

# Životne strategije morskih dijatomeja u uvjetima ograničenoga fosfora

---

**Kužat, Nataša**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2021**

*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:217:629267>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-27**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Geološki odsjek

Nataša Kužat

**ŽIVOTNE STRATEGIJE MORSKIH  
DIJATOMEJA U UVJETIMA  
OGRANIČENOGA FOSFORA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Geološki odsjek

Nataša Kužat

**ŽIVOTNE STRATEGIJE MORSKIH  
DIJATOMEJA U UVJETIMA  
OGRANIČENOGA FOSFORA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

dr. sc. Martin Pfannkuchen

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Department of Geology

Nataša Kužat

**MARINE DIATOM LIFE STRATEGIES  
UNDER PHOSPHORUS LIMITED  
CONDITIONS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Martin Pfannkuchen, PhD

Zagreb, 2021.

Ovaj doktorski rad izrađen je u sklopu doktorskog studija iz Oceanologije, na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, u Laboratoriju za evolucijsku ekologiju Centra za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. rer. nat. Martina Pfannkuchena, višeg znanstvenog suradnika. Istraživanje je provedeno u sklopu projekta „Životne strategije fitoplanktona u sjevernom Jadranu“ financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2014-09-6563), voditelj projekta dr. rer. nat. Martin Pfannkuchen.

## ZAHVALE

*U prvom redu želim se zahvaliti cijelom svom Laboratoriju za evolucijsku ekologiju. Zahvaljujem vam se na svim savjetima, pomoći i vodstvu kroz ovu avanturu zvanu „doktorat“. Svi ste me od početka smatrali dijelom tima i zajedničkim doktorandom i svi ste mi na svoj način bili mentori i pomogli mi pri izradi ove doktorske disertacije ali ono najvažnije, sve vas od početka smatram svojim kolegama i prijateljima i neizmjereno sam vam zahvalna na tome! Hvala vam svima što ste od početka vjerovali u mene i gurali me kada je to bilo potrebno!*

*Zahvaljujem se svom mentoru dr. rer. nat. Martinu Pfannkuchenu, voditelju Laboratorija za evolucijsku ekologiju i Predstojniku Centra za istraživanje mora, na pruženoj prilici da u sklopu njegovog projekta nastavim raditi posao u koji sam se zaljubila dvije godine prije početka samog doktorata. Želim mu se zahvaliti na vodstvu, uloženom vremenu, neizmjernom strpljenju, brojnim pruženim prilikama za usavšavanje i svim brojnim savjetima čiji je glavni cilj bio učiniti me boljom znanstvenicom.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Danieli Marić Pfannkuchen koja me je uvela u ovaj predivan svijet fitoplanktona. Koji sam od početka zvala svojom „neslužbenom mentoricom“, koja mi je posvetila brojne sate svog vremena kako bi mi prenijela svo svoje znanje, a to čini i dalje.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Mirti Smodlaki Tanković na brojnim savjetima, pomoći i vodstvu u vođenju eksperimenata i obradi podataka. Koja mi je nebrojeno puta pomogla kada bi zapela u provođenju eksperimenata i uskakala kad god mi je bilo potrebno.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Ani Baričević na brojnim savjetima i pomoći prvenstveno oko interpretacije molekularnih podataka ali i svemu ostalom.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Ingrid Ivančić na brojnim savjetima i pomoći vezanoj za sve što se ticalo enzima alkalne fosfataze te na ispravljanju i savjetima koji su doprinijeli poboljšanju kvalitete ovog rada..*

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Zrinki Ljubešić na ispravljanju i brojnim savjetima koji su doprinijeli poboljšanju kvalitete ovog rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Romini Kraus što mi je dala priliku da radim posao za koji sam se školovala.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Blaženki Gašparović na suradnji i podršci.*

*Zahvaljujem se ostatku svog tima, starim i novim kolegama i kolegicama: Victoru Stingi Peruscu, Denisu Škalicu, Mariji Fornazar, Ivanu Vlašičeku, Lani Grižančić, Moniki*

*Barač i Miji Knjaz na društvu, kolegijalnosti i prije svega što ste mi ovo razdoblje učinili zabavnijim i lakšim. Hvala vam što ste mi uskakali kada mi je to bilo najpotrebnije.*

*Zahvaljujem se i dr. sc. Maji Levak Zorinc, dr. sc. Anamariji Koldi, Andrei Budiši, Ivani Hazdovac i svim ostalim kolegama, kolegicama i prijateljima na razmjeni informacija, savjetima, smijehu, društvu i svemu ostalom što mi je ovo razdoblje učinilo ljepšim i lakšim. Gospođi Mariji Cindro na strpljenju i pomoći u trenucima kada sam imala tisuću pitanja, zahtjeva i molbi.*

*Za kraj se želim zahvaliti svim svojim prijateljima i obitelji koji su od početka vjerovali u mene, bodrili me, gurali i strpljivo slušali. Martini Ciceran Butković i Tei Rosandić na podršci i prijateljstvu od prve godine fakulteta, Tei također hvala što me je primila u svoj dom kad god sam trebala smještaj prilikom odlazaka na predavanja u Splitu, Kseniji Matošović koja me je primila u svoj dom kada sam odlazila na predavanja u Zagrebu, Vukićima koji su mi druga obitelj (Suki hvala ti što si trpila moju malu noćnu „muziku“ ;)), mojoj Sari Braičić koja mi je od početka podrška, glavni navijač i koja uvijek zna što treba reći kada mi je to najpotrebnije, Ireni Babić koja mi je bila podrška od prvog dana preseljenja u Rovinj, Brani Vujčiću koji me je potaknuo da uopće počnem razmišljati o doktoratu kao opciji, doc. dr. sc. Zoranu Zoriću na savjetima i vjeri da ja to mogu. Također želim zahvaliti i Božajićima, Kneževićima, Zorićima, Čelićima, Vujčićima i Lušićima, Mirjani i Vlatki Basioli, Saši Braičiću koji su mi cijelo vrijeme bili podrška i pozitivna energija.*

*I naravno, mami Dragani, tati Željku, sestri Anji, mom Luki, nećakinji Lani i baki Olik. Riječ „hvala“ je preslaba riječ. Nema tih riječi koje mogu opisati količinu podrške i vaše vjere u mene. Hvala vam na neizmjernom strpljenju, na satima i satima razgovora, na svim savjetima i riječima podrške, bez vas nebi bila tu gdje jesam. Iz tog razloga, ovaj doktorat posvećujem vama, najbitnijim ljudima u mom životu!!!*

## ŽIVOTNE STRATEGIJE MORSKIH DIJATOMEJA U UVJETIMA OGRANIČENOGA FOSFORA

NATAŠA KUŽAT

Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković

Sjeverni Jadran je zatvoren i plitki ekosustav karakteriziran brojnim prostornim i vremenskim ekološkim gradijentima poput temperature, saliniteta i hranjivih soli. Ovakvi uvjeti nam omogućuju praćenje prilagodbi fitoplanktonskih organizama, posebno dijatomeja koje uvelike dominiraju fitoplanktonskom zajednicom istraživnog područja. Rast fitoplanktona, a samim tim i dijatomeja u sjevernom Jadranu kontroliran je dostupnom svjetlošću, temperaturom i hranjivim solima (uglavnom fosforom), čija dostupnost ovisi o dotoku rijeke Po. Kako bi razumjeli strategije koje dijatomeje koriste pri nadmetanju za resurse, u ovom doktoratu provedeno je osam eksperimenata *in vitro* na devet vrsta dijatomeja (*Leptocylindrus aporus*, *Leptocylindrus hargravesii*, *Chaetoceros decipiens*, *Chaetoceros peruvianus*, *Skeletonema grevillei*, *Thalassionema frauenfeldii*, *Thalassionema cf. nitzschioides*, *Pseudo-nitzschia delicatissima* i *Pseudo-nitzschia calliantha*). Eksperimentalna mjerenja obuhvatila su analize promjene brzine rasta pojedine vrste pri različitim koncentracijama fosfora, brzine unosa fosfata, podatke o aktivnosti, lokalizaciji i načinima aktivacije enzima alkalne fosfataze (AP) te morfološke prilagodbe pojedine vrste na stres fosforom. Ciljevi ovog istraživanja su karakterizirati prilagodbe odabranih vrsta dijatomeja sjevernog Jadrana na prostorno-vremenske promjene koncentracija fosfora u ekosustavu, opisati pojedine strategije vrsta u uvjetima limitacije fosforom te korištenje tih strategija u nadmetanju za resurse unutar prirodnih fitoplanktonskih zajednica. Podaci dobiveni eksperimentalnim mjerenjima uspoređeni su sa dugoročnim promjenama u cilju boljeg razumijevanja dinamike i ekologije određene vrste te njene prilagodbe na klimatske promjene u Sjevernom Jadranu. Dobiveni rezultati pokazuju veliku raznolikost ekoloških niša kod morskih dijatomeja što u konačnici objašnjava veliku bioraznolikost ovog područja.

(137 stranica, 87 slika, 16 tablica, 5 priloga, 164 literaturna navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

**Ključne riječi:** fitoplankton, dijatomeje, alkalna fosfataza, APA, morfologija, klorofil, dinamika rasta, ekologija, Michaelis-menten kinetika

Mentor: dr. rer. nat. Martin Pfannkuchen, viši znanstveni suradnik

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Zrinka Ljubešić  
dr. sc. Daniela Marić Pfannkuchen, viša znanstvena suradnica  
dr. sc. Ingrid Ivančić, viša znanstvena suradnica

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

Rad prihvaćen: 12.11.2021.



## MARINE DIATOM LIFE STRATEGIES UNDER PHOSPHORUS LIMITED CONDITIONS

NATAŠA KUŽAT

Center for marine research, Ruđer Bošković Institute

The northern Adriatic is a highly structured and shallow ecosystem characterized by numerous spatial and temporal ecological gradients such as temperature, salinity and nutrient salts. Such conditions allow us to monitor the adaptations of phytoplankton organisms, especially diatoms, which largely dominate the phytoplankton community of the study area. The growth of phytoplankton, and thus diatoms in the northern Adriatic is controlled by available light, temperature, and nutrient availability (mainly phosphorus), which depends on the Po River. In order to understand the strategies that diatoms use when competing for resources, in this doctoral thesis, eight *in vitro* experiments were performed on nine different diatom species (*Leptocylindrus aporus*, *Leptocylindrus hargravesii*, *Chaetoceros decipiens*, *Chaetoceros peruvianus*, *Skeletonema grevillei*, *Thalassionema frauenfeldii*, *Thalassionema cf. nitzschioides*, *Pseudo-nitzschia delicatissima* and *Pseudo-nitzschia calliantha*). Experimental measurements included analyzes of changes in the growth rate of each species at different orthophosphate concentrations, phosphate uptake rate, data on activity, localization and activation of alkaline phosphatase (AP) enzymes, and morphological adaptations of each species to phosphorus stress. The objectives of this study are to characterize the adaptations of selected diatom species from the northern Adriatic to spatio-temporal changes in phosphorus concentrations in the ecosystem, to describe individual species strategies in phosphorus limitation conditions and use these strategies to compete for resources within natural phytoplankton communities. The data obtained by experimental measurements were compared with long-term changes in order to better understand the dynamics and ecology of a particular species and its adaptation to climate change in the North Adriatic. The obtained results show a great diversity of ecological niches in marine diatoms, which ultimately explains the great biodiversity of this area.

(137 pages, 87 figures, 16 tables, 5 attachments, 164 references, original in Croatian)

**Keywords:** phytoplankton, diatoms, alkaline phosphatase, APA, morphology, chlorophyll, growth dynamics, ecology, Michaelis-menten kinetics

Supervisor: dr. rer. nat. Martin Pfannkuchen, Senior Research Associate

Reviewers: dr. sc. Zrinka Ljubešić, Associate Professor

dr. sc. Daniela Marić Pfannkuchen, Senior Research Associate

dr. sc. Ingrid Ivančić, Senior Research Associate

Substitute: dr. sc. Petar Kružić, Associate Professor

Thesis accepted: 12.11.2021.

## I. PROŠIRENI SAŽETAK

Dijatomeje (Bacillariophyceae) su jednostanični autotrofni fotosintetski eukariotski organizmi. U sjevernom Jadranu iznimno su značajne za cjelokupni ekosustav obzirom na činjenicu da dominiraju fitoplanktonskim zajednicom sa preko 500 različitih vrsta od sveukupno oko 800 do sada opisanih fitoplanktonskih vrsta na ovom području (Viličić i sur. 2002). Pronalazimo ih u svim vodenim ekosustavima (kopnenim, slatkovodnim i morskim). Temeljem molekularnih analiza i obzirom na strukturu valvi prema Kooistra i sur. 2007 dijelimo ih na radijalne centrice, multipolarne centrice, arafidne penate i rafidne penate. Radijalne centrice imaju radijalno raspoređene pore od središnje pore prema cingulumu (pojasu), multipolarne centrice također imaju radijalno raspoređene pore ali su stanice izdužene, zvjezdaste ili trokutaste. Arafidne penate u svojoj strukturi nemaju rafu (pukotinu), dok rafidne imaju (Kooistra i sur. 2007). Brojne vrste dijatomeja mogu biti vezane u lance što je jedna od prilagodbi na planktonski način života. Osim ove, razvile su i brojne druge prilagodbe kako bi se prilagodile životu u vodenom stupcu u fotičkoj zoni, kao što su sete i različiti drugi nastavci kojima povećavaju površinu svog tijela kako bi promijenili hidrodinamičke karakteristike svojih stanica.

Svi fitoplanktonski organizmi, pa tako i dijatomeje, za svoj rast i razvoj trebaju makro hranjive soli (ugljik (C), vodik (H), dušik (N), kisik (O), fosfor (P) i sumpor (S)) i hranjive soli u tragovima (molibden (Mo) i galij (Ga) (osobito važan za dijatomeje), željezo (Fe), bakar (Cu), cink (Zn), mangan (Mn) i magnezij (Mg) i brojni drugi). Dijatomeje također trebaju značajne količine silicija (Si) kako bi formirale svoje frustule. Za razliku od bogatih C, H, O i S oceanskih rezervoara, biološki dostupni N i P su prisutni u niskim koncentracijama, što ih čini biolimitirajućim elementima. Proces asimilacije svih hranjivih soli odvija se aktivnim prijelazom iona kroz stanične membrane (tako se naprimjer anorganski fosfor asimilira kao ortofosfat) (Dyhrman i sur. 2012), a njihov unos iznimno je energetska zahtjevan, stoga je djelomično ovisan i o količini svjetlosti. Dijatomeje, kao i svi drugi morski organizmi, iznimno su osjetljive na dostupnost fosfora iz razloga što on utječe na biovolumen stanica, nutritivni status, fotosintetsku efikasnost te druge biokemijske i fiziološke karakteristike stanica. Također utječe i na sastav i brojnost morskih fitoplanktonskih zajednica (Paytan i McLaughlin 2007, Benitez-Nelson 2000). Fosfor u mora primarno dolazi dotokom rijeka s kopna u otopljenom i partikularnom obliku, a nastaje otapanjem minerala iz stijena i tla pri doticaju s atmosferom i vodom te djelovanjem organizama (Benitez-Nelson 2000). Na udaljenim oceanskim područjima iznimno je bitan donos aerosolom, vulkanskim pepelom te mineralnom prašinom (Benitez-Nelson 2000). Zbog antropogenog donosa fosfora često dolazi

do promjena u omjerima N i P te se koncentracije dušika značajno povise u odnosu na koncentraciju fosfora. Ovo dovodi do toga da su brojni morski okoliši postali P limitirani što dokazuju brojne studije (Ivančić i sur. 2021, Barcelos e Ramos i sur. 2017, Powley i sur. 2017, Tyrrell 1999, Harrison i sur. 1990).

