirodnom krškom jezeru (Vransko jezero kod Biograda) u sukcesivnom razdoblju od 6 mjeseci za period od travnja do rujna 2019. godine.

	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan
Diatomeae (mg/L)	0,608	0,14	0,03	0,089	0,932	1,571
Charophyceae (mg/L)	1,874	0,055	0,002	0,001	0,073	0,046
Chlorophyta (mg/L)	1,04	0,773	0,643	0,022	0,354	0,11
Cryptophyceae (mg/L)	0	0	0,038	0	0,267	0,04
Cyanophyceae (mg/L)	0,295	0,916	2,286	1,545	0,834	1,048
Euglenozoa (mg/L)	0	0	0	0	0	0
Dinoflagellata (mg/L)	0,055	0,01	0,014	0,271	0,125	0,152
Ochrophyta (mg/L)	0,021	0,009	0,015	0,009	0,042	0,011
Xantophyceae (mg/L)	0	0	0,018	0	0	0
Ukupna biomasa fitoplanktona (mg/L)	3,892	1,903	3,046	1,937	2,628	2,977

Za svaku pojedinu fitoplanktonsku skupinu izračunat je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona, a rezultati za pojedini uzorak su grafički prikazani (Slika 10 a-f).



**Slika 10.** Udio fitoplanktonskih skupina u ukupnoj biomasi fitoplanktona u Vranskom jezeru kod Biograda u sukcesivnom razdoblju od travnja do rujna 2019. godine

U travnju 2019. godine u Vranskom jezeru kod Biograda najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Charophyceae čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 8,15 % (Slika 10a). Uz Charophyceae, također su bile zastupljene i Chlorophyta (26,72 %), dok su Diatomeae (15,62 %), Cyanophyceae (7,58 %), Dinoflagellata (1,41 %) te Ochrophyta (0,48 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U svibnju 2019. godine u Vranskom jezeru kod Biograda najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Cyanophyceae čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 48,13 % (Slika 10b). Uz Cyanophyceae, također su bile zastupljene i Chlorophyta (40,62 %), dok su Diatomeae (7,36 %), Charophyceae (2,89 %), Dinoflagellata (0,53 %) te Ochrophyta (0,47 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U lipnju 2019. godine u Vranskom jezeru kod Biograda najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Cyanophyceae čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 75,05 % (Slika 10c). Uz Cyanophyceae, također su bile zastupljene i Chlorophyta (21,11 %), dok su Cryptophyceae (1,25 %), Diatomeae (0,98 %), Xantophyceae (0,59 %), Ochrophyta (0,49 %) te Dinoflagellata (0,45 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U srpnju 2019. godine u Vranskom jezeru kod Biograda najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Cyanophyceae čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 79,76 % (Slika 10d). Uz Cyanophyceae, također su bile zastupljene i Dinoflagellata (13,99 %), dok su Diatomeae (4,59 %), Chlorophyta (1,14 %) te Ochrophyta (0,46 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U kolovozu 2019. godine u Vranskom jezeru kod Biograda, najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Diatomeae čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 35,46 % (Slika 10e). Uz Diatomeae, također su bile zastupljene i Cyanophyceae (31,74 %), dok su Chlorophyta (13,47 %), Cryptophyceae (10,16 %), Dinoflagellata (4,76 %), Charophyceae (2,78 %) te Ochrophyta (0,46 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U rujnu 2019. godine u Vranskom jezeru kod Biograda, najzastupljenija fitoplanktonska skupina bila je Diatomeae čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 52,77 % (Slika 10f). Uz Diatomeae, također su bile zastupljene i Cyanophyceae (35,20 %), dok su Dinoflagellata (5,11 %), Chlorophyta (3,69 %), Charophyceae (1,55 %), Cryptophyceae (1,34 %) te Ochrophyta (0,40 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

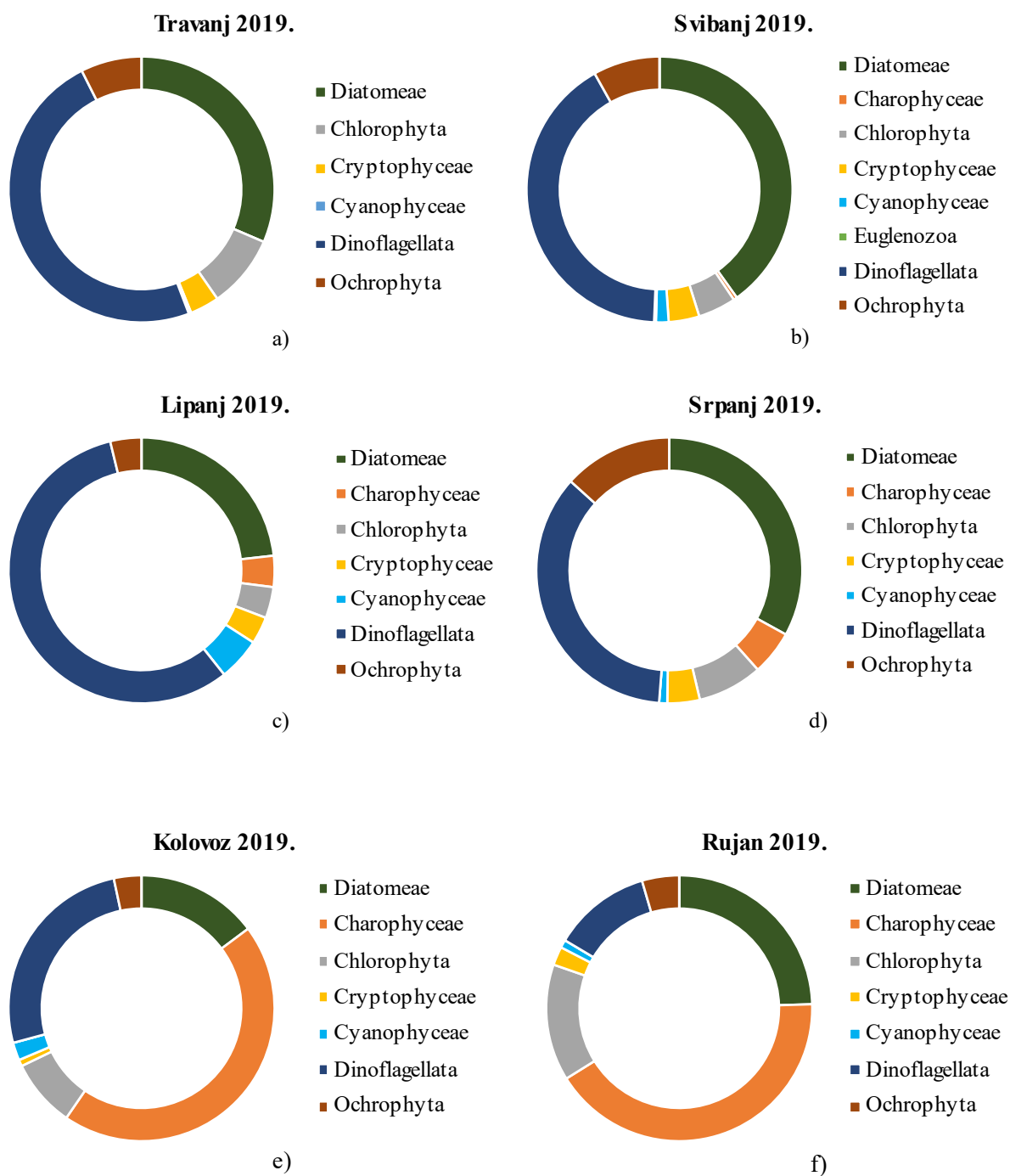
#### 4.4. Fitoplanktonska zajednica u Vranskom jezeru na Cresu

Na temelju dobivenih podataka iz Hrvatskih voda o prisutnosti fitoplanktonskih skupina u pojedinim uzorcima jezera (Tablica 5) određen je udio pojedine fitoplanktonske skupine u ukupnoj biomasi fitoplanktona. Fitoplanktonske skupine u Hrvatskim vodama analizirane su pomoću morfološke metode upotrebom invertnog svjetlosnog mikroskopa.

**Tablica 5.** Rezultati analize fitoplanktonske zajednice u prirodnom krškom jezeru (Vransko jezero na Cresu) u sukcesivnom razdoblju od 6 mjeseci za period od travnja do rujna 2019. godine.

	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan
Diatomeae (mg/L)	0,106	0,183	0,049	0,067	0,075	0,076
Charophyceae (mg/L)	0	0,002	0,008	0,011	0,227	0,129
Chlorophyta (mg/L)	0,03	0,021	0,008	0,016	0,042	0,044
Cryptophyceae (mg/L)	0,012	0,017	0,007	0,008	0,004	0,007
Cyanophyceae (mg/L)	0,001	0,007	0,011	0,002	0,011	0,003
Euglenozoa (mg/L)	0	0,001	0	0	0	0
Dinoflagellata (mg/L)	0,163	0,188	0,12	0,072	0,131	0,037
Ochrophyta (mg/L)	0,025	0,037	0,008	0,027	0,017	0,014
Xantophyceae (mg/L)	0	0	0	0	0	0
Ukupna biomasa fitoplanktona (mg/L)	0,337	0,455	0,21	0,203	0,508	0,311

Za svaku pojedinu fitoplanktonsku skupinu izračunat je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona, a rezultati za pojedini uzorak su grafički prikazani (Slika 11 a-f).



**Slika 11.** Udio fitoplanktonskih skupina u ukupnoj biomasi fitoplanktona u Vranskom jezeru na Cresu u sukcesivnom razdoblju od travnja do rujna 2019. godine



U travnju 2019. godine u Vranskom jezeru na Cresu najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Dinoflagellata čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 48,37 % (Slika 11a). Uz Dinoflagellata, također su bile zastupljene i Diatomeae (31,45 %), dok su Chlorophyta (8,90 %), Ochrophyta (7,42 %), Cryptophyceae (3,56 %) te Cyanophyceae (0,30 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U svibnju 2019. godine u Vranskom jezeru na Cresu najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Dinoflagellata čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 41,32 % (Slika 11b). Uz Dinoflagellata, također su bile zastupljene i Diatomeae (40,22 %), dok su Ochrophyta (8,13 %), Chlorophyta (4,62 %), Cryptophyceae (3,74 %), Cyanophyceae (1,54 %), Charophyceae (0,44 %) te Euglenozoa (0,22 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U lipnju 2019. godine u Vranskom jezeru na Cresu najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Dinoflagellata čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 57,14 % (Slika 11c). Uz Dinoflagellata, također su bile zastupljene i Diatomeae (23,33 %), dok su Cyanophyceae (5,24 %), Charophyceae, Chlorophyta i Ochrophyta (3,81 %) te Cryptophyceae (3,33 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U srpnju 2019. godine u Vranskom jezeru na Cresu najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Dinoflagellata čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 35,47 % (Slika 11d). Uz Dinoflagellata, također su bile zastupljene i Diatomeae (33,00 %), dok su Ochrophyta (13,3 %), Charophyceae (5,42 %), Cryptophyceae (3,94 %), Cyanophyceae (0,99 %) te Chlorophyta (0,05 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U kolovozu 2019. godine u Vranskom jezeru na Cresu najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Charophyceae čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 44,69 % (Slika 11e). Uz Charophyceae, također su bile zastupljene i Dinoflagellata (25,79 %), dok su Diatomeae (14,7 %), Chlorophyta (8,27 %), Ochrophyta (3,35 %), Cyanophyceae (2,17 %) te Cryptophyceae (0,79 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

U rujnu 2019. godine u Vranskom jezeru na Cresu najzastupljenija fitoplanktonska skupina je bila Charophyceae čiji je udio u ukupnoj biomasi fitoplanktona 44,69 % (Slika 11f). Uz Charophyceae, također su bile zastupljene i Diatomeae (24,44 %), dok su Chlorophyta (14,15 %), Dinoflagellata (11,90 %), Cryptophyceae (2,25 %) te Cyanophyceae (2,25 %) bile zastupljene s niskim postotkom.

#### 4.5. Odnos ukupne biomase fitoplanktona i koncentracije klorofila *a*

U tablici 6 i 7 prikazane su koncentracije ukupne biomase fitoplanktona i koncentracije klorofila *a* u analiziranim uzorcima Vranskog jezera kod Biograda i Vranskog jezera na Cresu.

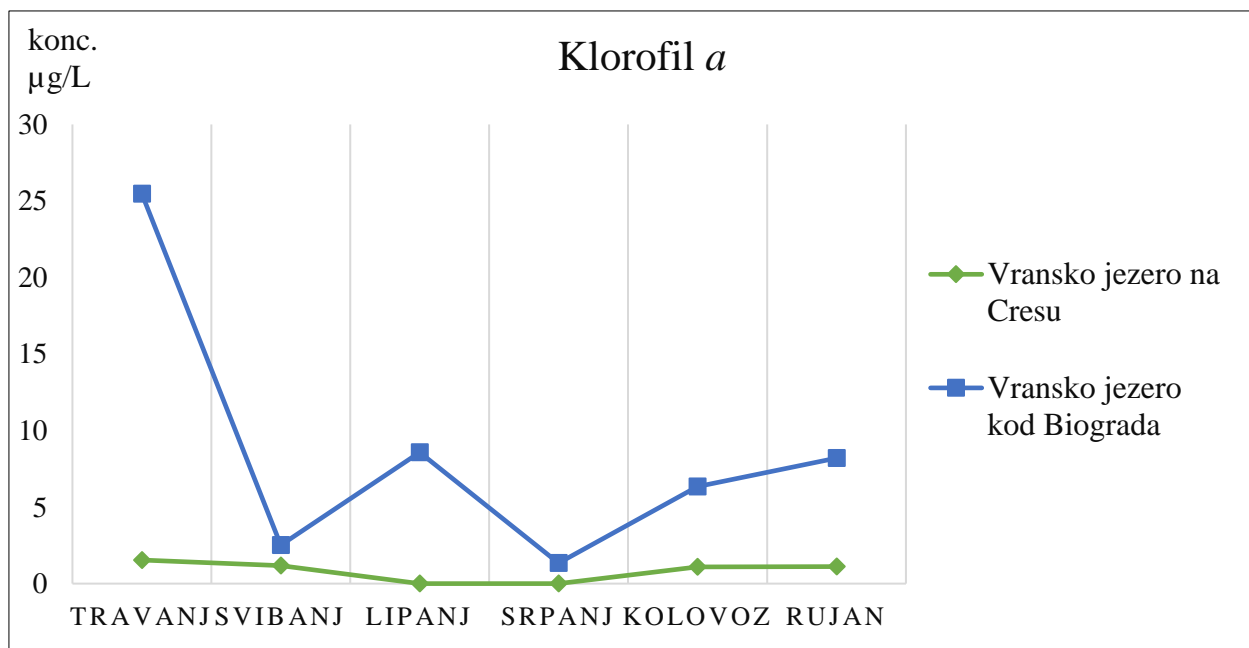
Koncentracije klorofila *a* u Vranskom jezeru kod Biograda i Vranskom jezeru na Cresu izmjerene su metodom spektrofotometrije u Hrvatskim vodama u istraživanom razdoblju od travnja do rujna 2019. godine (Slika 12).

**Tablica 6.** Vrijednosti koncentracije ukupne biomase fitoplanktona u mg/L i klorofila *a* u µg/L izmjerene u analiziranim uzorcima Vranskog jezera kod Biograda.

	<b>Ukupna biomasa fitoplanktona / mg/L</b>	<b>Koncentracija klorofila <i>a</i> / µg/L</b>
<b>Travanj</b>	3,892	25,46
<b>Svibanj</b>	1,903	2,52
<b>Lipanj</b>	3,046	8,57
<b>Srpanj</b>	1,937	1,34
<b>Kolovoz</b>	2,628	6,34
<b>Rujan</b>	2,977	8,2

**Tablica 7.** Vrijednosti koncentracije ukupne biomase fitoplanktona u mg/L i klorofila *a* u µg/L izmjerene u analiziranim uzorcima Vranskog jezera na Cresu.

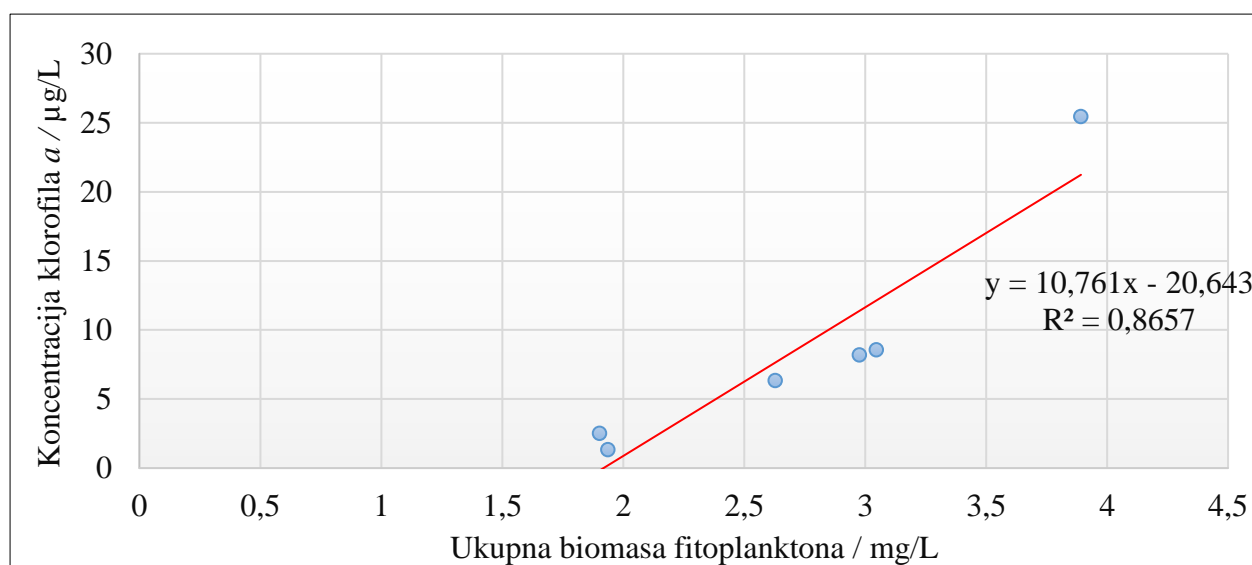
	<b>Ukupna biomasa fitoplanktona / mg/L</b>	<b>Koncentracija klorofila <i>a</i> / µg/L</b>
<b>Travanj</b>	0,337	1,54
<b>Svibanj</b>	0,455	1,18
<b>Lipanj</b>	0,21	<0,7
<b>Srpanj</b>	0,203	<0,7
<b>Kolovoz</b>	0,508	1,1
<b>Rujan</b>	0,311	1,12



**Slika 12.** Raspodjela koncentracije pigmenta klorofila *a* u Vranskom jezeru kod Biograda i u Vranskom jezeru na Cresu od travnja do rujna 2019. godine

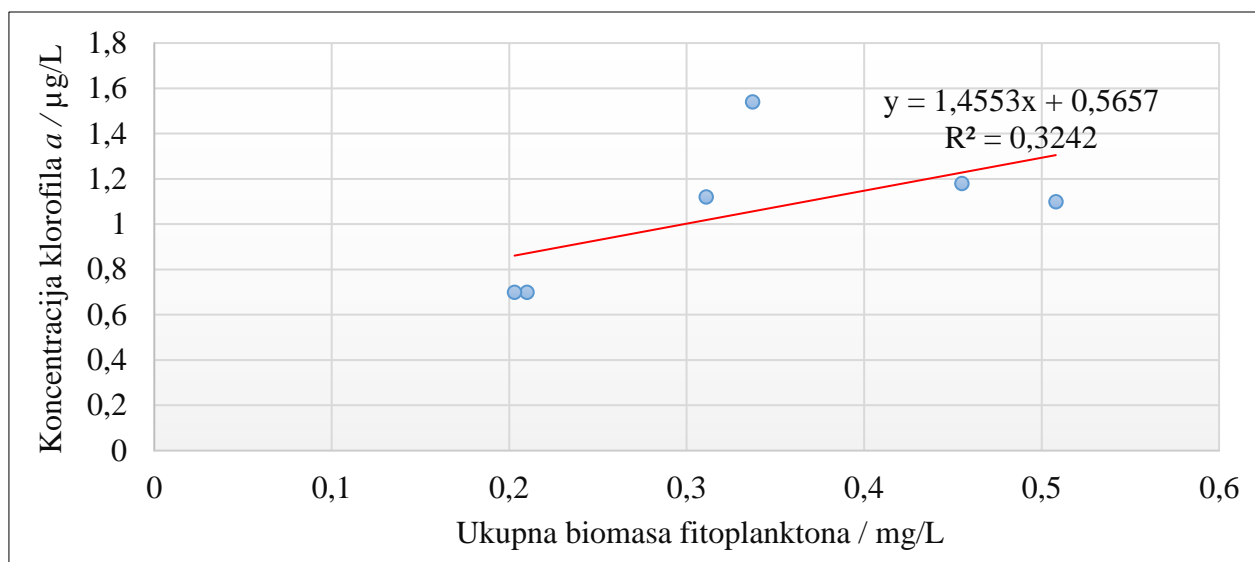
Vrijednosti koncentracija klorofila *a* u Vranskom jezeru kod Biograda puno su veće od vrijednosti koncentracija klorofila *a* u Vranskom jezeru na Cresu u istraživanom razdoblju od travnja do rujna 2019. godine. Najveće koncentracije pigmenta klorofila *a* (Slika 12) izmjerene su tijekom travnja u oba jezera, gdje je najveća koncentracija za Vransko jezero kod Biograda iznosila 25,46 µg/L, a najveća koncentracija za Vransko jezero na Cresu iznosila je 1,54 µg/L.