Sjeverni Jadran visoko je produktivan, plitki, morski ekosustav koji se odlikuje izraženim prostorno-vremenskim ekološkim gradijentima (Ivančić i sur. 2016, Ivančić i sur. 2012). Produktivnost sjevernog Jadrana određena je brojnim dotocima slatke vode (Smodlaka 1986), a najvažnija je rijeka Po. Zapadno Jadranska Struja (WAC) vodu niskog saliniteta i bogatu hranjivim solima iz sjevernog u južni Jadran duž zapadne obale Jadranskog mora (Zavatarelli i sur. 1998), dok Istočno Jadranska Struja (EAC) donosi vodu visokog saliniteta i siromašnu hranjivim solima iz južnog u sjeverni Jadran duž istočne obale (Giani i sur. 2012). Slijedom toga, formiraju se izraziti prostorno-vremenski ekološki gradijenti te je sjeverni Jadran izvrsno područje za eksperimente o utjecaju fosfora na zajednicu mikrofitoplanktona (Marić Pfannkuchen i sur. 2018, Smodlaka Tanković i sur. 2018a, Ivančić i sur. 2016). Istraživanja sjevernog Jadrana pokazala su da su ponašanje i rast dijatomeja, ali i ostalih fitoplanktonskih organizama uglavnom određeni temperaturom, svjetlošću i sposobnošću vrsta da se nose sa stalno promjenjivom dostupnošću fosfora koja uključuje i vrijeme nedostatka anorganskog fosfora (Marić Pfannkuchen i sur. 2018, Ivančić i sur. 2012). U nedostatku anorganskog fosfora, dijatomeje koriste organski fosfat za preživljavanje. Većina dijatomeja je razvila mehanizme sinteze ekstracelularnih enzima kojima iz organske tvari odcjepljuju formu hranjive soli koju su u mogućnosti asimilirati kroz staničnu membranu. Jedan od enzima je i alkalna fosfataza (AP) koja defosforilira otopljene organske fosforne spojeve poput nukleinskih kiselina i fosfolipida (Price i Morel 1990) što odcijepljene fosfate čini dostupnim stanicama (Hoppe 2003). Fosfor je također važna komponenta u sintezi ključnih molekula kao što su lipidi i nukleinske kiseline, kao i za energetske procese (Yang i sur. 2014, Siron i sur. 1989, Cembella i sur. 1984) te kao strukturna komponenta fosfolipidnih staničnih membrana, pa u nepovoljnim uvjetima brojne dijatomeje na nedostatak anorganskog fosfora reagiraju skladištenjem istog u obliku ortofosfata, polifosfata ili lipida, u trenucima kada ga ima dovoljno, te ga koriste u uvjetima kada nedostaje. Nedostatak fosfora može utjecati i na sintezu pigmenata na način da se ista zaustavlja jer stanice nisu u mogućnosti sintetizirati dovoljno RNA, što rezultira smanjenjem staničnih koncentracija klorofila *a* (Alipanah i sur. 2018, Pan i sur. 1996, Lombardi i Wangersky 1991, Finenko i Krupatkina-Akinina 1974). Nedostatak anorganskog fosfora također može značajno utjecati na brojnost dijatomeja na način da neke vrste naglo povećaju brojnost kako bi imale što veću mogućnost

održanja vrste u nepovoljnom razdoblju dok na druge nedostatak fosfora ne utječe značajno jer imaju neki drugi način prilagodbe na takve uvjete. Zbog svih navedenih prilagodbi, kod nekih vrsta može doći do značajnih promjena u morfologiji stanica, zbog čega potencijalno može doći do krivih zaključaka prilikom opisa novih vrsta, ukoliko nemamo saznanja o tome kako se koja vrsta ponaša u kojim uvjetima.

U ovom doktorskom radu izolirano je devet vrsta dijatomeja (*Leptocylindrus aporus*, *L. hargravesii*, *Chaetoceros decipiens*, *C. peruvianus*, *Skeletonema grevillei*, *Thalassionema frauenfeldii*, *T. cf. nitzschoides*, *Pseudo-nitzschia delicatissima* i *P. calliantha*) iz sjevernog Jadrana. Fiziološki odgovori na ograničenu dostupnost anorganskog fosfora analizirani su za monoklonalne kulture ovih devet vrsta, kako bi objasnili kako su se ovi značajni organizmi prilagodili na uvjete ograničenja fosforom te koje su prilagodbe razvili u tim uvjetima. Napravljena je taksonomska identifikacija odabranih vrsta, svjetlosnim mikroskopom i molekularnim metodama. Provedene su statističke analize podataka iz Baze dugoročnih podataka Centra za istraživanje mora u Rovinju, iz kojih je napravljena prostorna i vremenska rasprostranjenost odabranih vrsta. Stanične kulture odabranih vrsta rasle su u dva različita medija (F/2 i P limit) te su *in vitro* praćene promjene koje su se događale na stanicama tijekom eksperimentalnog razdoblja. Mjereni su parametri dinamike rasta, morfologije stanica, intenziteta fluorescencije klorofila, aktivnosti, kinetike i lokalizacije enzima alkalne fosfataze te koncentracije anorganskog fosfora. Za svaki od navedenih parametara provedena su tri neovisna mjerenja u tri zasebne kulture svakog simuliranog uvjeta.

Prvi cilj ovog dokorskog rada je bio okarakterizirati prilagodbe odabranih vrsta dijatomeja sjevernog Jadrana na prostorno-vremenske promjene koncentracije fosfora u ekosustavu. Postavljena je prva hipoteza, da u *in vitro* uvjetima limitacije fosforom stanice dijatomeja odgovaraju promjenama koje se očituju u brzini rasta, smanjenoj fluorescenciji i broju plastida, aktivacijom enzima alkalne fosfataze te morfološkim promjenama frustule, što može dovesti do toga da morfološke promjene na stanicama mogu izaći iz okvira opisa vrste. Tako su u ovom istraživanju vrste *C. decipiens*, *S. grevillei*, *T. frauenfeldii*, *T. cf. nitzschoides* i *P. calliantha* rasle brže, odnosno imale kraće generacijsko vrijeme u uvjetima ograničenima anorganskim fosforom što ukazuje na način prilagodbe da naglo povećaju svoju brojnost kada se nađu u nepovoljnim uvjetima, dok su vrste *L. aporus*, *L. hargravesii* i *P. delicatissima* brže rasle u uvjetima bogatima svim potrebnim hranjivim solima, što znači da imaju neki drugi oblik prilagodbe na nedostatak anorganskog fosfora. Jedino vrsta *C. peruvianus* nije pokazala značajnu razliku u rastu stanica između dva ispitivana uvjeta, što također ukazuje na drugačiji način prilagodbe na nepovoljne uvjete. Nedostatak fosfata također utječe na sintezu

pigmenata. Tako smo u ovom istraživanju kod vrsta *L. aporus*, *L. hargravesii*, *S. grevillei* i *T. cf. nitzschoides* vidjeli da je intenzitet fluorescencije klorofila tijekom cijelog eksperimentalnog razdoblja bio veći kod stanica koje su rasle u bogatim uvjetima, za razliku od stanica koje su rasle u P limitiranim uvjetima, jedino vrsta *P. calliantha* nije pokazala značajnu razliku u intenzitetu fluorescencije između dva uvjeta. Kod vrsta *L. aporus* i *L. hargravesii* također smo vidjeli da su plastidi općenito bili manji te ih je brojčano bilo manje. Većina vrsta može sintetizirati enzim alkalnu fosfatazu, pa u nedostatku anorganskog koristi organske oblike fosfornih spojeva za nadoknaditi potrebni fosfor u svojim stanicama. I ovo istraživanje je pokazalo da su u uvjetima nedostatka anorganskog fosfora sve vrste prije ili kasnije aktiviraju enzim alkalnu fosfatazu, što dokazuje da imaju mogućnost njegovog sintetiziranja, no on nema iste karakteristike kod svake pojedine vrste. Michaelis-mentenova kinetika pokazala je da je kod nekih vrsta ovaj enzim ima iznimno visoki afinitet i djelotvoran je već pri niskim koncentracija supstrata, kao što su *L. aporus*, *S. grevillei*, *T. frauenfeldii* i vrste roda *Pseudo-nitzschia* koje su imale niske konstante poluzasićenja ( $K_M$  vrijednosti). Dok je kod vrsta *L. hargravesii*, *C. decipiens* i *T. cf. nitzschoides* ovaj enzim sa nešto višim  $K_M$  vrijednostima prilagođen na više koncentracije organskog fosfata. Vrsta *C. peruvianus* jedina je imala jako visoku  $K_M$  vrijednost što je ukazalo na niski afinitet za supstrat i prilagodbu na visoke koncentracije supstrata što može biti razlog zašto ova vrsta gotovo nikad ne postiže veliku brojnost. U prijašnjim je istraživanjima eksperimentalno dokazano da brojne dijatomeje na nedostatak anorganskog fosfora reagiraju skladištenjem istog u obliku ortofosfata, polifosfata ili lipida, u trenutcima kada ga ima dovoljno te ga koriste u uvjetima kada nedostaje ili imaju iznimno učinkovite mehanizme unosa pa nisu primorane sav uneseni fosfor i zadržati u stanici, što je ovim istraživanjem također potvrđeno. Sve istražene vrste su u razdoblju kada je medij u kojem su kulture rasle bio bogat anorganskim fosforom, pokazala značajno povećani stanični unos anorganskog fosfora u fazi prilagodbe na dostupnost hranjivih soli, nakon čega se ta brzina drastično smanjila iz čega smo mogli zaključiti da su sve vrste mogle stvoriti zalihe fosfata te su svoju brojnost povećavale koristeći te zalihe. Zbog svih navedenih prilagodbi, kod nekih vrsta može doći do značajnih promjena u morfologiji stanica, zbog čega potencijalno može doći do krivih zaključaka prilikom taksonomske analize, ukoliko nemamo saznanja o tome kako se koja vrsta ponaša u određenim uvjetima. Tako su naprimjer vrste *L. aporus* i *L. hargravesii* pokazale značajne razlike u dužini perivalvarne osi i duljini lanaca, na način da su im perivalvarne osi, a i sami lanci bili značajno duži kod stanica koje su rasle u uvjetima s nedovoljno anorganskog fosfora od onih u uvjetima bogatim svim potrebnim hranjivim solima. Iz ovoga možemo zaključiti da ove vrste produženjem

pervalvarne osi povećavaju površinu na kojoj se sintetizira enzim AP, a lanci se produžuju zbog stvaranja stabilnijih veza između stanica što pomaže vrstama da budu otpornije na konzumaciju od strane organizama na višoj razini. Kod vrste *S. grevillei* uočeno smanjenje prosječne duljine lanaca u P limitiranim uvjetima što bi moglo biti rezultat slabijih veza između stanica, obzirom na nedostatak fosfora. Ova vrsta nije pokazivala druge morfološke promjene. Vrsta *C. peruvianus* je pokazala značajno produženu pervalvarnu os i značajno duže i deblje sete. Kod ove vrste se vidjelo da joj se glavna aktivnost alkalne fosfataze (APA) nalazi upravo na setama te možemo zaključiti da upravo iz razloga povećanja površine na kojoj se sintetizira ovaj enzim dolazi do navedenih morfoloških promjena. Obzirom na to da su sve prikazane vrste pokazale da posjeduju mogućnost sinteze enzima alkalne fosfataze kako bi se u situacijama nedostatka anorganskog fosfora mogle natjecati organske spojeve fosfora te je njegova snižena koncentracija u medijima u kojima su istražene vrste rasle bila „okidač“ za povećanje APAe. Također, u P limitiranim uvjetima određene vrste promijenile su dinamiku rasta, svoju morfologiju i promijenile sadržaj klorofila u stanicama te možemo reći da je hipoteza potvrđena.

Drugi cilj ovog doktorata bio je opisati pojedine strategije odabranih vrsta dijatomeja sjevernog Jadrana za preživljavanje P limitacije te korištenje tih strategija u nadmetanju za resurse unutar prirodnih fitoplanktonskih zajednica, dok je treći bio povezati dobivene rezultate eksperimentalnih *in vitro* analiza sa dugoročnim podacima. Postavljena je druga hipoteza, da pojedine vrste dijatomeja različitim prilagodbama na uvjete P limitacije zauzimaju svoju ekološku nišu u fitoplanktonskoj zajednici sjevernog Jadrana. Statističkom analizom dugoročnih podataka Centra za istraživanje mora u razdoblju od 1972.-2017. ustanovljeno je da je većina vrsta koje su opisane u ovom doktoratu prisutna na većini postaja uzorkovanja u sjevernom Jadranu. Izuzetak je vrsta *S. grevillei* koja je pronađena na postajama transekta Rovinj-rijeka Po iz razloga što se ova vrsta prilikom kvantitativne analize uzoraka svjetlosnim mikroskopom tek od nedavno određuje do razine vrste, pa je i set podataka za nju kraći. Obzirom na područje sjevernog Jadrana u kojem pojedina vrsta postiže veću brojnost podijeljene su na vrste koje veću brojnost postižu u eutrofnijem području i vrste koje veću brojnost postižu u oligotrofnijem području. Vrste koje postižu veću brojnost u eutrofnijem području su vrste roda *Leptocylindrus* i vrsta *T. nitzschioides*. Za njih se može zaključiti da preferiraju područja sa većom količinom hranjivih soli ali obzirom na gore navedene prilagodbe, mogu konkurirati za organski fosfat i preživjeti nepovoljne uvjete i na oligotrofnijem području. Vrste koje postižu veću brojnost na oligotrofnijem području su *C. peruvianus*, *S. grevillei* i *T. frauenfeldii* iz čega možemo zaključiti da preferiraju područja sa

sniženom koncentracijom hranjivih soli, a u tome im pomažu gore navedene prilagodbe. Vrste roda *Pseudo-nitzschia* i vrsta *C. decipiens* postižu podjednako velike brojnosti i na eutrofnom i na oligotrofnom području iz čega se može zaključiti da im odgovaraju oba područja te ovisno na kojem se dijelu nađu mogu ili ne moraju koristiti gore navedene prilagodbe na nedostatak anorganskog fosfora. Uz prostornu raspodjelu vrsta analizirana je i vremenska raspodjela. Rezultati su pokazali da se većina vrsta pojavljuje tijekom cijele godine s većim ili manjim doprinosom mikrofitoplanktonskoj zajednici, s iznimkama vrste *S. grevillei* iz prije spomenutih razloga smanjene količine podataka. Svaka od vrsta u određenim mjesecima više doprinosi mikrofitoplanktonskoj zajednici. Iz svega navedenog možemo zaključiti da svaka vrsta zauzima svoju ekološku nišu u fitoplanktonskoj zajednici sjevernog Jadrana te je i druga hipoteza potvrđena.

Obzirom na izražene prostorno vremenske gradijente koje nalazimo u sjevernom Jadranu, postavljena je treća hipoteza da je sjeverni Jadran primjer modelnog ekosustava u kojem nailazimo na različite ekološke uvjete na relativno malom geografskom području te ga kao takvog smatramo jako dobrim okolišem za ovakav tip istraživanja. Pregled literature dao nam je dobar uvid u brojne različite ekološke uvjete ovog područja. Ovo područje, kao plitki, poluzatvoreni sustav kojeg karakteriziraju različiti uvjeti koncentracija fosfora, u različitim godišnjim dobima, koji ovise o riječnom utjecaju, sezonskoj hidrodinamici te njihovom iskorištavanju od strane fitoplanktonskih organizama, idealan je okoliš za istraživanje prilagodbi dijatomeja i drugih organizama na ovakve uvjete, stoga možemo reći da je i treća hipoteza potvrđena.