Za svako jezero je posebno izračunat koeficijent korelacije, a sama korelacija je prikazana i grafičkim prikazom (Slike 13 i 14).



**Slika 13.** Grafički prikaz odnosa ukupne biomase fitoplanktona i koncentracije klorofila *a* u Vranskom jezeru kod Biograda u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine

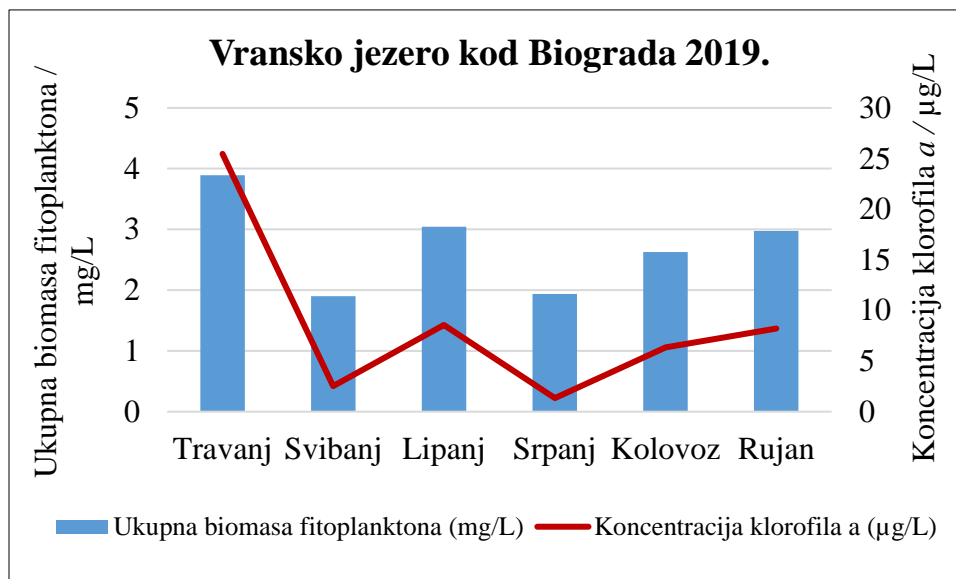
Pearsonov koeficijent korelacije između ukupne biomase fitoplanktona i koncentracije klorofila *a* u Vranskom jezeru je pozitivan i iznosi  $r = 0,930436$ , odnosno ovom analizom je potvrđena statistička veza između ovih dviju varijabli, pri čemu povećanje ukupne biomase fitoplanktona prati povećanje koncentracije klorofila *a*.



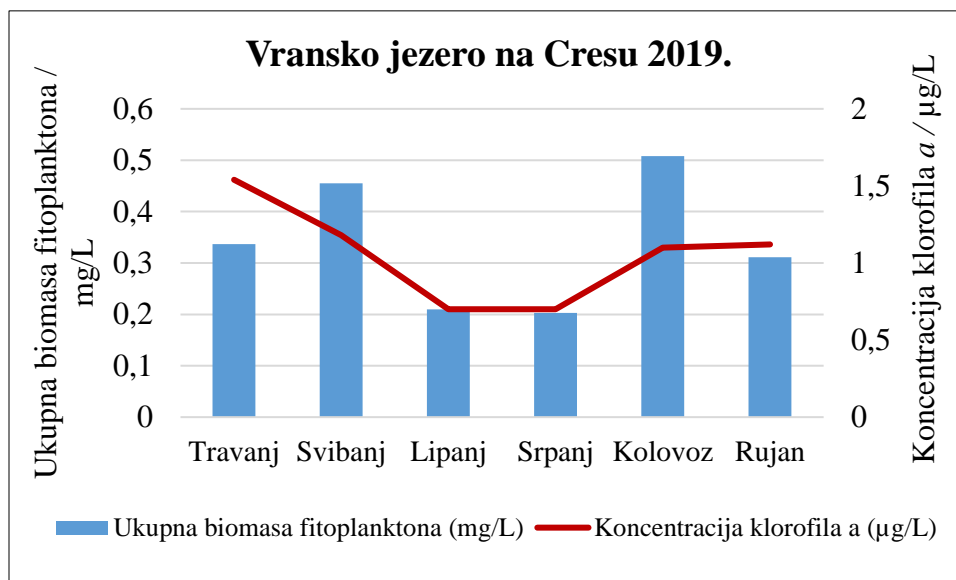
**Slika 14.** Grafički prikaz odnosa ukupne biomase fitoplanktona i koncentracije klorofila *a* u Vranskom jezeru na Cresu u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine

Pearsonov koeficijent korelacije između ukupne biomase fitoplanktona i koncentracije klorofila *a* u Vranskom jezeru na Cresu iznosi  $r = 0,569355$  i korelacija je pozitivna čime je također potvrđena statistička veza između ovih dviju varijabli, pri čemu povećanje ukupne biomase prati povećanje koncentracije klorofila *a*.

Prikazana je i raspodjela ukupne biomase fitoplanktona te koncentracije pigmenta klorofila *a* u Vranskom jezeru kod Biograda (Slika 15) i u Vranskom jezeru na Cresu (Slika 16) u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine.



**Slika 15.** Raspodjela ukupne biomase fitoplanktona te koncentracije klorofila *a* u Vranskom jezeru kod Biograda u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine

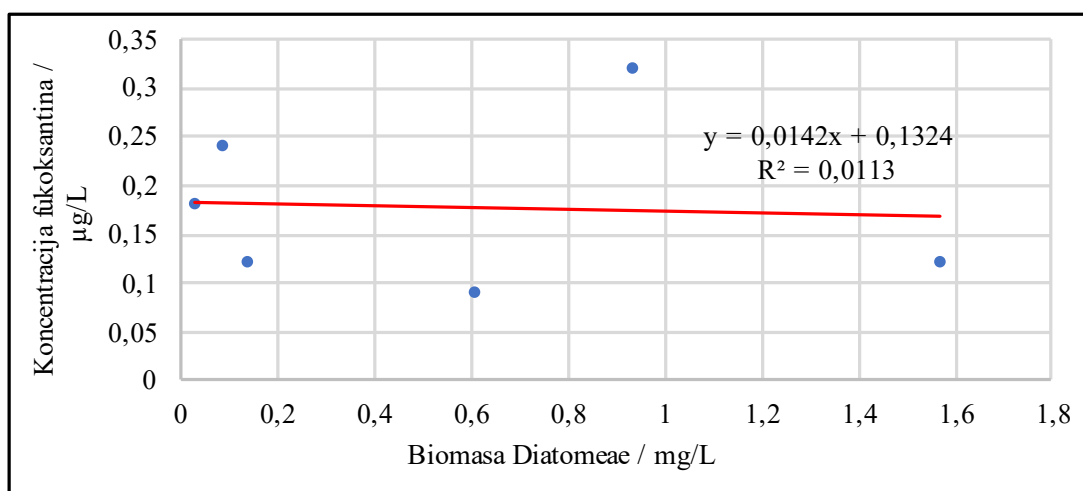


**Slika 16.** Raspodjela ukupne biomase fitoplanktona te koncentracije klorofila *a* u Vranskom jezeru na Cresu u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine

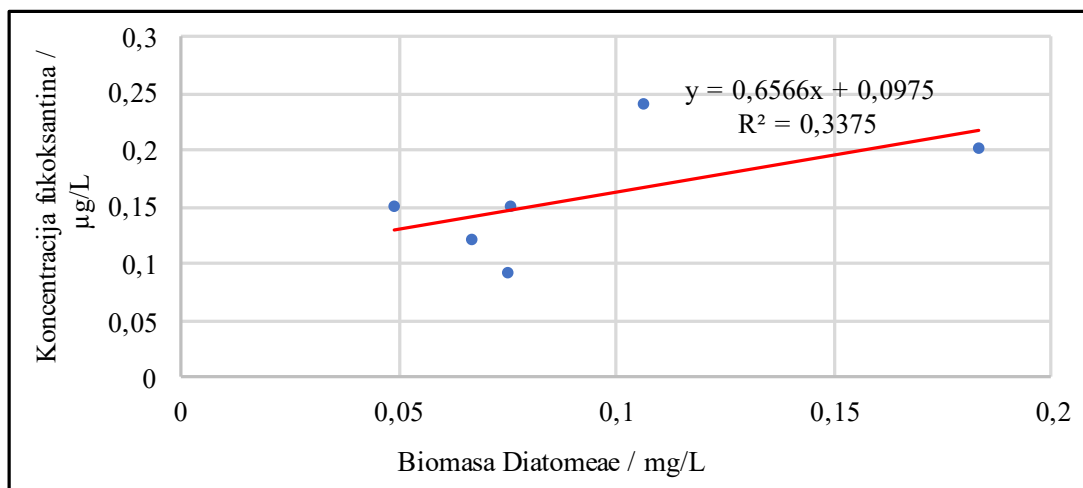
U Vranskom jezeru kod Biograda ukupna biomasa fitoplanktona prati isti trend rasta ili pada s koncentracijom klorofila *a*, odnosno gdje biomasa fitoplanktona ima visoke vrijednosti, tu je i povećana koncentracija klorofila *a* (Slika 15). U Vranskom jezeru na Cresu povećanje ukupne biomase fitoplanktona prati trend povećanja koncentracije klorofila *a*, osim u travnju i rujnu, gdje su zabilježene veće koncentracije klorofila *a*, a smanjenje ukupne biomase fitoplanktona (Slika 16).

#### 4.6. Odnos izmjerenih pigmenata s taksonomskim grupama fitoplanktona kojima pripadaju

Na temelju izmjerenih koncentracija pigmenata HPLC metodom, prikazan je odnos, odnosno korelacija izmjerenih pigmenata s taksonomskim grupama kojima pripadaju, u Vranskom jezeru kod Biograda i Vranskom jezeru na Cresu (Slike 17 i 18).



a)



b)

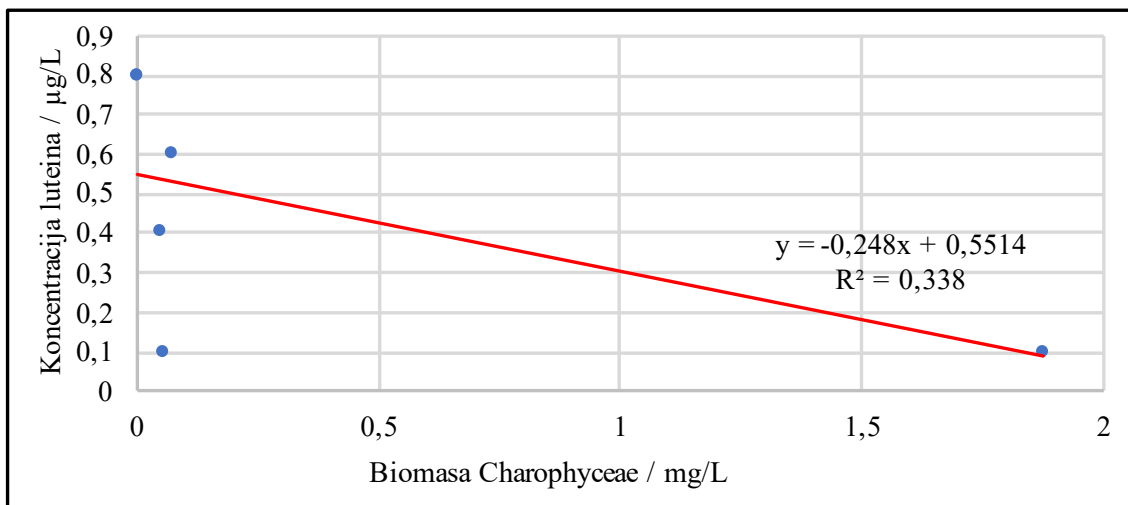
**Slika 17.** Grafički prikaz odnosa biomase fitoplanktonske skupine Diatomeae te koncentracije pigmenta fukoksantina: a) u Vranskom jezeru kod Biograda; b) u Vranskom jezeru na Cresu u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine



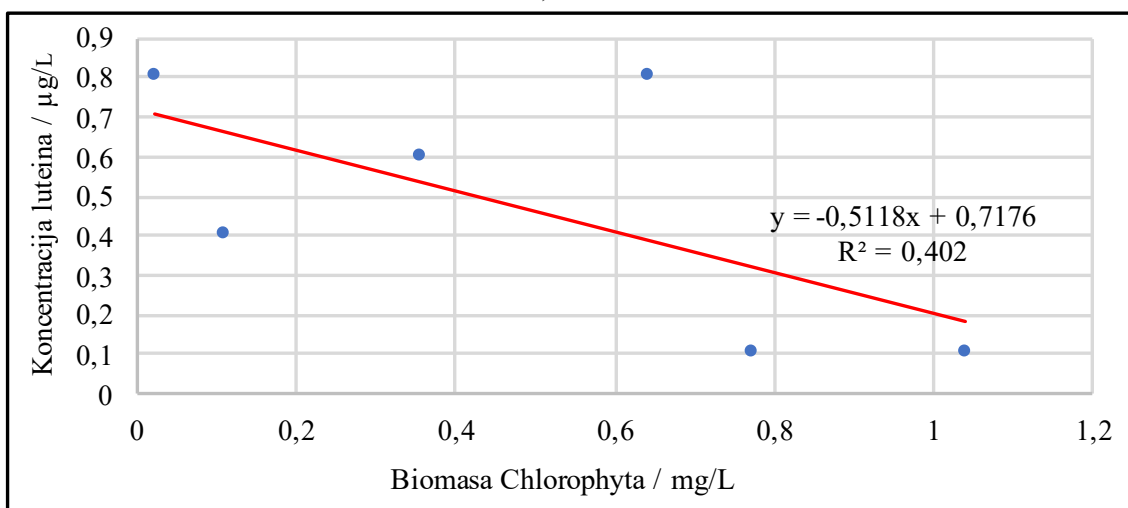
Odnos biomase skupine Diatomeae i fukoksantina u Vranskom jezeru kod Biograda i Vranskom jezeru na Cresu prikazan je na slici 17a i na slici 17b. Za svako jezero također je izračunat i Pearsonov koeficijent korelacije. Također su prikazane i raspodjele biomasa pojedinih fitoplanktonskih skupina te koncentracija njihovih dijagnostičkih pigmenata u oba jezera u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine (Slika 20).

Pearsonov koeficijent korelacije za Vransko jezero kod Biograda iznosi  $r = -0,05988$ , vrijednost je  $r < 0$ , odnosno varijable negativno koreliraju, što ukazuje na slabo negativnu korelaciju između ukupne biomase skupine Diatomeae i koncentracije pigmenta fukoksantina u Vranskom jezeru kod Biograda što označava mogućnost tendencije da se smanjenje jedne varijable povezuje s povećanjem druge varijable i obrnuto. Za Vransko jezero na Cresu, Pearsonov koeficijent korelacije iznosi  $r = 0,58092$ , vrijednost je  $r > 0$ , odnosno varijable pozitivno koreliraju što označava statističku vezu između biomase skupine Diatomeae i koncentracije fukoksantina.

Prikazan je i odnos biomase fitoplanktonskih skupina Charophyceae i Chlorophyta s pigmentom luteinom čija je koncentracija također izmjerena HPLC metodom u Vranskom jezeru kod Biograda (Slike 18a i b), a zatim i u Vranskom jezeru na Cresu (Slika 19a i b). Također je izračunat i Pearsonov koeficijent korelacije za oba jezera.



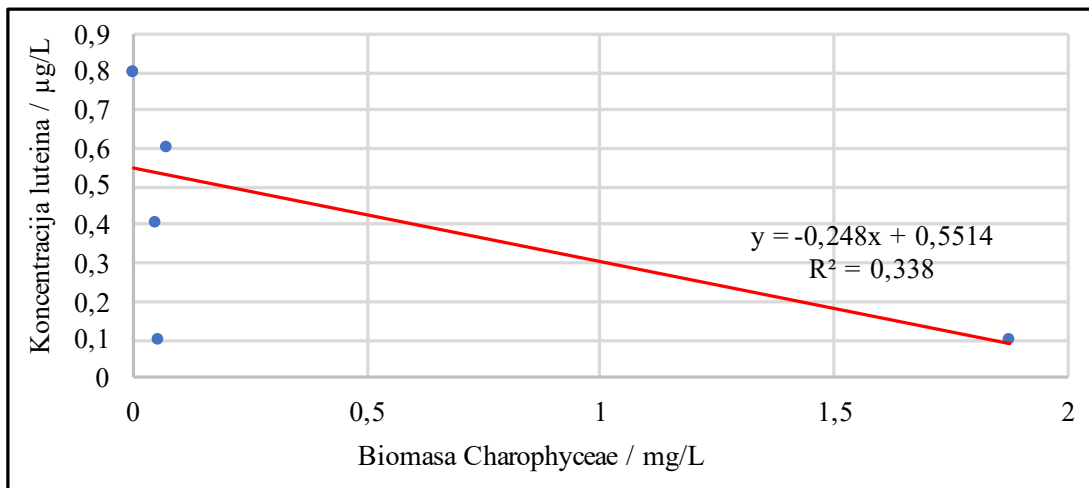
a)



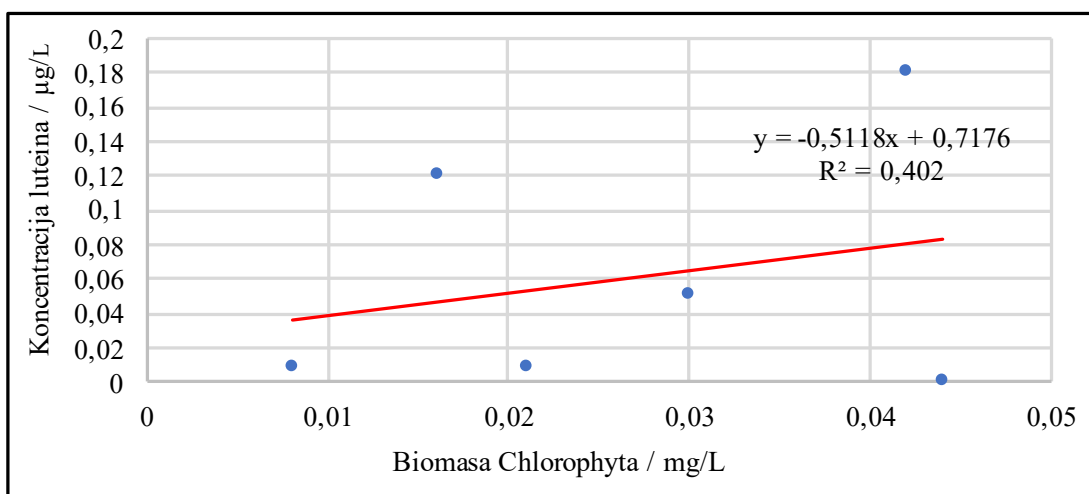
b)

**Slika 18.** Grafički prikaz odnosa a) biomase skupine Charophyceae te koncentracije luteina u Vranskom jezeru kod Biograda; b) biomase skupine Chlorophyta i koncentracije luteina u Vranskom jezeru kod Biograda od travnja do rujna 2019. godine

Pearsonov koeficijent korelacije za odnos biomase fitoplanktonske skupine Charophyceae (harofita) i koncentracije pigmenta luteina u Vranskom jezeru kod Biograda (Slika 18a) iznosi  $r = -0,58137$ , dok za odnos biomase Chlorophyta (zelene alge) i koncentracije luteina u Vranskom jezeru kod Biograda (Slika 18b) iznosi  $r = -0,63404$ . U oba slučaja Pearsonov koeficijent korelacije je negativan što znači da u oba slučaja postoji negativna korelacija između dviju varijabli.



a)