Važnost ovog rada je bolje razumijevanje mehanizama koje fitoplanktonski organizmi koriste kako bi formirali/preuzeli ekološke niše u pelagičkom ekosustavu. Analiza karakteristika staničnog odgovora na P limitaciju na razini vrsta (npr. aktivacija alkalne fosfataze, ubrzavanje staničnog ciklusa, morfološke promjene i dr.) omogućila nam je dublji uvid u adaptivne strategije dijatomeja. Morfološke promjene nekih vrsta izašle su iz raspona veličine za opis istih, što je iznimno značajno imati na umu prilikom opisa novih vrsta i određivanja već opisanih vrsta u različitim uvjetima okoliša. Ovakav znanstveni pristup primjenjiv je u svim vodenim ekosustavima. Povezivanje *in vitro* rezultata sa dugoročnim promjenama ključno je u razumijevanju dinamike i ekologije određene vrste te njene prilagodbe na klimatske promjene u sjevernom Jadranu. Od iznimne je važnosti provesti brojna dodatna istraživanja na dijatomejama ali i ostalim fitoplanktonskim organizmima, kako bi se prema trenutnim uvjetima u okolištu mogao predvidjeti eventualni negativni utjecaj na

okoliš, druge organizme ili pak čovjeka ali i da bi bolje razumjeli kako nepovoljni uvjeti u okolišu utječu na organizme koji se u tom trenutku nađu u tom okolišu.



## II. THESIS SUMMARY

Diatoms (Bacillariophyceae) are unicellular autotrophic, photosynthetic, eukaryotic organisms. In the northern Adriatic, they are extremely important for the entire ecosystem due to the fact that they dominate the microphytoplankton community with over 500 different species out of a total of about 800 microphytoplankton species described so far in this area (Viličić et al. 2002). They can be found in all aquatic ecosystems (freshwater and marine). Based on molecular analyzes and considering the structure of valves according to Kooistra et al. 2007 we divide them into radial centrics, multipolar centrics, araphid pennates and raphid pennates. Radial centrics have radially distributed pores from the central pore to the cingulum (belt), multipolar centrics also have radially distributed pores but the cells are elongated, star-shaped or triangular. Araphid pennates do not have a raphe in their structure, while raphid pennates do (Kooistra et al. 2007). Numerous types of diatoms can form chains, which are one of the adaptations to the planktonic way of life. In addition to this, they have developed a number of other adaptations to adapt to life in the water column in the photic zone, such as setae, that increase the surface area of their cells and change the hydrodynamic characteristics.

All phytoplankton organisms, including diatoms, need macro nutrients (carbon (C), hydrogen (H), nitrogen (N), oxygen (O), phosphorus (P) and sulfur (S)) and trace nutrients (molybdenum (Mo) and gallium (Ga)) (especially important for diatoms), iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn), manganese (Mn) and magnesium (Mg) and many others) for their growth. Diatoms also need significant amounts of silica (Si) to form their frustules. Unlike the rich C, H, O, and S ocean reservoirs, the bioavailable N and P are present in relatively low concentrations, and hence considered as biolimitating elements. The process of assimilation of all nutrients is conducted by the ion transport through cell membranes (for example, inorganic phosphorus is assimilated as orthophosphate) (Dyhrman et al. 2012). Their uptake is extremely energy demanding, so it is partly dependent on the amount of light available. Diatoms, like all other marine organisms, are extremely sensitive to the availability of phosphorus because it affects cell biovolume, nutritional status, photosynthetic efficiency, and other biochemical and physiological characteristics of cells. It also affects the composition and abundance of marine phytoplankton communities (Paytan and McLaughlin 2007, Benitez-Nelson 2000). The external input of inorganic phosphorus into the sea is primarily conducted by the inflow of rivers from the mainland in dissolved and particulate form, and is formed by dissolving minerals from rocks and soil in contact with the atmosphere and water and the action of organisms (Benitez-Nelson 2000). Aerosol, volcanic ash and mineral dust yields are extremely important in remote ocean areas (Benitez-Nelson 2000). Due to

anthropogenic phosphorus yields, changes in N : P ratios often occur and nitrogen concentrations increase significantly compared to phosphorus concentrations. This has led to many marine environments becoming limited, as evidenced by numerous studies (Ivančić et al. 2021, Barcelos e Ramos et al. 2017, Powley et al. 2017, Tyrrell 1999, Harrison et al. 1990)

The northern Adriatic is a highly productive, shallow, marine ecosystem characterized by pronounced spatio-temporal ecological gradients (Ivančić et al. 2016, Ivančić et al. 2012). The productivity of the northern Adriatic is determined by numerous inflows of fresh water (Smodlaka 1986), and the most important is the Po river. The Western Adriatic Current (WAC) transfers low salinity and nutrient-rich water from the northern to the southern Adriatic along the western Adriatic coast (Zavatarelli et al. 1998), while the Eastern Adriatic Current (EAC) transfers high-salinity and nutrient-poor water from the southern to the northern Adriatic along the east coast (Giani et al. 2012). Consequently, distinct spatio-temporal ecological gradients are formed, which makes the northern Adriatic an excellent area for experiments and observations that can explain the impact of phosphorus on the microphytoplankton community (Marić Pfannkuchen et al. 2018, Smodlaka Tanković et al. 2018a, Ivančić et al. 2016). Previous research in the northern Adriatic has shown that the behavior and growth of diatoms, but also other phytoplankton organisms are mainly determined by temperature, light and the ability of species to cope with the ever-changing availability of phosphorus, including inorganic phosphorus deficiency (Marić Pfannkuchen et al. 2018, Ivančić et al. et al. 2012). In the absence of inorganic phosphorus, diatoms use organic phosphorus for survival. Most diatoms have developed mechanisms for the synthesis of extracellular enzymes that help cells to use parts of organic matter that they are able to assimilate through the cell membrane. One of the enzymes is alkaline phosphatase (AP) which dephosphorylates dissolved organic phosphorus compounds such as nucleic acids and phospholipids (Price and Morel 1990) making phosphates available to cells (Hoppe 2003). Phosphorus is also an important component in the synthesis of key molecules such as lipids and nucleic acids, as well as for energy processes (Yang et al. 2014, Siron et al. 1989, Cembella et al. 1984) and as a structural component of phospholipid cell membranes, so in unfavorable conditions many diatoms react to the inorganic phosphorus deficiency by storing it in the form of orthophosphate, polyphosphate or lipids, when there is enough, and use it in conditions when it is lacking. Phosphorus deficiency can also affect pigment synthesis by stopping it because cells are unable to synthesize enough RNA, resulting in decreased cellular chlorophyll *a* concentrations (Alipanah et al. 2018, Pan et al. 1996, Lombardi and Wangersky 1991, Finenko et al. Krupatkina-Akinina 1974). Inorganic phosphorus deficiency can also

significantly affect diatoms abundance in such a way that some species abruptly increase in abundance to have as much chance of keeping the species in an unfavorable period while others are not significantly affected by P deficiency because they have some other way to adapt to such conditions. Due to all the above adaptations, some species may experience significant changes in cell morphology, which can potentially lead to wrong conclusions when describing new species, if we do not know how each species behaves under different conditions.

In this doctoral dissertation, nine species of diatoms (*Leptocylindrus aporus*, *L. hargravesii*, *Chaetoceros decipiens*, *C. peruvianus*, *Skeletonema grevillei*, *Thalassionema frauenfeldii*, *T. cf. nitzschioides*, *Pseudo-nitzschia delicatanisima* and *P. calliantha*) were isolated from the northern Adriatic. Physiological responses to the limited availability of inorganic phosphate were analyzed for monoclonal cultures of these nine species, to explain how these significant organisms adapted to phosphorus deficiency conditions, and what adaptations they developed in those conditions. Taxonomic identification of selected species was performed by light microscopy and molecular methods. Statistical analyses of data from the Long-Term Database of the Center for Marine Research in Rovinj were performed, from which the spatial and temporal distribution of selected species were extracted. Cell cultures of the selected species were grown in two different media (F/2 and P limited) and the reactions of the cells to different conditions during the experimental period were monitored *in vitro*. The parameters of growth dynamics, cell morphology, chlorophyll fluorescence intensity, activity, kinetics and localization of alkaline phosphatase enzyme and dissolved inorganic phosphate concentration were measured. For each of these parameters, three independent measurements were performed in three separate cultures of each simulated condition.

The first goal of this doctoral thesis was to characterize the adaptations of selected species of diatoms in the northern Adriatic to spatio-temporal changes in phosphorus concentrations in the ecosystem. First hypothesis stated that *in vitro* diatoms respond to phosphorus limitation conditions by changes in growth dynamics, reduced fluorescence and number of plastids, activation of the enzyme alkaline phosphatase, and morphological changes of the frustle. Morphological changes may go beyond the description of the species. In this study, *C. decipiens*, *S. grevillei*, *T. frauenfeldii*, *T. cf. nitzschioides* and *P. calliantha* grew faster, ie. had a shorter generation time in P limited conditions, which indicates an adaptation that increases their numbers abruptly when found in these conditions, while the species *L. aporus*, *L. hargravesii* and *P. delicatissima* grew faster in P rich conditions, indicates a tendency to initiate growth under nutrient rich conditions rather than under

limiting conditions. Only *C. peruvianus* did not show a significant difference in cell growth between the two examined conditions, which indicates a more opportunistic way of adapting to adverse conditions. Phosphate deficiency also affects pigment synthesis. In this study, for the species *L. aporus*, *L. hargravesii*, *S. grevillei* and *T. cf. nitzschoides* we saw that chlorophyll fluorescence intensity was higher throughout the duration of experiment in cells growing under P rich conditions, in contrast to cells growing in P limited conditions, only *P. calliantha* showed no significant difference in chlorophyll fluorescence intensity between the two conditions. For the species *L. aporus* and *L. hargravesii* we also saw that the plastids were generally smaller and less numerous in P depriver conditions. Most species can synthesize the enzyme alkaline phosphatase, so in the absence of inorganic phosphorus they use organic forms of phosphorus compounds to compensate for the required phosphorus in their cells. This study also showed that in conditions of inorganic phosphorus deficiency, all species sooner or later activated the enzyme alkaline phosphatase, which demonstrates that they have the ability to synthesize it, but it does not have the same characteristics in each species. Michaelis-Menten kinetics showed that in some species this enzyme has extremely high affinity and is effective even at low concentrations of substrates, such as *L. aporus*, *S. grevillei*, *T. frauenfeldii* and species of the *Pseudo-nitzschia* genera that had low half-saturation constants ( $K_M$  values). While the species *L. hargravesii*, *C. decipiens* and *T. cf. nitzschoides* expressed enzyme with slightly higher  $K_M$  values, which indicates an adaptation to slightly higher concentrations of organic phosphate. *C. peruvianus* was the only species with a very high  $K_M$  value, which indicated low substrate specificity and adaptation to high substrate concentrations, which may be the reason why this species almost never achieves large numbers in the northern Adriatic. In previous studies, it has been experimentally proven that many diatoms can store inorganic phosphate in the form of orthophosphate, polyphosphate or lipids, and use it in phosphorus deprived conditions or have extremely effective intake mechanisms, which was also confirmed by this research. All studied species showed a significantly increased cellular uptake of dissolved inorganic phosphate in the lag phase when the culture medium was P rich, after which the rate decreased dramatically. From that we can conclude that all species were able to create phosphate reserves and increase their numbers using these reserves. Due to all the above adaptations, some species may experience significant changes in cell morphology, which can potentially lead to erroneous conclusions in taxonomic analysis if we do not know how each species behaves under what conditions. Thus, for example, the species *L. aporus* and *L. hargravesii* showed significant differences in the length of the perivalvar axis and the length of the chains. Their perivalvar axes and the chains

were significantly longer in cells growing in conditions with insufficient inorganic phosphate. From this we can conclude that these species increase the surface area where the AP enzyme is synthesized by lengthening the perivalvar axis. At the same time the chains lengthen due to more stable connections between cells which helps species to be more resistant to consumption by higher level organisms. For *S. grevillei*, a decrease in the average chain length was observed in P limited conditions, which could be the result of less stable connections between cells due to phosphorus deficiency. No other morphological changes were observed. The species *C. peruvianus* showed a significantly elongated perivalvar axis and significantly longer and thicker setae. In this species, it was seen that the majority of alkaline phosphatase activity (APA) is located on the setae, so we can conclude that these morphological changes occur because of the increase of the area on which this enzyme is located. Given that all the presented species showed that they have the ability to synthesize the enzyme alkaline phosphatase to compete for organic phosphorus compounds, in situations of inorganic phosphorus deficiency, and in P limited conditions certain species changed the growth dynamics, their morphology has changed and also the content of chlorophyll in the cells has changed, we can say that the hypothesis was confirmed.

The second goal of this doctorate was to describe individual strategies of selected species of diatoms in the northern Adriatic to overcome P limitation, and the use of these strategies in competing for resources within natural phytoplankton communities, while the third was to link the results of experimental *in vitro* analyzes with long-term data. The second hypothesis is that certain types of diatoms occupy specific ecological niches in the phytoplankton community of the northern Adriatic with different adaptations to the P limited conditions. Analysis of long-term data of the Center for Marine Research in the period 1972-2017 showed that most of the species described in this doctorate are present at most sampling stations in the northern Adriatic. The exception is *S. grevillei* found at the stations of the Rovinj-Po river transect due to the fact that this species is only recently determined to the level of the species, so the set of data for it is shorter. Considering the area of the northern Adriatic in which an individual species achieves a higher abundances, they are divided into species that achieve a higher abundances in the eutrophic area and species that achieve a higher abundances in the oligotrophic area. Species that achieve higher abundances in the more eutrophic range are species of the genus *Leptocylindrus* and species *T. nitzschioides*. They prefer areas with a higher amount of nutrients but given the above adaptations, they can compete for organic phosphate and survive adverse conditions even in a more oligotrophic area. Species that achieve higher abundances in the oligotrophic area are *C. peruvianus*, *S.*

*grevillei* and *T. frauenfeldii* from which we can conclude that they prefer areas with reduced concentration of nutrients, and the above mentioned adaptations make them better competitors under these conditions. Species of the genus *Pseudo-nitzschia* and *C. decipiens* achieve equally large numbers in both the eutrophic and oligotrophic areas, from which it can be concluded that these species compete successfully under both conditions. In addition to the spatial distribution of species, the temporal distribution was also analyzed. The results showed that most species occur throughout the year with a greater or lesser contribution to the microphytoplankton community, with the exception of *S. grevillei* for the aforementioned reasons of reduced data sets. Each of the species contributes more to the microphytoplankton community in certain months. From all the above, we can conclude that each species occupies its ecological niche in the phytoplankton community of the northern Adriatic, and the second hypothesis has been confirmed.

Given the pronounced spatio-temporal gradients found in the northern Adriatic, the third hypothesis is that the northern Adriatic is an example of a model ecosystem in which we encounter different ecological conditions in a relatively small geographical area and as such we consider it a very good environment for this type of research. A review of the literature gave us a good insight into the many different ecological conditions of this area. This area, as a shallow, semi-enclosed system characterized by different conditions of phosphorus concentrations, in different seasons, depending on river influence, seasonal hydrodynamics and their utilization by phytoplankton organisms, is an ideal environment for researching adaptations of diatoms and other organisms to such conditions. Therefore we can say that the third hypothesis is also confirmed.