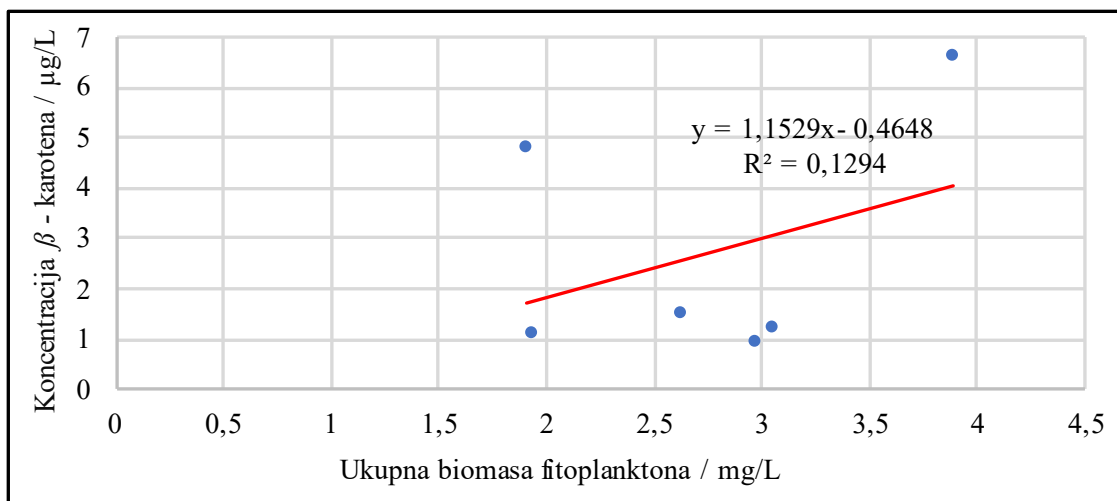


b)

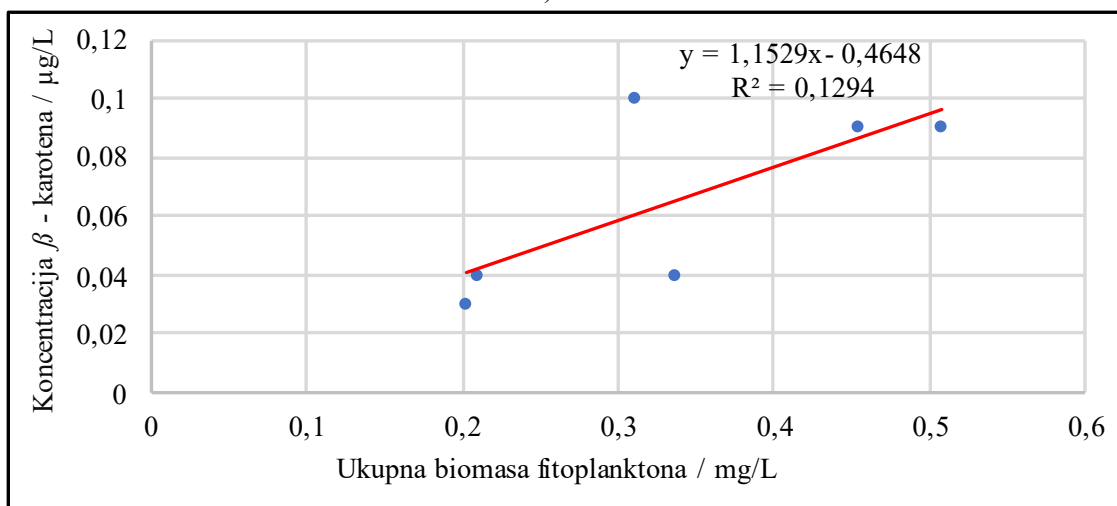
**Slika 19.** Grafički prikaz odnosa a) biomase skupine Charophyceae te koncentracije luteina u Vranskom jezeru na Cresu; b) biomase skupine Chlorophyta i koncentracije luteina u Vranskom na Cresu od travnja do rujna 2019. godine

Pearsonov koeficijent korelacije za odnos biomase Charophyceae (harofita) i koncentracije luteina u Vranskom jezeru na Cresu (Slika 19a) iznosi  $r = 0,553118$ , dok za odnos biomase Chlorophyta (zelene alge) i koncentracije luteina u Vranskom jezeru na Cresu (Slika 19b) iznosi  $r = 0,258857$ . U oba slučaja Pearsonov koeficijent korelacije je pozitivan, što ukazuje na statističku vezu između dviju varijabli.

Prikazan je i odnos ukupne biomase fitoplanktona s pigmentom  $\beta$ -karotenom čija je koncentracija također izmjerena HPLC metodom u Vranskom jezeru kod Biograda (Slika 20a), a zatim i u Vranskom jezeru na Cresu (Slika 20b). Također je izračunat i Pearsonov koeficijent korelacije za oba jezera.



a)



b)

**Slika 20.** Grafički prikaz ukupne biomase i koncentracije  $\beta$ -karotena: a) u Vranskom jezeru kod Biograda; b) u Vranskom jezeru na Cresu u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine

Pearsonov koeficijent korelacije za Vransko jezero kod Biograda iznosi  $r = 0,359764$ , dok za Vransko jezero na Cresu iznosi  $r = 0,721995$ , što upućuje na pozitivnu korelaciju i statističku povezanost dviju analiziranih varijabli u oba jezera.



**Slika 21.** Raspodjela biomasa fitoplanktonskih skupina te koncentracija dijagnostičkih pigmenata u Vranskom jezeru kod Biograda i u Vranskom jezeru na Cresu u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine

Prikazana je i raspodjela biomasa fitoplanktonskih skupina te koncentracija dijagnostičkih pigmenata u oba jezera u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine. U Vranskom jezeru kod Biograda dolazi do preklapanja između dviju analiziranih varijabli (biomasa Diatomeae i koncentracija fukoksantina) samo tijekom mjeseca travnja i rujna, dok u ostalim mjesecima taj trend nije vidljiv (slika 21a). U Vranskom jezeru na Cresu do preklapanja između ovih varijabli dolazi samo u mjesecima svibnju i kolovoza, dok u ostalim mjesecima preklapanje nije vidljivo (slika 21b).

U Vranskom jezeru kod Biograda, preklapanje između biomase Charophyceae i koncentracije luteina vidljivo je samo u mjesecu travnju, dok kod ostalih mjeseci taj trend nije vidljiv (slika 21c). U Vranskom jezeru na Cresu, preklapanje između ovih varijabli je vidljivo u mjesecima kolovoza i rujnu, dok u ostalim mjesecima nije vidljivo preklapanje (slika 21d).

U Vranskom jezeru kod Biograda, preklapanje između biomase Chlorophyta i koncentracije luteina vidljivo je u mjesecima travnju i svibnju, dok u ostalim mjesecima taj trend nije vidljiv (slika 21e). U Vranskom jezeru na Cresu, preklapanje između ovih varijabli vidljivo je tijekom mjeseca travnja, svibnja, kolovoza i rujna, dok tijekom lipnja i srpnja nije vidljivo preklapanje (slika 21f)

U Vranskom jezeru kod Biograda, preklapanje između ukupne biomase i koncentracije  $\beta$ -karotena vidljivo je u svim mjesecima, osim u travnju i svibnju (slika 21g), dok je u Vranskom jezeru na Cresu preklapanje između ovih varijabli vidljivo u svim mjesecima, osim u mjesecu rujnu (slika 21g).

## 5. RASPRAVA

Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u ovom istraživanju uspoređivana je s taksonomskom identifikacijom i kvantifikacijom korištenjem tradicionalne mikroskopije kako bi se odredile fitoplanktonske zajednice s dva različita lokaliteta u Vranskom jezeru kod Biograda te Vranskom jezeru na Cresu.

Istraživanje je provedeno na ukupno 12 različitih uzoraka (6 uzoraka s Vranskog jezera kod Biograda te 6 uzoraka s Vranskog jezera na Cresu). Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC analizom) dobivene su koncentracije različitih pigmenata ( $\beta$ -karoten, lutein, fukoksantin). Fotosintetski pigmenti mogu se lako detektirati tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti koja može pružiti točnije podatke od onih dobivenih korištenjem mikroskopske analize (Jeffrey i sur. 1997).

U oba jezera najveće koncentracije pigmenata zabilježene su uglavnom tijekom proljetnih ili kasnih ljetnih mjeseci. Ovakvi rezultati su bili i očekivani jer je uobičajeno da tijekom proljetnih mjeseci zbog veće količine svjetlosti i povećanog dotoka hranjivih tvari dolazi do jačeg rasta i razvoja fitoplanktona ali i tijekom kasnih ljetnih mjeseci kada u vodama opet dolazi do povećanja koncentracija hranjivih tvari zbog raspada drugih vrsta (primjerice herbivornog zooplanktona) što opet stvara povoljne uvjete za pojačani razvoj fitoplanktona (Pingree i sur. 1976; Pierson i sur. 2013).

Na temelju dobivenih koncentracija pigmenata određene su dominantne fitoplanktonske skupine u oba prirodna krška jezera s obzirom da sastav fotosintetskih pigmenata može poslužiti za kemotaksonomsku procjenu fitoplanktonskih zajednica (Pniewski 2018; Schlüter i sur. 2000). Prema rezultatima HPLC analize, u istraživanim uzorcima Vranskog jezera kod Biograda i Vranskog jezera na Cresu, na temelju dijagnostičkih pigmenata, određena je zastupljenost skupina Diatomeae, Charophyceae te Chlorophyta. Pigment fukoksantin je dijagnostički pigment za Diatomeae (dijatomeje), lutein za Charophyceae (harofita) i Chlorophyta (zelene alge) (Viličić 2002; Suresh Kumar i sur. 2021; Not i sur. 2005), dok je  $\beta$ -karoten karakterističan za mnoge skupine fitoplanktona (Takaichi 2011).

Standardnim metodama morfoloških i taksonomskih analiza zajednice fitoplanktona koje su napravljene u Hrvatskim vodama, utvrđeno je devet fitoplanktonskih skupina u oba jezera: Diatomeae (dijatomeje), Charophyceae (harofita), Chlorophyta (zelene alge), Cryptophyceae

(kriptofita), Cyanophyceae (cijanobakterije), Euglenozoa (zeleni bičaiši), Dinoflagellata (svjetleći bičaiši) Ochrophyta, Xantophyceae (žutozelene alge). Izračunate su njihove biomase po mjesecima istraživanja u oba jezera, kao i ukupna biomasa fitoplanktona. Tijekom cijelog istraživanog razdoblja u oba jezera, brojnošću su dominirale fitoplanktonske skupine Dinoflagellata (svjetleći bičaiši), Diatomeae (dijatomeje), Cyanophyceae (cijanobakterije) i Chlorophyta (zelene alge), dok je zastupljenost ostalih skupina bila vrlo mala.