The presented results allow a better understanding of the mechanisms that phytoplankton organisms use to form/take over ecological niches in the pelagic ecosystem. Analysis of the characteristics of the cellular response to phosphorus limitation at the species level (e.g., alkaline phosphatase activation, cell cycle acceleration, morphological changes, etc.) provided us with a deeper insight into adaptive diatom strategies. The morphological changes of some species went out of the described size measurements for those species, which is extremely important to keep in mind when describing new species and determining already described species in different environmental conditions. This scientific approach is applicable in all aquatic ecosystems. Linking *in vitro* results with long-term changes is crucial in understanding the dynamics and ecology of a particular species and its adaptation to climate change in the northern Adriatic. It is important to conduct numerous additional studies on diatoms and other phytoplankton organisms, in order to predict the possible impact of

environmental changes on phytoplankton, other organisms, the foodweb and finally humans with respect to current environmental conditions, but also to better understand how adverse environmental conditions affect organisms that are in that environment at that time.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	3
2.1. Dijatomeje (Bacillariophyceae) .....	3
2.1.1. <i>Radijalne centrice</i> .....	7
2.1.2. <i>Multipolarne centrice</i> .....	7
2.1.3. <i>Arafidne penate</i> .....	9
2.1.4. <i>Rafidne penate</i> .....	10
2.2. Hranjive soli .....	11
2.2.1. <i>Fosfor</i> .....	12
2.3. Prilagodbe dijatomeja na limitaciju anorganskim fosforom.....	14
2.3.1. <i>Skladištenje anorganskog fosfora</i> .....	14
2.3.2. <i>Stvaranje trajnih stadija (spora)</i> .....	14
2.3.3. <i>Sastav lipida i proteina</i> .....	15
2.3.4. <i>Enzim alkalna fosfataza</i> .....	16
2.3.5. <i>Nukleinske kiseline i sastav pigmenata</i> .....	17
2.3.6. <i>Sinteza toksina</i> .....	17
2.3.7. <i>Rast, biomasa i mortalitet</i> .....	18
2.3.8. <i>Promjene u morfologiji</i> .....	18
2.4. Sjeverni Jadran .....	19
2.5. Sezonska sukcesija hranjivih soli u sjevernom Jadranu .....	21
2.6. Sezonska sukcesija fitoplanktona sjevernog Jadrana .....	22
3. CILJEVI I HIPOTEZE .....	26
3.1. Ciljevi .....	26
3.2. Hipoteze.....	26
4. MATERIJALI I METODE .....	27
4.1. Statističke analize podataka iz Baze dugoročnih podataka Centra za istraživanje mora u Rovinju, Institut Ruđer Bošković .....	27



4.1.1. Prostorna i vremenska rasprostranjenost fitoplanktonskih vrsta.....	27
4.1.2. Taksonomska identifikacija i kvantitativna analiza fitoplanktonske zajednice svjetlosnim mikroskopom.....	29
4.2. Eksperimentalne analize .....	30
4.2.1. Uzorkovanje i uspostavljanje monoklonalnih kultura .....	30
4.2.2. Taksonomska identifikacija vrsta molekularnim metodama .....	31
4.2.3. Identifikacija vrsta kombinacijom molekularnih metoda i svjetlosne mikroskopije .....	32
4.2.4. Eksperimentalni dizajn.....	36
Dinamika rasta.....	38
Morfologija stanica .....	38
Intenzitet fluorescencije klorofila.....	38
Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	39
Otopljeni fosfat.....	40
4.3. Obrada podataka .....	41
5. REZULTATI.....	42
5.1. Statističke analize dugoročnog niza podataka prostorne i vremenske rasprostranjenosti odabranih vrsta dijatomeja.....	42
5.1.1. Radijalne centrice.....	42
<i>Leptocylindrus</i> spp. ....	42
5.1.2. Multipolarne centrice .....	43
<i>Chaetoceros decipiens</i> Cleve 1873.....	43
<i>Chaetoceros peruvianus</i> Brightwell 1856 .....	45
<i>Skeletonema grevillei</i> Sarno i Zingone 2005 .....	47
5.1.3. Arafidne penatne dijatomeje .....	48
<i>Thalassionema frauenfeldii</i> (Grunow) Tempère i Peragallo 1910 .....	48
<i>Thalassionema nitzschioides</i> (Grunow) Mereschkowsky 1902 .....	50
5.1.4. Rafidne penatne dijatomeje.....	51
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp. ....	51
5.2. Eksperimentalne analize odabranih vrsta dijatomeja .....	53

5.2.1. Radijalne centre.....	53
5.2.1.1. <i>Leptocylindrus aporus</i> (F.W.French i Hargraves) D. Nanjappa i A. Zingone 2013.....	53
Dinamika rasta.....	53
Morfološke reakcije na različitu dostupnost fosfora .....	54
Intenzitet fluorescencije klorofila.....	55
Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	56
Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	58
5.2.1.2. <i>Leptocylindrus hargravesii</i> D. Nanjappa & A. Zingone 2013 .....	59
Dinamika rasta.....	59
Morfološke reakcije na različite hranjive uvjete .....	59
Intenzitet fluorescencije klorofila.....	61
Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	62
Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	64
5.2.2. Multipolarne centre .....	65
5.2.2.1. <i>Chaetoceros decipiens</i> Cleve 1873.....	65
Dinamika rasta.....	65
Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	65
Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	67
5.2.2.2. <i>Chaetoceros peruvianus</i> Brightwell 1856 .....	68
Dinamika rasta.....	68
Morfološke reakcije na različite hranjive uvjete .....	68
Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	70
Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	72
5.2.2.3. <i>Skeletonema grevillei</i> Sarno i Zingone 2005 .....	73
Dinamika rasta.....	73
Morfološke reakcije na različite hranjive uvjete .....	73
Intenzitet fluorescencije klorofila.....	74
Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	75
Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	76
5.2.3. Arafidne penatne dijatomeje .....	77
5.2.3.1. <i>Thalassionema frauenfeldii</i> (Grunow) Tempère i Peragallo 1910.....	77
Dinamika rasta.....	77

Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	78
Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	80
5.2.3.2. <i>Thalassionema cf. nitzschoides</i> (Grunow) Mereschkowsky 1902 .....	81
Dinamika rasta.....	81
Intenzitet fluorescencije klorofila.....	82
Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	82
Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	84
5.2.4. Rafidne penatne dijatomeje.....	85
5.2.4.1. <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> (Cleve) Heiden 1928 .....	85
Dinamika rasta.....	85
Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	86
Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	87
5.2.4.2. <i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> Lundholm, Moestrup i Hasle 2003 .....	88
Dinamika rasta.....	89
Intenzitet fluorescencije klorofila.....	89
Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze .....	90
Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	92
6. DISKUSIJA.....	93
6.1. Prilagodbe odabranih vrsta dijatomeja na promjene koncentracija fosfora .....	93
6.1.1. Prilagodbe dinamike rasta ovisno o različitim koncentracijama fosfora .....	93
6.1.2. Morfološke razlike kao odgovor na različite uvjete fosfora .....	95
6.1.3. Utjecaj dostupnosti fosfora na fluorescenciju klorofila i broj plastida .....	97
6.1.4. Prilagođavanje nedostatku fosfora indukcijom alkalne fosfataze.....	97
6.1.5. Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata .....	100
6.2. Prikaz strategija odabranih vrsta dijatomeja za svladavanje limitacije fosforom i usporedba sa rezultatima statističkih analiza dugoročnog niza podataka prostorne i vremenske rasprostranjenosti odabranih vrsta dijatomeja.....	101
7. ZAKLJUČCI .....	105
8. LITERATURA .....	107
9. PRILOZI.....	122
10. ŽIVOTOPIS .....	127
11. ZNANSTVENA AKTIVNOST I PUBLIKACIJE .....	128

## 1. UVOD

Dijatomeje (Bacillariophyceae) su jednostanični autotrofni fotosintetski eukariotski organizmi. U sjevernom Jadranu iznimno su značajne za cjelokupni ekosustav obzirom na svoje karakteristike i činjenicu da dominiraju fitoplanktonskim zajednicom sa preko 500 različitih vrsta od sveukupno oko 800 do sada opisanih fitoplanktonskih vrsta na ovom području (Viličić i sur. 2002). Temeljem molekularnih analiza i obzirom na strukturu valvi prema Kooistra i sur. 2007 dijelimo ih na radijalne centrice, multipolarne centrice, arafidne penate i rafidne penate (Kooistra i sur. 2007). Veliki broj dijatomeja koje dominiraju sjevernim Jadranom (Marić i sur. 2012) iznimno je osjetljivo na dostupnost fosfora (P). Brojna istraživanja dokazala su da je upravo dostupnost fosfora jedan od glavnih faktora koji utječu na sastav, rasprostranjenost i brojnost fitoplanktonskih zajednica uključujući dijatomeje (Moutin i sur. 2005, Paytan i McLaughlin 2007, Mackey i sur. 2007, Ivančić i sur. 2016, Pfannkuchen i sur. 2017, Smodlaka Tanković i sur. 2018) te na biovolumen stanica, nutritivni status, fotosintetsku učinkovitost, ekspresiju različitih enzima i brojne druge biokemijske i fiziološke karakteristike stanica (Smodlaka Tanković i sur. 2018). Kao odgovor na razdoblja nedovoljne količine fosfora ovi organizmi su razvili čitav niz mehanizama kako bi se uspješno natjecali za resurse te preživjeli i opstali u nepovoljnim uvjetima. Poznati su slučajevi smanjenja količine fosfolipida i povećanja nefosfolipida, npr. u membranama (Gašparović i sur. 2014, Huang i sur. 2019), promjene sadržaja stanične RNA i smanjenja omjera ATP/klorofila u stanicama (Raven 2013) te mnoge druge. U sjevernom Jadranu je potvrđen mehanizam sinteze izvanstaničnog enzima alkalna fosfataza (AP), kojeg organizmi koriste kako bi povremenu smanjenu dostupnost anorganskog fosfora nadomjestili iz organskih tvari otopljenih u morskoj vodi (Ivančić i sur. 2016). Enzim AP defosforilira organske fosforne spojeve kao što su fosfo šećeri, nukleinske kiseline i fosfolipidi. Na taj način stanice su u mogućnosti apsorbirati fosfat koji je odvojen od organske molekule i koristiti ga za različite procese u stanicama (Hoppe 2003). Najnovije metode su omogućile provođenje kompleksnih istraživanja kojima je moguće detaljnije istražiti procese u stanicama poput genski regulirane ekspresije različitih enzima. Istraživanjima transkriptoma i proteoma dokazano je da je metabolizam fosfata i ekspresija enzima kao što je AP uglavnom pod transkripcijskom regulacijom gena koji kodiraju alkalnu fosfatazu i druge ključne proteine za lokalizaciju fosfora u stanicama kao i produkciju nefosfolipida (Dell'Aquila i sur. 2020).

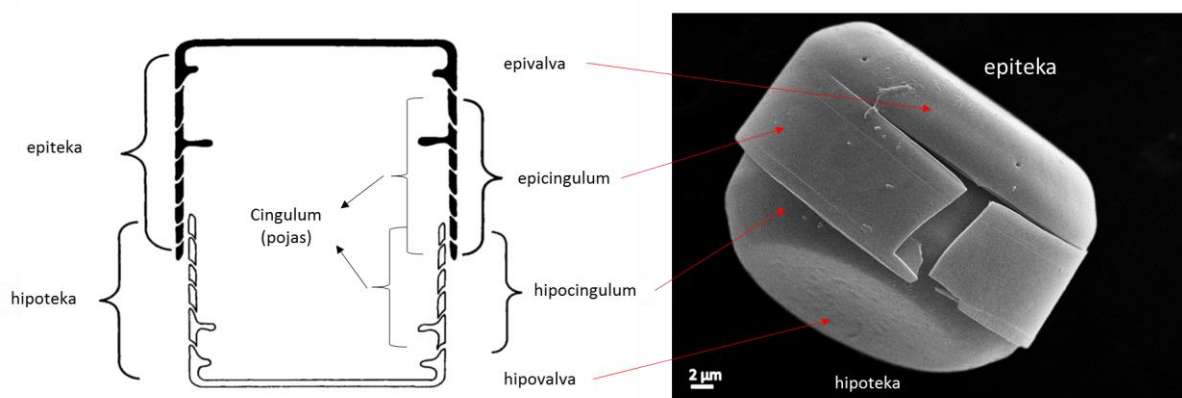
Kako bi dobili čim bolji uvid u prilagodbe i strategije koje su pojedine vrste dijatomeja razvile kako bi opstale u okolišu limitiranom P, u ovom istraživanju su se kombinirale

različite metode morfološke, genetičke i fiziološke karakterizacije. To nam je omogućilo bolje razumijevanje prilagodbi na konstantne prostorno-vremenske promjene koncentracije fosfora karakteristične za sjeverni Jadran te dodatno pojasnilo na koji način ovi organizmi utječu na cjelokupnu ekologiju ovog područja. U ovom istraživanju su se monoklone kulture vrsta *Leptocylindrus aporus*, *Leptocylindrus hargravesii*, *Chaetoceros decipiens*, *Chaetoceros peruvianus*, *Skeletonema grevillei*, *Thalassionema frauenfeldii*, *Thalassionema* cf. *nitzschioides*, *Pseudo-nitzschia delicatissima* i *Pseudo-nitzschia calliantha* izložile uvjetima limitacije fosforom *in vitro*. Pratili su se njihove morfološke i fiziološke reakcije na limitaciju fosforom, a eksperimentalna mjerenja obuhvatila su analize promjene brzine rasta pojedine vrste pri različitim koncentracijama fosfata, brzine unosa fosfata, podatke o aktivnosti, lokalizaciji i načinima aktivacije enzima alkalne fosfataze (AP) te morfološke prilagodbe pojedine vrste na stres fosfatima. Rezultati su se usporedili sa podacima raspodjele tih vrsta kroz ekološke gradijente u prirodnim uzorcima, za što se koristila baza podataka dugoročnih mjerenja fitoplanktona u sjevernom Jadranu, Centra za istraživanje mora u Rovinju, Institut Ruđer Bošković.

## 2. LITERATURNI PREGLED

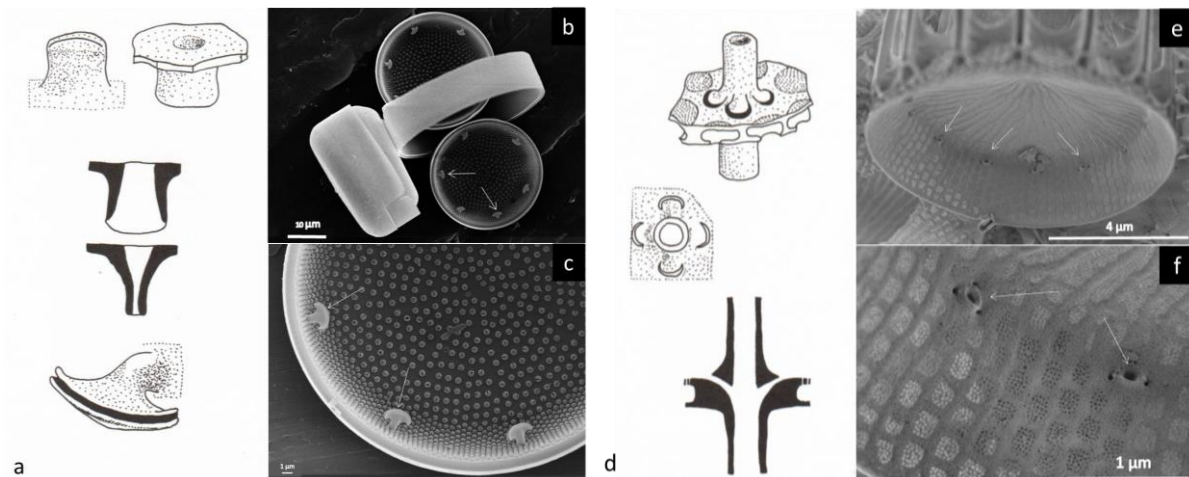
### 2.1. Dijatomeje (Bacillariophyceae)

Dijatomeje (Bacillariophyceae) su jednostanični autotrofni fotosintetski eukariotski organizmi. Pripadaju skupini algi sa zlatno-smeđim do smeđim kloroplastima i pigmentima koforfil *a* i *c* te fukoksantinom. Po broju vrsta, količini biomase te primarnoj produkciji pripadaju najuspješnijim fotosintetskim eukariotskim organizmima s preko  $10^5$  vrsta (Kooistra i sur. 2007, Mann i Droop 1996). U sjevernom Jadranu iznimno su značajne za cjelokupni ekosustav obzirom na svoje karakteristike i činjenicu da dominiraju fitoplanktonskim zajednicom sa preko 500 različitih vrsta od sveukupno oko 800 do sada opisanih fitoplanktonskih vrsta na ovom području (Viličić i sur. 2002). Pronalazimo ih u svim vodenim ekosustavima (kopnenim, slatkovodnim i morskim). Raspon veličina im se kreće od 2  $\mu\text{m}$  do nekoliko mm. Dijatomeje nemaju staničnu stjenku već modifikaciju periplasta. Ispod plazmaleme periplasta nalaze se vezikule u kojima se iz netopivog silicija, koji je u morima prisutan u obliku ortosilicijeve kiseline ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ) i njezinih polimera, sintetizira netopivi opal ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ). U vezikulama se naslage opala povećavaju te izbijaju na vanjsku stranu stanice nakon čega obavije čitavu stanicu u obliku opalne „kućice“ s dvjema frustulama. Frustula se sastoji od jedne veće valve (epiteka) koja djelomično pokriva manju valvu (hipoteka) (Round i sur. 1990). Valve mogu biti okrugle, eliptične, stožaste ili valovite. Svaka valva s bočne strane ima plašt (engl. *mantle*) na kojeg se nastavljaju pleure. Pleure gornjeg i donjeg dijela frustule stvaraju pojas (engl. *girdle bands*) (Slika 1).