U ovom istraživanju istraživan je i odnos ukupne biomase fitoplanktona i koncentracije klorofila *a*. Klorofil *a* je pigment koji je neophodan za fotosintezu, nalazimo ga u svim algama te ujedno predstavlja važan parametar za ocjenu ekološkog stanja vodenih ekosustava (Brewin i sur. 2019; Makarevich i sur. 2020). U Vranskom jezeru kod Biograda visoke koncentracije klorofila *a* zabilježene su u travnju kada je ujedno zabilježena i najveća vrijednost ukupne biomase fitoplanktona što je i očekivano s obzirom da tijekom proljeća dolazi do povećanja hranjivih tvari u vodama, povećanja temperature i većeg intenziteta svjetlosti što sve uzrokuje pojačani rast i razvoj fitoplanktona (Martin i sur. 2010; Pierson i sur. 2013; Makarevich i sur. 2020). Ovakav trend rasta ili pada ukupne biomase s koncentracijom klorofila *a* zabilježen je i u ostalim mjesecima istraživanja (slika 15). U Vranskom jezeru na Cresu, visoke koncentracije klorofila *a* također su zabilježene u travnju, no ne i vrijednosti ukupne biomase fitoplanktona. Najveća vrijednost ukupne biomase zabilježena je u kolovozu. U ovom jezeru povećanje ukupne biomase fitoplanktona prati trend povećanja koncentracije klorofila *a* u svim mjesecima istraživanja osim u travnju i rujnu kada su zabilježene veće koncentracije klorofila *a*, a manje vrijednosti ukupne biomase fitoplanktona (slika 16). Koncentracije klorofila *a* su u ovim mjesecima bile veće jer su vjerojatno bile izmjerene u nekim drugim stanicama koje također sadrže klorofil *a* (primjerice biljne stanice) (Porcar-Castell i sur. 2021). U oba jezera je između ovih varijabli utvrđena statistička veza što znači da praćenje ukupne biomase prati povećanje koncentracije klorofila *a* što je bilo i za očekivati s obzirom da se koncentracija klorofila *a* u brojnim istraživanjima pokazala kao dobra metoda za mjerenje ukupne biomase fitoplanktona, dok se sama biomasa fitoplanktona pokazala kao dobar parametar za praćenje zajednica algi te za procjenu kvalitete vode (Poddar i sur. 2019; Marlian i sur. 2015., Maslukah i sur. 2022).

Koncentracija klorofila *a* pruža jako dobar uvid u količinu biomase fitoplanktona, ali ne daje uvid u strukturu fitoplanktonske zajednice pa se zbog toga često moraju koristiti novije metode poput procjene koncentracije dodatnih pigmenata koje, uz procjenu koncentracije klorofila *a* daju



djelomičan uvid u strukturu fitoplanktonske zajednice jer se preko njih može odrediti koja grupa organizama prevladava u zajednici (Ston i Kosakowska 2000; Ston Egiert i sur. 2010; Schlüter i sur. 2000). Upravo iz ovog razloga, u ovom istraživanju rezultati dobiveni u Hrvatskim vodama uspoređivani su sa rezultatima dobivenim HPLC metodom.

Fitoplanktonska skupina Diatomeae (dijatomeje) u Vranskom jezeru kod Biograda su bile zastupljene tijekom kasnih ljetnih mjeseci (u kolovozu i rujnu), dok su u Vranskom jezeru na Cresu najviše bile zastupljene tijekom proljetnih mjeseci (u travnju). Tijekom proljeća i kasnih ljetnih mjeseci se obično zapaža veća zastupljenost dijatomeja u vodenim ekosustavima (Totti i sur. 2018; Madhu i sur. 2010) te su često prisutne u sastavu fitoplanktonskih zajednica istraživanih jezera (Tomec i sur. 2009). Često su prisutne u jezerima prilikom ljetnih mjeseci jer se tada dušik iscrpi s vodenog sustava (Lampert i Somer 2007), ali mogu dominirati i tijekom cijele godine zbog svoje otpornosti na različite uvjete staništa (Hoagland i sur. 1993). Zastupljenost dijatomeja također je dokazana pigmentom fukoksantinom kao glavnog dijagnostičkog pigmenta za ovu fitoplanktonsku skupinu (Wang i sur. 2018) izmjerenog metodom HPLC. U Vranskom jezeru kod Biograda, poklapanja između zastupljenosti dijatomeja i koncentracija fukoksantina vidljiva su tijekom mjeseca travnja i rujna, dok tijekom ostalih mjeseci istraživanja (svibanj, lipanj, srpanj, kolovoz) nisu vidljiva preklapanja (slika 21a). U ovom jezeru je također utvrđena slaba korelacija između ovih dviju varijabli. U Vranskom jezeru na Cresu, poklapanja su vidljiva tijekom mjeseca svibnja i kolovoza (kad je zabilježena i najveća koncentracija pigmenta), dok tijekom ostalih mjeseci istraživanja (travanj, lipanj, kolovoz, rujna) poklapanja nisu vidljiva (slika 21b), ali je u ovom jezeru utvrđena statistička veza između ovih dviju varijabli. Kod nekih mjeseci nisu vidljiva poklapanja iz razloga što je pigment fukoksantin prisutan u još nekim fitoplanktonskim skupinama kao što su Chrysophyceae, Prymnesiophyceae i Xantophyceae (Viličić 2002; Yanpei i sur. 2017) te postoji mogućnost da je u mjesecima kada nisu vidljiva poklapanja između zastupljenosti dijatomeja i koncentracije fukoksantina, zapravo veća zastupljenost ostalih skupina koje sadržavaju fukoksantin što bi daljnjim istraživanjima trebalo dokazati. Naša pretpostavka je zapravo i bila da će jedna od dominantnih fitoplanktonskih skupina u istraživanim jezerima biti i skupina Chrysophyceae te je velika vjerojatnost da se HPLC metodom ona i detektirala, no mikroskopijom nije dokazana prisutnost ove skupine u ovim jezerima.

U Vranskom jezeru kod Biograda, fitoplanktonske skupine Charophyceae (harofita) i Chlorophyta (zelene alge) bile su najviše zastupljene tijekom proljetnih mjeseci (u travnju i

svibnju), dok su ove skupine u Vranskom jezeru na Cresu bile zastupljene tijekom kasnih ljetnih mjeseci (u kolovozu i rujnu). Charophyceae (harofita) su uobičajena fitoplanktonska skupina u litoralnim zonama različitih vodenih ekosustava različitih dubina (Kufel i Kufel 2002). Smatraju se vrlo efikasnom fitoplanktonskom skupinom svih slatkovodnih ekosustava jer smanjuju zamućenost, pružaju utočište zooplanktonu te su izvor hrane za mnoge životinje (Blindow i sur. 2002; Liu i sur. 2014; Søndergaard i sur. 2007). Chlorophyta (zelene alge) su zbog svoje fotosintetske aktivnosti jedne od najvažnijih proizvođača u slatkovodnim ekosustavima te su ujedno i glavni izvor kisika kao nusprodukta fotosinteze dok neke od njih tvore simbiotske odnose s drugim skupinama organizama (De Clerck i sur. 2012). Zastupljenost ovih skupina dokazana je i pigmentom luteinom koji je glavni dijagnostički pigment za ove skupine (Not i sur. 2015; Schagerl i Pichler 2000). U Vranskom jezeru kod Biograda, poklapanja između fitoplanktonskih skupina Charophyceae i Chlorophyta te pigmenta luteina vidljiva su samo tijekom proljetnih mjeseci (u travnju i svibnju), a u tom jezeru je također utvrđena negativna korelacija između ovih dviju varijabli. U Vranskom jezeru na Cresu, poklapanja su vidljiva tijekom kasnih ljetnih mjeseci (u kolovozu i rujnu) za obje skupine te tijekom proljetnih mjeseci (u travnju i svibnju) za Chlorophyta, dok u ostalim mjesecima nisu vidljiva opažanja, no u ovom jezeru je utvrđena statistička veza između ovih dviju varijabli. Poklapanja nisu vidljiva u svim mjesecima zato što je i pigment lutein kao i pigment fukoksantin prisutan u još nekim fitoplanktonskim skupinama kao što su Rhodophyceae, Chrysophyceae i Prasinophyceae (Viličić 2002; Yanpei i sur. 2017) te postoji mogućnost da je u mjesecima kada nisu vidljiva poklapanja između zastupljenosti Charophyta i Chlorophyta s pigmentom luteinom, zapravo veća zastupljenost ostalih skupina što bi daljnim istraživanjima također trebalo dokazati.

Vremenska raspodjela fitoplanktona usko je povezana s uvjetima okoline u kojima se fitoplankton nalazi kao što su primjerice dostupnost hranjivih tvari te intenzitet svjetlosti (Buzančić i sur. 2016) pa samim time varira i koncentracija pigmenta u stanicama fitoplanktona (Morovičić i sur. 2012).

Predstavnici skupine Dinoflagellata (svjetleći bičaći) imaju dominantnu ulogu u sastavu fitoplanktonske zajednice u ova dva istraživana jezera (Tomec i sur. 2009), a često su dominantne fitoplanktonske skupine u oligotrofnim jezerima s obzirom na biomasu (Buchaca i sur. 2005). Iako su i u ovom istraživanju mikroskopijom utvrđena kao jedna od dominantnih fitoplanktonskih skupina, u ovom istraživanju nisu praćeni HPLC metodom jer nije mjeren pigment peridinin, glavni

dijagnostički pigment za ovu fitoplanktonsku skupinu (Yanpei i sur. 2017), što bi u budućim istraživanjima ovih jezera trebalo uvrstiti u analize za dobivanje točnijeg uvida u sastav zajednice korištenjem HPLC metode.

Za vrijeme ovog istraživanja zabilježen je i značajan razvoj skupine Cyanophyceae (cijanobakterije). Cyanophyceae se tijekom ljetnih mjeseci mogu pojaviti s većom biomasom u jezerima zbog velikih temperatura (Schmidt 1995). Ova skupina također nije praćena HPLC metodom i u buduću bi trebala biti uključena kroz praćenje karakterističnih pigmenata kao što su zeaksantin, alofikocijanin te fikocijanin (Viličić 2002; Tundisi i sur. 2015) za dobivanje potpune analize fitoplanktona u istraživanim jezerima.

U ovom istraživanju HPLC metodom mjeren je i pigment  $\beta$ -karoten, pigment kojega sadržavaju mnoge fitoplanktonske skupine (Takaichi 2011). Upravo iz tog razloga prikazan je odnos ovog pigmenta s ukupnom biomasom fitoplanktona te je u oba jezera utvrđena statistička veza između ovih dviju varijabli. Poklapanja između koncentracije  $\beta$ -karotena i ukupne biomase fitoplanktona su vidljiva tijekom većine mjeseca istraživanja, osim u travnju i svibnju kod Biograda i rujnu na Cresu kada su zabilježene veće koncentracije pigmenta  $\beta$ -karotena.  $\beta$ -karoten je osim u stanicama fitoplanktona prisutan i u biljnim stanicama (Swapnil i sur. 2021) te je vjerojatno u tim mjesecima u kojima nisu bila vidljiva poklapanja bio prisutan u biljkama koje su se nalazile u vodi.  $\beta$ -karoten se nije pokazao kao dobar dijagnostički pigment iz razloga što je prisutan među gotovo svim fotosintetskim skupinama te ne pruža detaljniji uvid u strukturu fitoplanktonske zajednice.

Sastav i biomasa fitoplanktonskih zajednica se često određuju mikroskopijom, no ova metoda je dugotrajan proces. Kemotaksonomska procjena fitoplanktonske zajednice na temelju HPLC analize pigmenata se danas široko primjenjuje za proučavanje strukture fitoplanktonskih zajednica na širim prostornim i vremenskim razinama i iako još nije dovoljno razvijena, ova metoda se u posljednje vrijeme sve češće koristi i za procjenu fitoplanktonskih zajednica u slatkovodnim ekosustavima (Xiaoging i sur. 2020). Iako bi se s istraživanjima trebalo nastaviti (primjerice mjeriti pigmente koji će pokrivati sve dominantne skupine kao što su diadinoksantin, neoksantin, peridinin, diatoksantin, violaksantin, zeaksantin (Yanpei i sur. 2017)) u ovom istraživanju HPLC metoda se pokazala kao pouzdan i brz alat koji se može koristiti za brza istraživanja fitoplanktonskih zajednica te se može koristiti kao dodatan alternativni alat uz mikroskopiju za istraživanje slatkovodnih ekosustava Vranskog jezera kod Biograda i Vranskog jezera na Cresu.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC metodom) u Vranskom jezeru kod Biograda i Vranskom jezeru na Cresu u sukcesivnom razdoblju od travnja do rujna 2019. godine izmjerene su koncentracije fotosintetskih pigmenata  $\beta$ -karotena, fukoksantina i luteina.
2. Prema sastavu fotosintetskih pigmenata, određene su dominantne fitoplanktonske skupine Diatomeae, Charophyceae i Chlorophyta u dva prirodna krška jezera u sukcesivnom razdoblju od 6 mjeseci.
3. Usporedbom rezultata dobivenih metodom HPLC i standardnom mikroskopijom, u oba jezera dokazana je prisutnost skupina Diatomeae i Chlorophyta kao dominantnih skupina, dok se ostali rezultati nisu poklapali zbog čega naša hipoteza nije u potpunosti prihvaćena te bi se u budućim istraživanjima trebali mjeriti još neki karakteristični dijagnostički pigmenti kako bi se dokazala prisutnost ostalih skupina utvrđenih mikroskopijom.
4. Dinamika fotosintetskih pigmenata u istraživanom razdoblju (od travnja do rujna 2019. godine) pokazala se kao dobra dopunska metoda za praćenje sukcesije fitoplanktonskih zajednica s obzirom da su nam omogućili detaljniji uvid u njihovu strukturu za razliku od ukupne biomase.
5. Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti pokazala se kao brz i pouzdan alat koji, uz mikroskopiju, može poslužiti za brza istraživanja fitoplanktonskih zajednica u slatkovodnim ekosustavima.

## 7. LITERATURA

1. Abonyi A., Ács É., Borics G., Hidas A., Grigorszky I., Kiss K. T., Várбірó G. (2018): Functional diversity of phytoplankton highlights long-term gradual regime shift in the middle section of the Danube River due to global warming, human impacts and oligotrophication. *Freshwater Biology*. 63: 456-472.
2. Adl S. M., Agatha S., Bass D., Berney C., Brown M. W., Burki F., Campo J., Cardenas P., Čepička I., Dunthorn M. L., Edvardsen B., Eglit Y., Guillou L., Hampl V., Heiss A. A., Hoppenrath M., James T. Y., Karnkowska A., Korpov S., Kim E., Kolisko M., Kudryavtsev A., Lahr D. J. G., Lane C. E., Lara E., Lukeš J., Lynn D. H., Mann C. L., Massana R., Mitchell E. A. D., Morrow C., Park J. S., Pawlowski J. W., Powell M. J., Richter D. J., Rueckert Schoch C. L., Shadwick L., Shimano S., Smirnov A., Spiegel F. W., Torruella G., Youssef N., Zlatogursky V., Zhang Q. (2019): Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 66: 4-119.
3. Aktan Y., Aykulu G., Tüfekçi H., Tüfekçi V. (2005): Distribution patterns, biomass estimates and diversity of phytoplankton in Izmit Bay (Turkey). *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 64: 372-384.
4. Ariyadej C., Angsupanich S., Tansakul P., Tansakul R. (2004): Phytoplankton diversity and its relationships to the physico-chemical environment in the Banglang Reservoir. Yala Province. *J. Sci. Technol.* 26: 595-607.
5. Bellinger E. G., Sigeo D. C. (2010): Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. *Journal of Phycology*. 47: 436-438.
6. Blindow I., Hargeby A., Andersson G. (2002): Seasonal changes of mechanisms maintaining clear water in a shallow lake with abundant *Chara* vegetation. *Aquat. Bot.* 72: 315-334
7. Bogner A. (2020): Upotreba HPLC metode u analizama mozgova guštera. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
8. Bosak S., Gligora Udovič M., Sarno D. (2015): Morphological study of *Chaetoceros wighamii* Brightwell (Chaetocerotaceae, Bacillariophyta) from Lake Vrana, Croatia. *Acta Bot. Croat.* 74: 233-244.
9. Brewin R. J. W., Morán X. A. G., Raitsos D. E., Gittings J. A., Calleja M. L., Viegas M., Ansari M. I., Otaibi N. A., Huete-Stauffer T. M., Hoteit I. (2019): Factors Regulating the Relationship

- Between Total and Size-Fractionated Chlorophyll-*a* in Coastal Waters of the Red Sea. *Frontiers in Microbiology*. 10.
10. Britton G. (1983): *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge University Press, Cambridge.
  11. Brotas V., Plante Cuny M. R. (1998): Spatial and temporal patterns of microphytobenthic taxa of estuarine tidal flats in the Tagus estuary (Portugal) using pigment analysis by HPLC. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 171: 43-57.
  12. Brown A. L. (1971): *Ecology of fresh water*. Heinmann Educational Books Ltd, London.
  13. Buchaca T., Felip M., Catalan J. (2005): A comparison of HPLC pigment analyses and biovolume estimates of phytoplankton groups in an oligotrophic lake. *Journal of Plankton Research*. 27: 91-101.
  14. Buzančić M. Ž., Ninčević Gladan I., Marasović G., Kušpilić A., Grbec B. (2016): Eutrophication influence on phytoplankton community composition in three bays on the eastern Adriatic coast. *Oceanologia*. 58: 302-316.
  15. Cloern J. E., Jassby A. D. (2010): Patterns and scales of phytoplankton variability in estuarine-coastal ecosystems. *Estuar. Coast*. 33: 230-241.
  16. Damijanjević L. (2022): Hidrogeografska obilježja Vranskog jezera na Cresu. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
  17. De Clerck O., Bogaert K. A., Leliart F. (2012): Diversity and Evolution of Algae. *Advances in Botanical Research*. 64: 55-86.
  18. Diretti G., Tavazza R., Welsch R., Pizzichini D., Mourgues F., Papacchioli V., Beyer P., Giuliano G. (2006) *Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of cyclopene epsilon cyclase*. *BMC Plant Biology*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/6/13> (pristupljeno 27.2.2023.)
  19. Džambić D. (2019): Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija, Osijek.
  20. Finkel Z. V., Beardall J., Flynn K. J., Quigg A., Rees T. A. V., Raven J. A. (2010): Phytoplankton in a changing world: Cell size and elemental stoichiometry. *J. Plankton Res.* 32: 119-137.
  21. Gasse F., Talling J. F., Kilham P. (1983): Diatoms assemblages in East Africa: classification, distribution and ecology. *Rev. Hydrobiol. Trop.* 16: 3-34.

22. Giovanardi F., Francé J., Mozetič P., Precali R. (2018): Development of ecological classification criteria for the Biological Quality Element phytoplankton for Adriatic and Tyrrhenian coastal waters by means of chlorophyll *a* (2000/60/EC WFD). *Ecological Indicators*, 93: 316-332.
23. Graham L. E., Wilcox L. W. (2009): *Algae* (Second Edition). U: Wilbur B (ur.), Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, str. 486-546.
24. Grossman A., Schaefer M., Chiang G., Collier J. (1993): Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*. 175: 575-582.
25. Henle K., Scholz M., Dziock S., Stab S., Foeckler F. (2006): Bioindication and functional response in floodplain systems: Where to from here? *International Review of Hydrobiology*. 91: 380-387.
26. Hoagland K. D., Roemer S. C., Rosowski J. R. (1982): Colonization and community structure of two periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (Bacillariophyceae). *Am J Bot.* 69: 188-213.
27. Jeffrey S. W., Mantoura R. F. C., Bjørnland T. (1997): Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. In *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO: Paris, French.
28. Knežević N. (2020): Utjecaj fizikalno-kemijskih čimbenika na zajednice makrozoobentosa u Vranskom jezeru kod Biograda n/m. Diplomski rad, Sveučilište u Zadru, Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu, Zadar.
29. Koletić N. (2011): *Alge u biotehnologiji*. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
30. Kramer S. J., Siegel D. A. (2019): How can phytoplankton pigments be best used to characterize Surface Ocean Phytoplankton for ocean remote sensing Algorithm. *Journal of Geophysical Research: Oceans*. 24: 11.
31. Kufel L., Kufel I. (2002): Chara beds acting as nutrient sinks in shallow lakes e a review. *Aquat. Bot.* 72: 249-260.
32. Lampert W., Sommer U. (2007): *Limnoecology*. Oxford University Press Inc., New York, 324.
33. Lepeduš H., Cesar V. (2010): *Osnove biljne histologije i anatomije vegetativnih organa*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek, 12: 107.
34. Lichtenthaler H. K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148: 350-382.