**Slika 1.** Struktura stanice dijatomeje. Lijevo - skica [Izvor:(Tomas 1997)], desno - slika stanice dijatomeje napravljena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) (Autori: dr.sc. Mirta Smoldaka Tanković i dr.sc. Ana Baričević).

Na površini valve (engl. *valve face*) nalaze se centralna pora (annulus), centralno područje ili središnje zadebljanje (sternum) od kojih se duž valve protežu jače silificirane strukturne trakice (interstrije). Između interstrija nalaze se redovi pora, a unutar svake pore su fine silikatne strukture u obliku trakica, mrežica ili pločica nalik na sito. Veliki broj dijatomeja ima dva ili više oblika izdanaka (engl. *processes*) koji prolaze kroz površinu valve. Izdanci se dijele na rimoportulae (engl. *labiate processes*, usnati izdanci) i fultoportulae (engl. *strutted processes*, izdanci s potpornjem) (Slika 2). Rimoportulae nalazimo kod svih dijatomeja, a građene su kao jednostavni kraći cjevasti otvori bez rubnih proreza, a s vanjske strane valve se često otvaraju jednim otvorom. Ovi nastavci otpuštaju sluz kojom se stanice kreću po podlozi, prihvaćaju za nju ili se međusobno pričvršćuju (Medlin i sur. 1986, Pickett-Heaps i sur. 1986). Fultoportulae nalazimo kod centrica, a sastoje se od produžene cijevi s rubnim prorezima. Kod nekih vrsta kao što su vrste roda *Skeletonema*, one su jako produžene, a kod nekih vrsta, kao što su vrste roda *Thalassiosira*, ispuštaju niti od kristaličnog  $\beta$ -hitina (Herth 1979, Herth i Barthlott 1979).



**Slika 2.** Prikaz izdanaka valve. Shematski prikaz rimoportulae (engl. *labiate processes*) prikazan je na slici **a** [Izvor: (Viličić 2002)]. Na slikama **b** i **c** strelicama su označene rimoportule s unutarne strane valve na stanicama vrste iz roda *Actinocyclus* (SEM) (Autori: dr.sc. Mirta Smodlaka Tanković i dr.sc. Ana Baričević). Shematski prikaz fultoportulae (engl. *strutted processes*) prikazan je na slici **d** [Izvor: (Viličić 2002)]. Na slikama **e** i **f** strelicama su označene fultoportulae s unutarne strane valve na stanicama vrste *Skeletonema grevillei* (SEM)(Autori: dr.sc. Daniela Marić Pfannkuchen i dr.sc. Jelena Godrijan).

Temeljem molekularnih analiza i obzirom na strukturu valvi prema Kooistra i sur. 2007 dijelimo ih na:

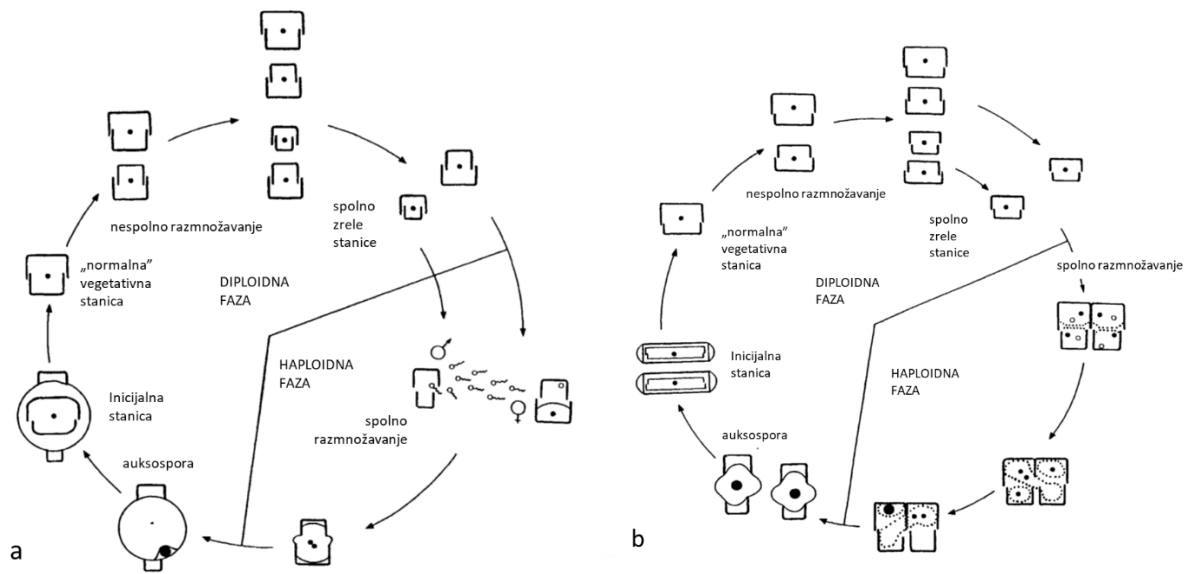
- a) radijalne centrice – radijalno raspoređene pore od središnje pore prema cingulumu (pojasu), a rimoportule se nalaze području spajanja valve sa plaštom
- b) multipolarne centrice - također radijalno raspoređene pore ali su stanice izdužene, zvjezdaste ili trokutaste, rimoportule se nalaze na mjestu centralne pore ili su blago pomaknute od centra. Radijalne i multipolarne centrice prevladavaju u planktonu.
- c) arafidne penate – u svojoj strukturi nemaju rafu.
- d) rafidne penate - u svojoj strukturi imaju rafu. Penatne dijatomeje prevladavaju u pridnom sloju (bentosu). (Kooistra i sur. 2007)

Dijatomeje također mogu biti povezane u lance. Smatra se da je ova formacija jedna od prilagodbi na planktonski način života. Planktonске dijatomeje prilagodile su se životu u vodenom stupcu u fotičkoj zoni cijelim nizom prilagodbi. Često imaju sete i različite nastavke koji im omogućavaju ostanak u fotičkoj zoni. Postoji nekoliko načina formiranja lanaca. Jedan način je fiksnim povezivanjem silikatnih nastavaka valvi (npr. vrste roda *Skeletonema*), a drugi je nakupinama sluzi (engl. *mucilage pads*). Na ovaj način se povezuje većina arafidnih penata. Treći način povezivanja u lance je dugačkim valvarnim nastavcima kojima se dijatomeje, kao što su vrste rodova *Chaetoceros* i *Bacteriastrum* (sete), povezuju sa sestrinskim stanicama, kod nekih vrsta se u tim nastavcima nalaze i plastidi.

Razmnožavanje dijatomeja može biti spolno i nesporno (mitoza) (Slika 3). Nesporno razmnožavanje odvija se na način da se nove valve stvaraju unutar roditeljske stanice nakon čega se stvaraju dvije nove stanice. Nakon podjele, valve roditeljske stanice čine epiteke, a novonastali dio stanice su hipoteke. Iz tog razloga je jedna stanica kćer iste veličine kao roditeljska stanica, dok je druga novonastala stanica manja od roditeljske stanice. Na taj način se dijatomeje dijele sve dok ne dođu u fazu kada su stanice premale za daljnju mitotičku diobu, nakon čega ili kreće spolno razmnožavanje auktosporama kojima se vraća originalna veličina ili stanice umiru. Do spolnog razmnožavanja i stvaranja auktospora može doći ne samo zbog smanjenja stanica mitozom, već i zbog mnogih vanjskih utjecaja, kao što su nedostatak ključnih hranjivih soli te određena razdoblja sa specifičnim trajanjem dužine dana i određenom temperaturom (Moore i sur. 2017, Montresor i sur. 2016, Holtermann i sur. 2010, Mouget i sur. 2009). Osim vegetativnih stanica i auktospora, diatomeje imaju i mogućnost stvaranja trajnih stadija (tzv. spora). Metaboličke aktivnosti u sporama su dramatično usporene. Diatomejske spore mogu trpiti duga razdoblja nepovoljnih okolišnih uvjeta. Trajne spore se formiraju na način da stanica stvara čvrsti silikatni omotač unutar



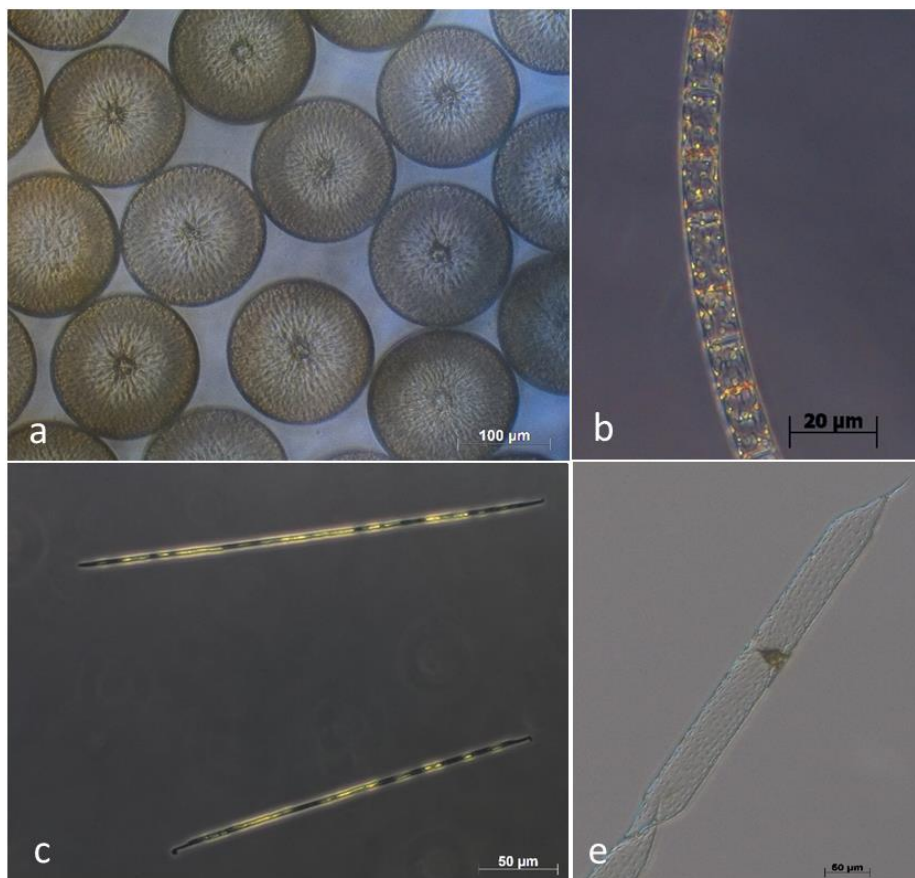
frustule, koji obavija ukupni sadržaj stanice. Novo stvorene spore tonu na dno. Ukoliko dođe do situacije da su strujama ili drugom utjecajem ponovo vraćene u vodeni stupac te ukoliko su u tom trenutku uvjeti povoljni, dolazi do ponovnog razvoja stanica i normalnog daljnjeg razvoja. Poznavanje biologije i ekologije dijatomeja od iznimne je važnosti za bolje razumijevanje globalnih biogeokemijskih procesa u moru i atmosferi.



**Slika 3.** Prikaz spolnog i nespolnog razmnožavanja dijatomeja: centrice (a) i penate (b) [Izvor: (Tomas 1997)]

### 2.1.1. Radijalne centrice

Radijalne centrice na valvi imaju središnju poru iz koje se pore šire prema rubu valve. Središnja pora može biti mala i pozicionirana u samom centru valve ili se može nalaziti na spoju površine valve i plašta. Nekoliko rodova na rubu površine valve ima nastavke kojima se valva jedne stanice spaja s valvom druge stanice. Ovoj skupini pripadaju vrste iz rodova *Leptocylindrus*, *Coscinodiscus*, *Paralia*, *Rhizosolenia*, *Guinardia* i dr. (Kooistra i sur. 2007, Kooistra i sur. 2003) (Slika 4).

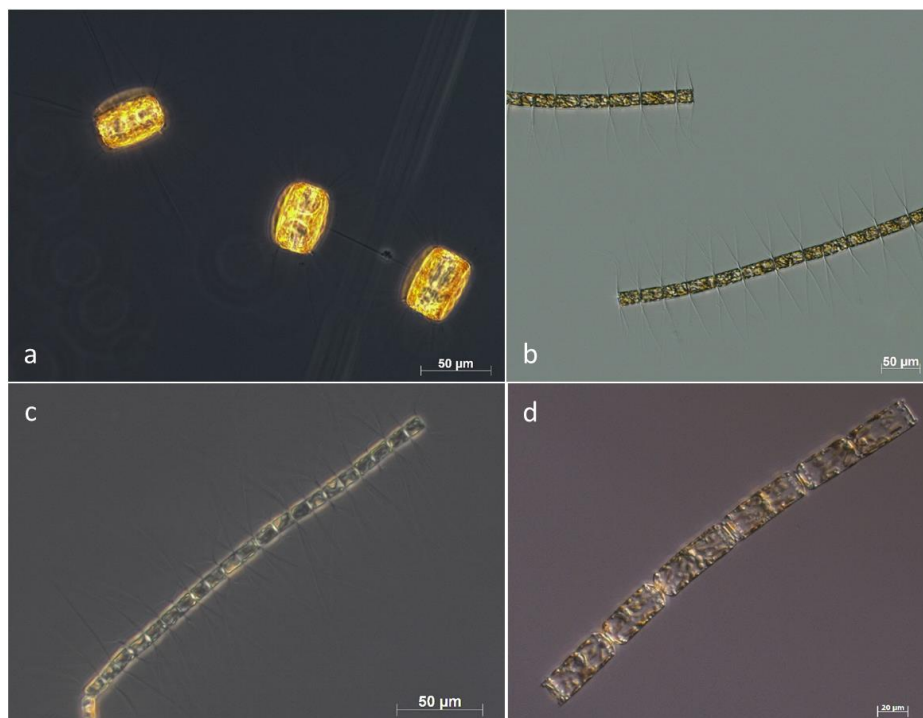


**Slika 4.** Primjeri vrsta radijalnih centrica: *Coscinodiscus* sp. (a), *Guinardia flaccida* (b), *Proboscia alata* (c) i *Pseudosolenia calcar-avis* (d)

### 2.1.2. Multipolarne centrice

Multipolarnim centricama smatramo bi-, tri-, itd. polarne centrice. Naprednija su skupina od radijalnih centrica. Zajednička karakteristika većine multipolarnih centrica je ta da posjeduju neku vrstu specijalizirane regije na površini stanice koja luči sluzavu organsku tvar. Ove regije su različitih oblika kod različitih skupina ali je svima zajedničko da je ta regija zapravo modificirana centralna pora, a ne modificirani izdanci. Kod bipolarnih centrica nazivaju se oceli ili pseudoceli, dok se je skupina Thalassiosirophyceae tijekom evolucije

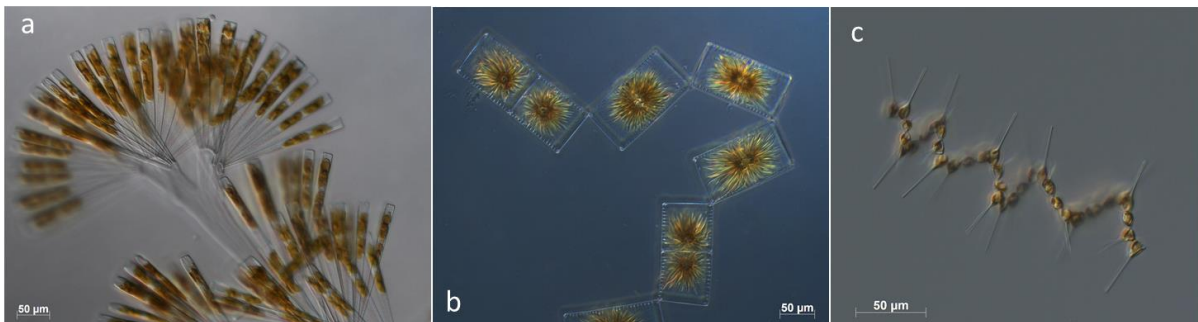
izgubila takve strukture i zadržala oblik valve svojih predaka. U Kooistra i sur. 2003 opisane su dvije skupine multipolarnih centrica. Prva skupina je podijeljena u dvije od kojih jednoj pripadaju Thalassiosirophyceae čija struktura sadrži fultoportulae i jednu veliku rimoportulae na plaštu ili u blizini centra valve. Ova skupina, za razliku od svih ostalih multipolarnih centrica, ima najizraženiju radijalnu simetriju. Kod nekih vrsta, kao što su vrste roda *Skeletonema*, fultoportulae su izrazito produžene kojima se stanice vežu u lance (Round i sur. 1990). Ovoj skupini također pripadaju i Lithodesmiophycidae, kao i Bellerocha i Streptotheca (Hemiaulales, Biddulphiophycidae). Ove dijatomeje karakterizira centralno smještena rimoportulae koja je često produžena. Drugoj skupini multipolarnih centrica pripadaju razredi Chaetocerotales (Chaetocerotophycidae), Eucampia (Hemiaulales, Biddulphiophycidae) i Cymatosirales (Cymatosirophyceae). Karakteriziraju ih bipolarne valve (izuzetak je *Bacteriastrum*, koji ima radijalnu simetriju). Neke vrste ove skupine imaju nekoliko područja sa porama. Takva područja su prisutna kod npr. vrsta roda *Chaetoceros*, u korjenu seta. Bipolarne centrice *Odontella* i *Pleurosira* (Triceratiales, Biddulphiophycidae), u svojoj strukturi imaju dobro razvijene ocelli okružene specifičnim obrubom i imaju dvije rimoportulae na površini valve, svaka sa jedne strane pomaknuta od centra stanice (Kooistra i sur. 2003). (Slika 5)



**Slika 5.** Primjeri vrsta multipolarnih centrica: *Thalassiosira* sp. (a), *Bacteriastrum* sp. (b), *Chaetoceros costatus* (c) i *Cerataulina pelagica* (d).

### 2.1.3. Arafidne penate

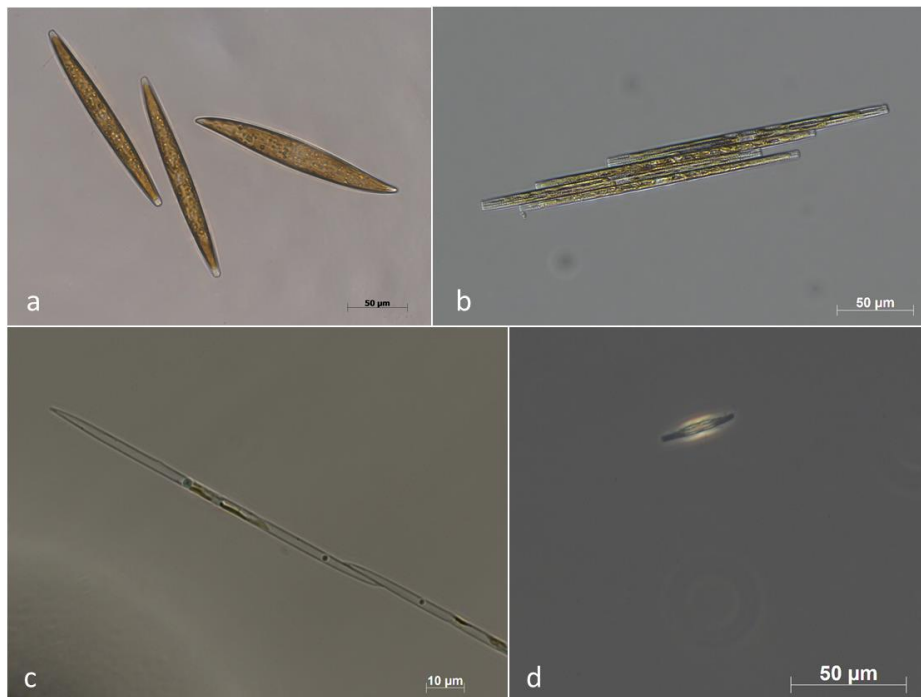
Vrste ove skupine nazivaju se još i "prave" penate. U strukturi svojih valvi nemaju rafu. Vrste koje pripadaju ovoj skupini povezuju se posebnim strukturama koje se sastoje od sluzave organske tvari koju luče stanice. Ovoj skupini pripadaju vrste rodova *Asterionellopsis*, *Rhaphoneis*, *Fragilaria*, *Fragilariformoa*, *Synedra*, *Thalassionema*, *Licmophora*, *Striatella* i dr. (Slika 6). Stanice vrste roda *Thalassionema* na gore spomenuti način se povezuju u „cik-cak“ i zvjezdaste lance, dok se stanice vrsta roda *Fragilaria* povezuju u lance nalik na vrpce (Kooistra i sur. 2003).



**Slika 6.** Primjeri vrsta arafidnih penata: *Licmophora* sp. (a), *Striatella unipunctata* (b) i *Asterionellopsis glacialis* (c).

#### 2.1.4. Rafidne penate

Vrste ove skupine posjeduju rafu koja se uz jedno zadebljano rebro (sternum) pruža duž cijele dužine valve. Smatra da je rafa nastala evolucijom produžene rimoportulae na distalnim krajevima valvi arafidnih penata (Round i sur. 1990, Hasle 1974). Kod većine rafidnih penata rafa i sternum se protežu najdužim dijelom valve. Kod nekih rodova, kao što je kao npr. *Amfora*, rafa i sternum se nalaze na jednoj strani valve, na taj način dozvoljavajući objema valvama da budu orjentirane prema podlozi. Skupine *Cocconeis* i *Achnanthes* su monorafidne dijatomeje što znači da jedna valva sadrži kompletno razvijenu rafu, dok je druga ne posjeduje. Ovoj skupini, osim već spomenutih vrsta pripadaju i vrste rodova *Pleurosigma*, *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, *Bacillaria* i dr. (Kooistra i sur. 2003) (Slika 7).



**Slika 7.** Primjeri vrsta rafidnih penata: *Pleurosigma* sp. (a), *Bacillaria paxillifera* (b), *Pseudo-nitzschia* sp. (c) i *Nitzschia* sp. (d).

## 2.2. Hranjive soli

Pojam hranjive soli podrazumijeva bilo koji element potreban za rast i razvoj fitoplanktonskih organizama, pa tako i dijatomeja. Svi fitoplanktonski organizmi za svoj rast i razvoj trebaju i makro hranjive soli (npr. ugljik (C), vodik (H), dušik (N), kisik (O), fosfor (P) i sumpor (S)) i mikro hranjive soli u tragovima (npr. molibden (Mo) i galij (Ga) (osobito za dijatomeje), željezo (Fe), bakar (Cu), cink (Zn), mangan (Mn) i magnezij (Mg) i brojni drugi). Za formaciju frustula diatomeja dodatno trebaju značajne koncentracije silicija (Si). Za razliku od bogatih C, H, O i S oceanskih rezervoara, biološki dostupni N i P su prisutni u niskim koncentracijama što čini ove elemente biolimitirajućim elementima. Zbog varijabilnosti u mehanizmima i kinetici unosa, veličini stanica i količini hranjivih soli potrebnih za rast stanica, količine hranjivih soli, pa samim time i fosfora u nekom ekosustavu mogu biti dovoljne za rast za jedne vrste ali ograničavajuće za rast za druge (Mackey i sur. 2007, Nicholson i sur. 2006, Sundareshwar i sur. 2003). Kao rezultat ovih varijabilnosti omjeri N:P:C u fitoplanktonskim vrstama mogu biti prilično varijabilni (Geider i La Roche 2002). Redfieldov omjer N:P od 16:1 (Redfield i sur. 1963) se često koristi kao mjerilo za razlikovanje N limitacije od P limitacije (Lenton i Watson 2000, Tyrrell 1999, Falkowski 1997). Kada je omjer N:P < 16:1 u morskoj vodi, računa se da je to N limitacija, a kada je N:P > 16:1 onda je u pitanju P limitacija. Međutim, u okolišima s morskom vodom s izmjerenim omjerima anorganski dušik : anorganski fosfor čak 25:1, N:P omjeri u fitoplanktonu su često mnogo manji od 16:1 (Geider i La Roche 2002, Broecker i Henderson 1998). Ovo odstupanje najvjerojatnije je posljedica stvaranja zaliha fosfata unutar stanica (npr. polifosfata) i varijacija u ribosomskoj RNA povezanih s promjenama u stopama rasta i sintezi proteina (Geider i La Roche 2002). Adsorpcija fosfata na površini stanica također može biti faktor i može značajno utjecati na N:P omjere u fitoplanktonskim organizmima (Fu i sur. 2005, Sañudo-Wilhelmy i sur. 2004). Kritični N:P u fitoplanktonskim organizmima koji predstavlja prijelaz sa N na P limitaciju je u rasponu od 20 do 50, što je značajno više od Redfieldovog omjera 16:1 (Geider i La Roche 2002). Varijacije u tim kritičnim omjerima N:P među vrstama mogu biti važan čimbenik koji utječe na natjecanje za hranjive soli među fitoplanktonskim vrstama. Obzirom da u okolišu povremeno može doći do sniženja koncentracija anorganskih formi hranjivih soli koje su im potrebne, neki fitoplanktonski organizmi razvili su mehanizme sinteze ekstracelularnih enzima kojima iz organske tvari odcjepljuju formu hranjive soli koju su u mogućnosti asimilirati kroz staničnu membranu. Na taj način mogu npr. bikarbonat pretvoriti u otopljeni CO<sub>2</sub> ili iz organske tvari odcijepiti ortofosfat. Većina dijatomeja ima iznimno efikasan mehanizam unosa te interni sustav

recikliranja N, P i drugih hranjivih soli. To postižu koristeći enzimatske puteve naslijeđene od izvornog heterokontofitnog predka kao i iz endosimbionata (Takabayashi i sur. 2005). Unos hranjivih soli iznimno je energetski zahtjevan te je iz tog razloga djelomično ovisan o količini svjetla. Bez obzira na to, neke dijatomeje tonu ispod piknokline kako bi nadopunile rezerve hranjivih soli, a potom se vraćaju u fotičku zonu kako bi nastavile proces fotosinteze, koristeći već unesene hranjive soli. Ovaj proces je omogućen procesima koji se odvijaju u mraku i koji mogu biti zaostali od heterokontofitnog predka (Villareal i sur. 1993).

### **2.2.1. Fosfor**

Fosfor (P) kao jedan od biolimitirajućih elemenata tvori 2-4% suhe mase većine stanica (Ivančić i sur. 2021, Powley i sur. 2017, Moore i sur. 2013, Paytan i McLaughlin 2007, Karl 2000). Važna je komponenta u sintezi ključnih molekula kao što su lipidi i nukleinske kiseline, za energetske procese (ATP, ADP AMP) (Yang i sur. 2014, Siron i sur. 1989, Cembella i sur. 1984) te kao strukturna komponenta fosfolipidnih staničnih membrana. Proces asimilacije fosfora odvija se aktivnim prijelazom iona kroz stanične membrane na način da se anorganski fosfor asimilira kao ortofosfat (Dyhrman i sur. 2012). Alge i drugi morski organizmi iznimno su osjetljivi na dostupnost fosfora iz razloga što on utječe na biovolumen stanica, nutritivni status, fotosintetsku efikasnost te druge biokemijske i fiziološke karakteristike stanica. Također utječe i na sastav i brojnost morskih fitoplanktonskih zajednica (Paytan i McLaughlin 2007, Benitez-Nelson 2000).

Fosfor u mora primarno dolazi dotokom rijeka s kopna u otopljenom i partikularnom obliku, a nastaje otapanjem minerala iz stijena i tla pri doticaju s atmosferom i vodom te djelovanjem organizama (Benitez-Nelson 2000). Na udaljenim oceanskim područjima iznimno je bitan donos aerosolom, vulkanskim pepelom te mineralnom prašinom (Benitez-Nelson 2000). Zbog antropogenog donosa fosfora često dolazi do promjena u omjerima N i P te se koncentracije N značajno povise u odnosu na koncentraciju fosfora. Ovo dovodi do toga da su brojni morski okoliši postali P limitirani što dokazuju brojne studije (Ivančić i sur. 2021, Barcelos e Ramos i sur. 2017, Powley i sur. 2017, Tyrrell 1999, Harrison i sur. 1990).

Neke vrste fitoplanktona vrlo su osjetljive na raspoloživost P, što utječe na fiziološke performanse i biokemiju (npr. fotosintetska učinkovitost, biovolumen, rast i dr.). Također utječe na sastav i brojnost zajednica morskog fitoplanktona (Ivančić i sur. 2012, Paytan i McLaughlin 2007, Benitez-Nelson 2000). Istraživanja sjevernog Jadrana pokazala su da su ponašanje i rast fitoplanktona uglavnom određeni temperaturom, svjetlošću i sposobnošću vrsta da se nose sa promjenjivom dostupnošću fosfora koja uključuje i vrijeme nedostatka

anorganskog fosfora (Marić Pfannkuchen i sur. 2018, Ivančić i sur. 2012). U nedostatku anorganskog fosfora, dijatomeje poput *Chaetoceros peruvianus* (Smodlaka Tanković i sur. 2018a, Ivančić i sur. 2016) mogu koristiti organski fosfat za preživljavanje. Jedan od mehanizama za korištenje organskog fosfata iz okoliša je sinteza izvanstaničnog enzima alkalne fosfataze (AP) koja defosforilira otopljene organske fosforne spojeve poput nukleinskih kiselina i fosfolipida (Price i Morel 1990) što odcijepljene fosfate čini dostupnim stanicama (Hoppe 2003). Uz gore spomenute mehanizme, dijatomeje su također razvile dodatne strategije koje im pomažu da prežive u uvjetima ograničenim P. Kad su pod stresom, mnoge dijatomeje akumuliraju lipide. Akumulacija lipida dio je općeg odgovora na nedostatak hranjivih soli, čime se metabolizam preusmjerava s proizvodnje biomase na skladištenje energije. U P limitiranim uvjetima stanice su razvile sposobnost zamjene fosfolipida nefosfolipidima što rezultira smanjenim sadržajem fosfolipida u staničnim membranama (Gašparović i sur. 2014, Gašparović i sur. 2013, Van Mooy i sur. 2009). Ograničena dostupnost anorganskog fosfora može dodatno utjecati na sintezu pigmenata. Pretpostavlja se da kada nedostaje fosfora, sinteza pigmenta prestaje jer stanice više nisu u stanju sintetizirati i transkribirati RNA, što rezultira smanjenim staničnim koncentracijama klorofila *a* (Alipanah i sur. 2018, Pan i sur. 1996, Lombardi i Wangersky 1991, Finenko i Krupatkina-Akinina 1974). Konačno, neke dijatomeje značajno mijenjaju svoju morfologiju (izdužene stanice, duže sete i sl.) u P limitiranim uvjetima (Smodlaka Tanković i sur. 2018a). Pretpostavlja se da je promjena morfologije posljedica gore spomenutih fizioloških reakcija i čini se da služi kao prilagodba pri nadmetanju za organski fosfat. Sve u svemu, brojne su vrste fitoplanktona, ograničene anorganskim fosforom, razvile brojne prilagodbe kako bi preživjele dulja razdoblja nepovoljnih uvjeta. Detaljna ispitivanja fizioloških prilagodbi na razini vrsta gotovo uvijek zahtijevaju *in vitro* eksperimentalne analize koje omogućuju rast vrsta u kontroliranim uvjetima koji simuliraju određene okolišne uvjete kako bi identificirali mehanizme prilagodbi organizama na te uvjete te ih usporedili sa uvjetima u okolišu (Smodlaka Tanković i sur. 2018a).