35. Liu G., Liu Z., Gu B., Smoak J. M., Zhang Z. (2014): How important are trophic state, macrophyte and fish population effects on cladoceran community? A study in Lake Erhai. *Hydrobiologia*. 736: 189-204.
36. Madhu N. V., Jyothibabu R., Balachandran K. K. (2010): Monsoon induced changes in the size fractionated phytoplankton biomass and production rate in the estuarine and coastal waters of southwest coast of India. *Environ. Monit. Assess.* 166: 21-528.
37. Makarevich P., Vodopianova V., Bulavina A., Kalinka O. (2020): Influence of the Barents Sea Frontal Zones on Chlorophyll Concentration in Spring. *KnE Life Sciences*. 536-546.
38. Marlian N., Damar A., Effendi H. (2015): The horizontal Distribution Chlorophyll-a Fitoplankton as Indicator of the Tropic State in Waters of Meulaboh Bay. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 20(3): 272-279.
39. Martin G. D., Muraleedharan K. R., Vijay J. G., Rejomon G., Madhu N. V., Shivaprasad A. (2010): Formation of anoxia and denitrification in the bottom waters of a tropical estuary. Southwest coast of India. *Biogeosci. Discuss.* 7: 1751-1782.
40. Maslukah L., Yuliratno Setiawan R., Nurdin N., Helmi M., Widiaratih R. (2022): Phytoplankton Chlorophyll-a Biomass and the Relationship with Water quality in Barrang Caddi. *Ecological and Engineering and Environmentak Technology*. 23(1): 25-33.
41. Morovičić M., Flander Putrle V., Lučić D., Grbec B., Gangai B., Malej A., Matić F. (2012): Signatures of pigments and processes in the south Adriatic Pit- project MEDUZA. *Acta Adriat.* 53(2): 303-322.
42. Naik R. K., Anil A. C., Narale D. D., Chitari R. R., Kulkarni V. V. (2011): Primary description of surface water phytoplankton pigment patterns in the Bay of Bengal. *J. Sea. Res.* 65: 435-441.
43. Narasimha R. K. (2013): Physico-chemical factors influenced Plankton biodiversity and fish Abundance-a case study of nagaram tank of Warangal, Andhra Pradesh. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2: 248-260.
44. Not F., Massana R., Latasa M. (2005): Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas. *Limnology and Oceanography*. 50(5): 1677-1686.
45. Parmar A., Singh N., Kaushal A., Sonawala S., Madamwar D. (2011): Purification, characterization and comparison of phycoerythrins from three different marine cyanobacterial cultures. *Bioresource Technology*. 102: 1795-1802.



46. Pevalek-Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja. Profil, Zagreb.
47. Pierson D. C., Samal N. R., Owens E. M., Schneidermann E. M., Zion M. S. (2013): Changes in the timing of snowmelt and the seasonality of nutrient loading: Can models simulate the impacts on freshwater trophic status? *Hydrological Processes*. 27(21): 3083-3093.
48. Pingree R. D., Holligan P. M., Mardell G. T., Head R. N. (1976): The influence of physical stability on spring, summer and autumn phytoplankton blooms in the Celtic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 56(4): 845.
49. Pniewski F., Sylwestrzak Z. (2018): Influence of short periods of increased water temperature on species composition and photosynthetic activity in the Baltic periphyton communities. *Biologia*.
50. Poddar S., Chacko N., Swain D. (2019): Estimation of chlorophyll-a in northern coastal bay of Bengal using landsat-8 OLI and sentinel-2 MSI sensors. *Mar. Sci.* 6(598): 1-11.
51. Popić Z. (2011): Utjecaj svjetlosti na vertikalnu distribuciju fitoplanktona Sakadaškog jezera. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek.
52. Porcar-Castell A., Malenovsky Z., Magney T., Van Wittenberghe S., Fernandez-Marin B., Maignan F., Zhang Y., Maseyk K., Atherton J., Albert L. P., Robson T. M., Zhao F., Plazaola J. I. G., Ensminger I., Rajewicz P. A., Grebe S., Tikkanen M., Kellner J. R., Ihalainen J. A., Rascher U., Logan B. (2021): Chlorophyll *a* fluorescence illuminates a path connecting plant molecular biology to Earth-system science. *Nature Plants*. 7: 998-1009.
53. Primc B., Špoljar M., Miliša M., Sertić Perić M. (2008): The Effect of Plankton Activity on the stratification of Dissolved Oxygen and Orthophosphates in a Karstic Lake in the Mediterranean Coastal Area. U: Sengupta M., Dalwani R. (ur.). *Proceedings of Taal 2007: The 12th World Lake Conference*, 2169-2172.
54. Reynolds C. S. (2006): *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.
55. Roy B., Choudhury H., Das A., Kumar Das A., Kumar Pal T. (2011): Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine ulifloxacin, the active metabolite of prulifloxacin in rat and rabbit plasma: application to toxicokinetic study. *Biomedical Chromatography*. 25(8): 890-901.
56. Sala O. E., Chapin F. S., Armesto J. J., Berlow E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber Sanwald E., Huenneke L. F., Jackson R. B., Kinzig A., Leemans R., Lodge D. M., Mooney H. A.,

- Oesterheld M., Poff N. L. R., Sykes M. T., Walker B. H., Walker M., Wall D. H. (2000): Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*. 287: 1770-1774.
57. Schagerl M., Pichler C. (2000): Pigment composition of freshwater Charophyceae. *Aquatic Botany*. 67(2): 117-129.
58. Schlüter L., Møhlenberg F., Havskum H., Larsen S. (2000): The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: Testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 192: 49-63.
59. Schmidt H., Stich H. B. (1995): HPLC analysis of algal pigments: comparison of columns, column properties and eluents. *J Appl Phycol* 7: 487-494.
60. Sieburth J., Smetacek V., Lenz J. (1978): Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23: 1256-1263.
61. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. (1999): *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, Zagreb.
62. Søndergaard M., Jeppesen E., Lauridsen T. L., Skov C., Van Nes E. H., Roijackers R., Lammens E., Portielje R. (2007): Lake restoration: successes, failures and longterm effects. *J. Appl. Ecol.* 44: 1095-1105.
63. Sommer U. (1989): Toward a Darwinian Ecology of Plankton. *Plankton ecology*. 1-8.
64. Ston Egiert J., Lotocka M., Ostrowska M., Kosakowska A. (2010): The influence of biotic factors on phytoplankton pigment composition and resources in Baltic ecosystems: new analytical results. *Oceanologia*. 101-125.
65. Ston J., Kosakowska A. (2000): Qualitative and quantitative analysis of Baltic phytoplankton pigments. *Oceanologia*. 42: 449-471.
66. Stražičić N. (1985): Vransko jezero na Cresu-golema prirodna šterna. *Priroda*. 73: 6.
67. Suresh Kumar K., Kumari S., Singh K., Kushwaha P. (2021): Influence of Seasonal Variation and Chemical Composition and Nutritional Profiles of Macro- and Microalgae. University of Allahabad, India.
68. Suske W., Mountford O., Prtenjača I., Katalinić A., Pintur G., Rogić D., Čuže M., Zubak I. (2010): Plan upravljanja Parkom prirode Vransko jezero. Javna ustanova Parka prirode Vransko jezero, Biograd.

69. Swapnil P., Meena M., Singh S. K., Dhuldhaj U. P., Harish Marwal A. (2021): Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. *Current Plant Biology*. 26.
70. Takaichi S. (2011): Carotenoids in Algae: Distributions, Biosynthesis and Functions. *Mar. Drugs*. 9(6): 1101-1118.
71. Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 5: 164-194.
72. Tomec M., Teskeredžić E., Teskeredžić Z. (2009): Dinamika fitoplanktona u jezeru Vrana (otok Cres). 67(3): 101-112.
73. Totti C., Civitarese G., Acri F., Barletta D., Candelari G., Paschini E., Solazzi A. (2018): Seasonal variability of phytoplankton populations in the middle Adriatic sub-basin. *Journal of Plankton Research*. 22(9): 1735-1756.
74. Tundisi J. G., Matsumura-Tundisi T., Tundisi J. E. M., Blanco F. P., Abe D. S., Contri Campanelli L., Sidagis Galli G., Siva V. T., Lima C. P. P. (2015): A bloom of cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in UHE Carlos Botelho (Lobo/Broa) reservoir: a consequence of global change? *Braz. J. Biol.* 75(2): 507-508.
75. Udovičić M., Baždarić K., Bilić-Zulle L., Petrovečki M. (2007): Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? *Biochemia Medica*. 17: 1-138.
76. Van Heukelem L., Thomas C. (2001): Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography A*. 910: 31-49.
77. Vernès L., Granvillain P., Chemat F., Vian M. (2015): Phycocyanin from *Arthrospora platensis* Production, Extraction and Analysis. *Current Biotechnology*. 4(4): 481-491.
78. Viličić D. (2002): *Fitoplankton Jadranskog mora. Biologija i taksonomija. Školska knjiga, Zagreb.*
79. Viličić D. (2003): *Fitoplankton u ekološkom sustavu mora. Školska knjiga, Zagreb.*
80. Wang L. J., Fan Y., Parsons R. L., Hu G. R., Zhang P. Y., Li F. L. (2018): A Rapid Method for the Determination of Fucoxanthin in Diatom. *Mar. Drugs*. 16(1): 33.
81. Willows R. D. (2004): *Chlorophylls*. U: Davies K. (ur.) *Plant Pigments and their Manipulation*. Oxford, Blackwell Publishing, str. 23-56.
82. Wright S. W., Jeffrey S. W. (2006): *Pigment Markers for Phytoplankton Production Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.

83. Zapata M., Rodríguez F., Garrido J. L. (2000): Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: A new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195: 29-45.
84. Yanpei Z., Jin H., Gu F., Zhang Y., Bai Y., Ji Z., Chen J. (2017): Composition of algal pigments in surface freshen layer after ice melt in the central Arctic. *Acta Oceanologica Sinica.* 36(8): 122-130.
85. Xiaoging Y., Yang J. R., Chen J., Isabwe A., Yang J. (2020): On the use of chemotaxonomy, a phytoplankton identification and quantification method based on pigment for quick surveys of subtropical reservoirs. *Environmental Science and Pollution Research.* 28: 3544-3577.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 02.11.1998. godine u Beču. Osnovnu školu završila sam u Murskom Središću, a srednjoškolsko obrazovanje nastavila u Čakovcu gdje sam 2017. godine završila opći smjer u Gimnaziji Josipa Slavenskog Čakovec. Iste godine upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski nastavnički studij Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studijskog obrazovanja aktivno sam sudjelovala u izvedbi popularno-znanstvene manifestacije „Otvoreni dan Kemije“ 2018. i 2019. godine koja je dio cjelodnevnog događanja „Dan i noć na PMF-u“. Tijekom 2018., 2019. i 2020. godine bila sam član studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva „Znanstvene čarolije“ u sklopu koje sam održavala radionice u dječjim vrtićima i školama. Na zadnjoj godini sam volontirala u sklopu projekta „Mobilni ZEZ“ centar čiji je cilj popularizacija znanosti u školama diljem Hrvatske.

Tijekom završne godine studija odradila sam metodičku praksu iz biologije u XV. gimnaziji u Zagrebu i metodičku praksu iz kemije u Osnovnoj školi Rudeš gdje sam stekla iskustvo rada s učenicima. Akademske godine 2021./2022. zaposlila sam se kao učiteljica biologije, kemije i prirode u III. osnovnoj školi u Varaždinu.