## 2.3. Prilagodbe dijatomeja na limitaciju anorganskim fosforom

### 2.3.1. Skladištenje anorganskog fosfora

Dijatomeje kao i mnogi drugi fitoplanktonski organizmi posjeduju mogućnost skladištenja i akumuliranja fosfor u vakuolama u obliku ortofosfata (Ketchum 1939) ili polifosfata (polyP) (Dyhrman i sur. 2012), linearnih polimera ortofosfatne kiseline, koja sadrži tri do nekoliko stotina polimernih jedinica (Oró i sur. 1990). Polifosfat kao polimer je energetska rezerva, obzirom na to da je fosfodieterska veza ista kao i kod ATP molekule. Kod većine mikroorganizama količina ovih polimera je niža u uvjetima nedostatka fosfora, a više kada fosfora ima u izobilju (Kulakovskaya 2014) ali to nije slučaj kod svih vrsta dijatomeja. Primjer je dijatomeja *Thalassiosira pseudonana* kod koje se polifosfati skladište kada se vrsta nađe u P stresnim uvjetima (Dyhrman i sur. 2012), a ne samo kada anorganskog fosfora ima u izobilju.

Dijatomeje imaju različite načine unosa, iskorištavanja i zadržavanja anorganskog fosfora u stanicama. Neke vrste višak fosfora ispuštaju natrag u okoliš, obzirom na iznimno učinkovite mehanizme unosa. Također, neke vrste kao što je *Chaetoceros pseudocurvisetus* potencijalno mogu skladištiti fosfor ali je dokazano da ne sadrže značajne količine ortofosfata ili polifosfata u svojim vakuolama, već u uvjetima nedostatka fosfora stvaraju trajne spore. Ovakav mehanizam se povezuje sa smanjenjem vakuolarnog prostora na račun formiranja trajnih spora (Hargraves 1983). Za razliku od njih, vrste kao što je *Asterionella formosa* ne stvaraju trajne ciste ali u nepovoljnim uvjetima mogu pohraniti velike količine fosfora (Miyata i sur. 1986, Mackereth 1953). Vrste koje imaju manje učinkovite mehanizme unosa fosfora, kao što je *Thalassiosira weissflogii* (Donald i sur. 1997), u uvjetima kad fosfora ima u izobilju, sav uneseni fosfora zadržavaju u stanicama i skladište ga. Ovakve prilagodbe posebno su značajne u okolišima sa povremeno dostupnim višim koncentracijama anorganskog fosfora i čestim razdobljima nedostatka istog.

### 2.3.2. Stvaranje trajnih stadija (spora)

Neke dijatomeje, kao što su vrste rodova *Chaetoceros*, *Leptocylindrus*, *Ditylum* (Pitcher 1990, French III i Hargraves 1985, Garrison 1981, Davis i sur. 1980, Ikari 1926) u nepovoljnim okolišnim uvjetima (npr. nedostatak anorganskog fosfora) stvaraju spore. Morfološki, spore se od vegetativnih stanica razlikuju po tome što su jako silificirane (Hargraves 1976). Tako na primjer vrste *Chaetoceros pseudocurvisetus*, *C. compressus* (Oku i Kamatani 1995) i *Stephanopyxis palmeriana* (Drebes 1966) u eksperimentalnim uvjetima počinju stvarati spore kada je fosfor u mediju potpuno potrošen. Tijekom faze stvaranja spora

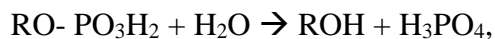
potrošnja silikata se nastavlja, što dokazuje da je stanicama potrebna velika količina silikata kako bi stvorile jako silificirane spore (Oku i Kamatani 1995, Drebes 1966). Na ovaj način neke dijatomeje prilikom nepovoljnih dana, mjeseci ili godina osiguravaju preživljavanje i opstanak svoje vrste u nepovoljnim uvjetima.

### **2.3.3. Sastav lipida i proteina**

Kada su u stresnim uvjetima, mnoge dijatomeje akumuliraju lipide. Akumulacija lipida je dio generalnog odgovora na stres hranjivim solima pri čemu je metabolizam preusmjeren iz produkcije biomase u skladištenje energije (Fields i sur. 2014). Neke dijatomeje, kao što je *Phaeodactylum tricornutum*, značajno povećavaju ukupnu količinu masnih kiselina u stanicama kada se nađu u P limitiranim uvjetima, dok im se brojnost stanica smanjuje (Alipanah i sur. 2018, Siron i sur. 1989). Obzirom da dijatomeje unutar svojih stanica sadrže standardne unutrastanične sustave, kao što su endoplazmatski retikulum (ER), jezgrinu ovojnicu, Golgijevo tijelo, trans-Golgijevu mrežu, plazmatsku membranu, mitohondrije obavijene dvostrukim membranama, plastide obavijene s četiri membrane, a sve navedene membrane, međuostalim građene od lipida, upravo za njihovu izgradnju dijatomeje koriste velike količine fosfora uzetog iz prirode. U uvjetima kada nema dovoljno fosfora, stanice su razvile mogućnost zamjene fosfolipida s ne fosfolipidima (Gašparović i sur. 2014, Gašparović i sur. 2013, Van Mooy i sur. 2009). Tako naprimjer vrsta *Thalassiosira pseudonana* u P limitiranim uvjetima fosfolipid fosfatidilkolin (PC) zamjenjuje sa betaine lipidom diacylglycerol-carboxyhydroxymethylcholine (DGCC) koji u sebi sadrži dušik, a fosfatidilglicerol sa sulfolipidom sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) (Martin i sur. 2011, Van Mooy i sur. 2009). Kod vrste *Phaeodactylum tricornutum* tijekom Limitacije fosforom dolazi do smanjenja svih fosfolipida, uključujući PC i fosfatidilglicerol (PG), a povećava se količina nefosfolipida sintetiziranih na unutarstaničnim membranama (diacylglycerol-hydroxymethyl-N,N,N-trimethyl-L-alanine (DGTA)) i u plastidima (digalactosyldiacylglycerol (DGDG) i SQDG) (Abida i sur. 2015). Ove promjene značajno utječu na biosintezu proteina te razinu fosforiliranih metabolita koji mogu utjecati na brojne metaboličke funkcije, uključujući rast i mogućnost fotosintetiziranja.

#### 2.3.4. Enzim alkalna fosfataza

Fosfataze su enzimi koji hidroliziraju fosfatne estere ili prevode otrofosfat iz jedne organske skupine u drugu. Fosfomonoestrase hidroliziraju monoestere fosforne kiseline,



i klasificirani su kao kisela ili alkalna fosfataza ovisno o pH pri kojem je njihova aktivnost najvisa. Mnoge vrste morskih algi proizvode alkalnu fosfatazu kada se nađu u uvjetima sa smanjenom dostupnošću fosfora. .

Ovaj proces se kod nekih organizama odvija na površini stanice, kod nekih unutar stanice, dok se kod nekih odvija i izvan i unutar stanica. Obzirom na to da je ovaj proces iznimno energetski zahtjevan većina organizama sintetizira ekstracelularnu AP u uvjetima limitacije fosforom. Ekstracelularne fosfataze cijepaju fosfatni nastavak od otopljenih organskih fosfornih spojeva kao što su fosfo šećeri, nukleinske kiseline i fosfolipidi (Price i Morel 1990).

Stoga u nedostatku anorganskog fosfora, dijatomeje kao što su *Chaetoceros peruvianus* (Smodlaka Tanković i sur. 2018a), *Thalassiosira pseudonana* (Dyhrman i sur. 2012), *Thalassiosira weissflogii* (Zhou i sur. 2016) i mnoge druge, mogu koristiti organski fosfat kako bi opstale u okolišu. Kod nekih fitoplanktonskih vrsta kao što su *P. multiseris* (Pan i sur. 1996), *Gamberidiscus polynensis* (Chinain i sur. 2010), *Karlodinium veneficum* (Fu i sur. 2010), *Prymnesium parvum* (Beszteri i sur. 2012), *Protoceratium reticulatum* (Röder i sur. 2012) i druge, postoji značajna korelacija između proizvodnje toksičnih spojeva i aktivnosti alkalne fosfataze (APA). Michaelis-menten kinetika ovog enzima različita je kod svake pojedine vrste. Ovisno o tome da li je  $K_M$  vrijednost visoka ili niska, možemo pretpostaviti da li enzim ima visoki ili niski afinitet prema supstratu. Ukoliko je  $K_M$  vrijednost visoka, vjerojatno je da je enzim djelotvoran u situacijama kada supstrata ima u izobilju i obrnuto, što upućuje na to da je niska  $K_M$  vrijednost direktno povezana sa uspješnosti vrste da opstane u uvjetima kada je dostupnost organskog fosfata u moru niska.

### 2.3.5. Nukleinske kiseline i sastav pigmenata

Fosfor je jedan od glavnih esencijalnih hranjivih soli za *de novo* sintezu nukleinskih kiselina. Obzirom na to da je potreban za formiranje nukleotida koji tvore šećer-fosfatnu osnovu DNA i RNA lanaca, njegov nedostatak je povezan sa nemogućnošću sintetiziranja nukleinskih kiselina te repliciranja jezgrinog sadržaja (Latasa i Berdalet 1994). Obzirom da su RNA i DNA bogati izvori fosfora unutar stanice neke vrste kao što je *Phaeodactylum tricornutum* mogu koristiti fosfor iz degradiranih DNA i RNA molekula (Flynn i sur. 1986).

Različiti procesi koji se odvijaju u stanicama također utječu i na sintezu pigmenata. Pretpostavlja se da, kada je fosfor u nedostatku, sinteza pigmenata se zaustavlja iz razloga što stanice više nisu u mogućnosti sintetizirati RNA te također dolazi do prekida transkripcije DNA u RNA. Prilikom limitacije fosforom učestalo dolazi do sniženja koncentracije klorofila *a* po stanici, što je dokazano kod vrsta *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Pan i sur. 1996), *Chaetoceros glacialis* (Lombardi i Wangersky 1991), *Chaetoceros curvisetus*, *Skeletonema costatum* (Finenko i Krupatkina-Akinina 1974), *Phaeodactylum tricornutum* (Alipanah i sur. 2018) i *Thalassiosira weissflogii* (Liu i sur. 2011). Uz sniženje koncentracija klorofila *a* kod nekih vrsta prilikom fosfornog stresa dolazi i do sniženja koncentracija fukoksantina i diadinoksantina kao što je slučaj kod vrste *Phaeodactylum tricornutum* (Alipanah i sur. 2018).

### 2.3.6. Sinteza toksina

Lučenje toksina je kod nekih vrsta dijatomeja uvjetovano nepovoljnim uvjetima u moru, pa tako i nedostatkom P. Tako je kod vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Pan i sur. 1996) dokazano da se produkcija toksina domoične kiseline poklapa se sa niskim stopama rasta i ukupnim staničnim metabolizmom u uvjetima limitacije fosforom. Prilikom usporedbe visoke stope produkcije domoične kiseline u stacionarnoj fazi sa niskom stopom unosa hranjivih soli i visokim razinama ATPa Pan i sur. 1996 su zamjetili da sinteza domoične kiseline zahtjeva značajne količine ATPa kao izvor biogene energije. Kada je stopa rasta opala zbog limitacije fosforom koncentracija domoične kiseline je porasla kako u stanicama, tako i u okolnom mediju. Zaključili su da prilikom limitacije fosforom, stanične membrane nisu pravilno formirane zbog nedostatka fosfora potrebnog za formiranje lipidnih dvosloja koji su većinom građeni od fosfolipida. Iz tog razloga je transmembranski prijenos domoične kiseline poremećen te domoična kiselina može slobodno prolaziti kroz membrane (Pan i sur. 1996). Proizvodnja domoične kiseline i lipida zahtjeva uobičajene prekursore, ako što je acetyl-CoA u ranim fazama biosinteze (Pan 1994). U slučaju *P. multiseriis* prilikom limitacije

fosforom, ovi prekursori se vjerojatno koriste za produkciju domoične kiseline, a ne sintezu lipida, dovodeći do redukcije lipida (Pan i sur. 1996).

### **2.3.7. Rast, biomasa i mortalitet**

Nedostatak fosfora jedan je od važnijih abiotičkih stresora koji utječu na rast, biomasu i mortalitet fitoplanktonskih organizama, pa tako i dijatomeja. U usporedbi sa vrstama koje rastu u uvjetima s dovoljno hranjivih soli, prilikom limitacije fosforom neke vrste postižu veće brojnosti te ranije započinju eksponencijalnu fazu rasta, na neke limitacija ne utječe značajno, kako što je naprimjer *C. peruvianus* (Smodlaka Tanković i sur. 2018a), dok neke vrste postižu značajno manje brojnosti i ranije ulaze u stacionarnu fazu rasta od vrsta u medijima bogatim fosforom, kao što je vrsta *Phaeodactylum tricorutum* (Alipannah i sur. 2018).

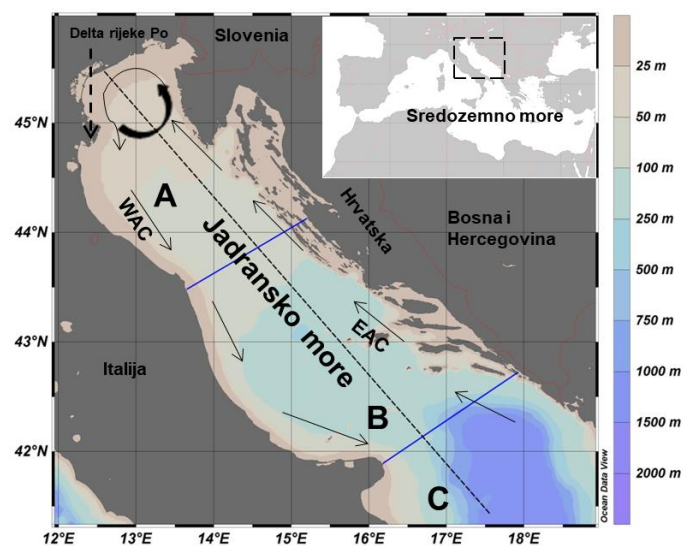
Usljed nedostatka fosfora može doći i do lize stanica kod nekih vrsta dijatomeja (Brussaard i sur. 1997). Primjer su vrste *Ditylum brightwellii* (Brussaard i Riegman 1998) i *Skeletonema marinoi* (Wang i sur. 2020) kod kojih je uočen značajan porast smrtnosti stanica u trenucima kada je koncentracija fosfora preniska.

### **2.3.8. Promjene u morfologiji**

Morfološke karakteristika dijatomeja su specifične za pojedinu vrstu. Isto tako stanice dijatomeja su jako adaptivne i pod različitim uvjetima okoliša može doći do različitih morfoloških promjena. Eksperimentalno je dokazano da se neke dijatomeje značajno morfološki mijenjaju kada se nađu u P limitiranim uvjetima (Smodlaka Tanković i sur. 2018a). Također je poznato da se neke vrste u nepovoljnim uvjetima, zbog brojnih fizioloških čimbenika nisu u mogućnosti podijeliti, već im se dužina stanice značajno povećava. Tako je npr. kod vrste *Chaetoceros peruvianus* (rezultati prikazani u ovom doktorskom radu), perivalvarna os značajno duža te su sete značajno duže i šire u odnosu na stanice koje su rasle u uvjetima sa dovoljno fosfora (Smodlaka Tanković i sur. 2018a). Iznimno je malo istraživanja koja opisuju promjene u morfologiji ovisno o uvjetima i od ključne je važnosti provesti istraživanja na mnogim drugim vrstama kako bi što bolje znali kako pojedina vrsta izgleda u pojedinim uvjetima u okolišu, kao što je Limitacija fosforom.

## 2.4. Sjeverni Jadran

Jadransko more dijeli se na tri regije: sjeverni, srednji i južni Jadran. Longitudinalno ga dijelimo na istočni i zapadni Jadran. Sjeverni Jadran ima tipične karakteristike plitkomorskih sustava (dubina <50m) koji su pod stalnim utjecajem sezonskih promjena saliniteta i temperature. Jedan od čimbenika koji utječe na takve promjene je sezonski dotok rijeke Po koja ima značajan utjecaj na cjelokupnu cirkulaciju Jadranskog mora. Utjecaj dotoka riječne vode vidi se u ljetnim mjesecima duž površinskog sloja većeg dijela zapadnog Jadrana, dok se voda većeg saliniteta sa izvorištem u Jonskom moru istočno jadranskom strujom kreće duž istočne obale (Orlić i sur. 1992). (Slika 8)



**Slika 8.** Jadransko more: dubina (skala u boji) i podjela na sjeverni (do 50 m), srednji (270 m) (B) i južni (1200 m) (C) (plave linije), smjer glavnih površinskih struja (EAC – Istočno Jadranska Struja, WAC – Zapadno Jadranska Struja) (strelice), podjela na istočni i zapadni dio Jadranskog mora (isprekidana linija), Lokacija rijeke Po (isprekidana strelica)

Sjeverni Jadran najsjevernije je područje Mediterana. Visoko je produktivan, plitki, morski ekosustav koji se odlikuje izraženim prostorno-vremenskim ekološkim gradijentima (Ivančić i sur. 2016, Ivančić i sur. 2012), a slivno područje mu je visoko razvijeni sjeverni dio Italije s razvijenom industrijom i poljoprivredom (Degobbis i Gilmartin 1990). Zapadno Jadranska Struja (WAC) prenosi hranjive soli iz sjevernog u južni Jadran duž zapadne obale Jadranskog mora (Zavatarelli i sur. 1998). Razdoblje kada je dotok slatke vode ograničen (Socal i sur. 2008) imaju značajan utjecaj na sastav fitoplanktonskih zajednica na ovom području. Uz smanjenje saliniteta rijekama, povremeno Istočno Jadranska Struja (EAC) donosi vodu visokog saliniteta iz južnog u sjeverni dio Jadranskog mora (Giani i sur. 2012).

Slijedom toga, formiraju se izraziti prostorno-vremenski ekološki gradijenti, te je sjeverni Jadran područje izvrsno za eksperimente o utjecaju fosora na zajednicu mikrofitoplanktona. (Marić i sur. 2012). Nizom nedavnih studija okarakterizirana je dostupnost fosfata kao glavni pokretač razvoja zajednica mikrofitoplanktona (brojnost i sastav) (Marić Pfannkuchen i sur. 2018, Smoldaka Tanković i sur. 2018a, Ivančić i sur. 2016).

Na području sjevernog Jadrana postoji vremenska sukcesija dva različita hidrodinamička obrasca.

Prvi hidrodinamički obrazac koji se odvija zimi (studen i – ožujak) karakteriziran je intenzivnim gubitkom topline na granici more-zrak. U kasnu jesen i ranu zimu topliji površinski sloj vodenog stupca se hladi, a atmosferske promjene i jaki vjetrovi potom izmješaju cijeli vodeni stupac otvorenog dijela sjevernog Jadrana (Franco i Michelato 1992) te dolazi do izotermije. Zimi se stvara gusta voda (Zore-Armanda 1963), gdje se njena jezgra nalazi uz zapadnu obalu gdje se formira vodena „vena“ koja teče duž priobalnih izobata (Zoccolotti i Salusti 1987). Takva voda teče do kanjona uz obalu Barija gdje tone, izravna se te se istovremeno vodeni stupac snažno miješa (Bignami i sur. 1990a, Bignami i sur. 1990b). Vena se dijeli na dvije grane, od kojih se jedna ulijeva u Jabučku kotlinu, dok druga teče prema Palagruškom pragu (Zoccolotti i Salusti 1987).

U ostatku godine odvija se drugi obrazac kojeg karakterizira stratifikacija vodenog stupca na slojeve vode različite gustoće, zbog vertikalnih promjena temperature i saliniteta. Tijekom razdoblja stratifikacije vidljiv je i jaki utjecaj rijeke Po što se očituje sniženim salinitetom te se ta voda može proširiti po cijelom području sjevernog Jadrana (Cushman-Roisin i sur. 2013, Bignami i sur. 2007). U proljeće i ljeto je cirkulacija u cijelom sjevernim Jadranom poluzatvorena (Degobbis i sur. 2000, Artegiani i sur. 1997). Tijekom ovog prioda stvaraju se ciklonalni i anticiklonalni regionalni vrtlozi koji ne dopuštaju oticanje vode nižeg saliniteta prema južnom Jadranu te je smanjena izmjena vode sa srednjim Jadranom (Krajcar 2003). Ovi vrtlozi se povećavaju u ljetnim mjesecima te dolazi do zamjene Istočne Jadranske Struje (EAC) sa sjeveroistočnom Istarskom obalnom protustrujom (ICCC) (Supić i sur. 2000). U ovom razdoblju dolazi do temperaturne stratifikacije koja se postepeno povećava od proljeća s maksimumom u kolovozu kao rezultat akumulacije topline u površinskim slojevima (Franco i Michelato 1992). U ovakvim uvjetima duž zapadne obale formira se površinska voda nižeg saliniteta koja se širi prema istočnoj obali sve do Istre te na taj način dodatno povećava stratifikaciju vodenog stupca. U jesen ponovo počinje destabilizacija vodenog stupca.

U posljednjih nekoliko desetljeća uočen je trend smanjenja dotoka rijeke Po (Djakovac i sur. 2012, Mozetić i sur. 2012, Cozzi i Giani 2011), a neki autori ovakav trend predviđaju i u

budućnosti (Pedro-Monzonís i sur. 2016, Coppola i sur. 2014). Sukladno tome dolazi do smanjenja donosa hranjivih soli (čak 50-70%) (Cozzi i Giani 2011), povećanja površinskog saliniteta, smanjenja klorofila *a*, sniženja koncentracija anorganskog fosfora, a istodobno i do povišenja koncentracija anorganskog dušika, zbog čega dolazi do promjena u njihovim omjerima (Grilli i sur. 2020, Djakovac i sur. 2012, Giani i sur. 2012, Mozetič i sur. 2010, Solidoro i sur. 2009).

## **2.5. Sezonska sukcesija hranjivih soli u sjevernom Jadranu**

Razlike u koncentracijama hranjivih soli u različitim dijelovima sjevernog Jadrana rezultat su riječnog utjecaja, sezonske hidrodinamike te njihovog iskorištenja od strane fitoplanktona, a time i dijatomeja (Socal i sur. 2002).

U zimskom i proljetnom razdoblju protok rijeke Po značajno je povećan zbog topljenja snijega u Alpama i zbog povećanja količine padalina. U proljeće, povećanjem insolacije dolazi do stratifikacije (raslojavanja) vodenog stupca zbog povećanja temperature površinskog sloja te riječnog dotoka. Ovakva situacija je izraženija uz zapadnu obalu sjevernog Jadrana (Socal i sur. 2002, Degobbis i sur. 2000). U ovom razdoblju često dolazi do naglog povećanja brojnosti fitoplanktona. Povećanje brojnosti fitoplanktona izraženije je u zapadnom dijelu koji je pod izravnim utjecajem riječne vode. U ostatku sjevernog Jadrana također dolazi do porasta brojnosti fitoplanktona ali u manjoj količini, zbog uzdizanja hranjivih soli regeneriranih u pridnenom sloju od kasne jeseni do rane zime. Kao posljedica naglog porasta gustoće dolazi do snižene koncentracije hranjivih soli (Socal i sur. 2002, Degobbis i sur. 2000), ali se one nadoknađuju povećanim dotokom riječne vode (Degobbis i sur. 2000). Nitrati, kao dominantna forma anorganskog dušika, negativno koreliraju sa salinitetom, dok su za razliku od njih silikati pozitivno koreliraju. Za razliku od nitrata koncentracije fosfata su često niske ( $<0.05 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ), bez obzira na salinitet i jačinu dotoka riječne vode (Socal i sur. 2002).

U ljetnim razdobljima kada dolazi do povećanja temperature i povećanja količine svjetlosti također može doći do povećane brojnosti fitoplanktonskih organizama. Ovo razdoblje karakterizirano je poluzatvorenim cirkulacijom (Degobbis i sur. 2000). Tijekom ovog razdoblja, utjecaj rijeke Po na hranjive soli je posebno izražen te dolazi do formiranja trofičkog gradijenta na ovom području. Koncentracija anorganskog dušika u vodama rijeke Po značajno je viša nego koncentracija fosfata. Rezultat toga je visoki anorganski N:P omjer koji se konstantno povećavao od 31 u razdoblju 1968-1984 (Marchetti i sur. 1985) na 60 u razdoblju 1989-1990 (Tartari i sur. 1991) te do oko 100 u novije vrijeme (Milan i sur. 2003)



što je značajno više od Redfieldovog omjera 16 (Redfield i sur. 1963). Zbog poluzatvorene cirkulacije riječna voda i produkti povećane primarne produkcije rasprostranjeni su po cijelom sjevernom Jadranu sve do rane jeseni. Iz ovog razloga se vrijednost saliniteta u površinskim slojevima stupca smanjuje, bez obzira na smanjenje protoka rijeke Po, a koncentracija hranjivih soli u površinskom sloju dolazi do godišnjeg minimuma (Degobbis i sur. 2000).

U jesenskom razdoblju ponovo dolazi do povećanja riječnog dotoka, usporedno s tim ponovo se uspostavlja i dominantno ciklonalno strujanje. U ovom razdoblju dolazi do povećanja površinskog saliniteta gotovo cijelog područja, izuzev dijelova koji su pod izravnim riječnim utjecajem. Također dolazi do vertikalnog miješanja vodenog stupca radi hlađenja površinskog sloja. Uslijed vertikalnog miješanja dolazi do uzdizanja hranjivih soli, koji se tijekom ljeta i rane jeseni akumuliraju u pridnenim slojevima. Zbog njihovog donosa u površinske slojeve, dolazi do novog povećanja brojnosti fitoplanktona, pa tako i dijatomeja.

U kasnu jesen i ranu zimu protok rijeke Po često doseže godišnji minimum, a prevladavajuća ciklonalna struja duž zapadne obale odnosi vodu niskog saliniteta prema srednjem i južnom Jadranu (Degobbis i sur. 2000).

## **2.6. Sezonska sukcesija fitoplanktona sjevernog Jadrana**

Fitoplankton sjevernog Jadrana izrazito je osjetljiv na varijacije u koncentracijama hranjivih soli (Socal i sur. 2002). Obzirom na to da je svaka sezona karakterizirana različitim hidrokemijskim uvjetima, dolazi do sezone sukcesije fitoplanktonskih vrsta te razlika u njihovim brojnostima (Bernardi Aubry et al., 2004).

U razdoblju kasne jeseni i rane zime područje sjevernog Jadrana karakterizirano je niskim temperaturama i niskim vrijednostima biomase fitoplanktona (Socal i sur. 2008, Bernardi Aubry i sur. 2004). U ovom razdoblju dominantna skupina su nanoflagelati (62% i 52%) i dijatomeje (25% i 47%) (Bernardi Aubry i sur. 2004). S nastavkom zime sve do ranog proljeća s porastom temperature zraka dolazi do progresivnog zagrijavanja površinskih slojeva vode. U ovom razdoblju povećava se i dotok vode niskog saliniteta s kopna (Socal i sur. 2008) što rezultira povišenjem koncentracija hranjivih soli. Iz tog razloga dolazi do naglog povećanja brojnosti dijatomeja (84% ukupne brojnosti) i pojava njihovog cvjetanja (Marić i sur. 2012, Bernardi Aubry i sur. 2004), a samim time i pojave maksimuma primarne produkcije (Socal i sur. 2008). U ovom razdoblju dominantne dijatomeje su vrste roda *Skeletonema*, kao što su vrste *Skeletonema costatum* (Bernardi Aubry i sur. 2004) i *Skeletonema marinoi*, zatim *Chaetoceros danicus*, *Neocalyptrella robusta* te *Thalassiosira*

*rotula* (Godrijan i sur. 2013). Uz dijatomeje u zimskom razdoblju maksimalnu brojnost postižu i kokolitoforide (Godrijan i sur. 2013, Viličić i sur. 2009). (Slika 9)

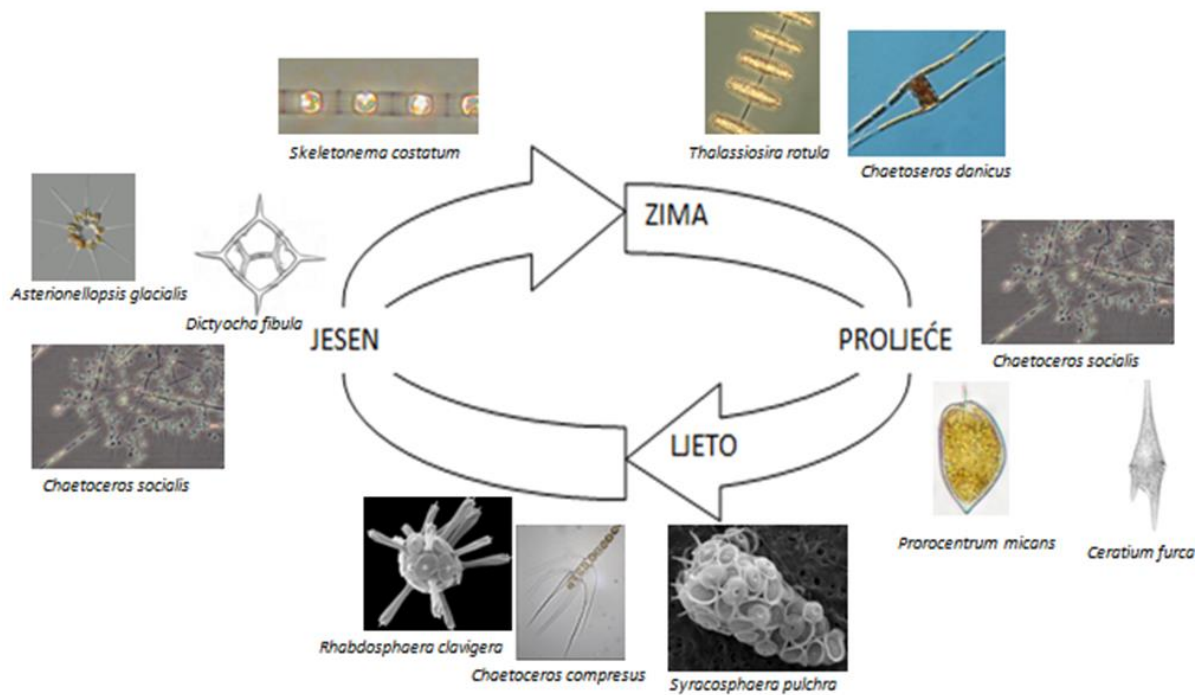
U proljeće je područje uz zapadnu obalu sjevernog Jadrana karakterizirano povećanim dotokom rijeka, pada vrijednost saliniteta, povećanja količine hranjivih soli što rezultira povećanjem brojnosti fitoplanktona. Od dijatomeja u ovom razdoblju su najbrojnije *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros socialis*, *Pseudo-nitzschia delicatissima* grupa i *Thalassiosira* sp. (Bernardi Aubry i sur. 2004). Na području istočne obale sjevernog Jadrana u ovo doba godine svoj maksimum postižu dinoflagelati. Uz dinoflagelate također povećava se i brojnost mikroplanktona, a povremeno dolazi i do dominacije nanoplanktona (70% od ukupnog planktona), uglavnom kokolitoforida i kriptofita (Godrijan i sur. 2013, Marić i sur. 2012). Ovakva situacija nastavlja se i u ranim ljetnim mjesecima (Marić i sur. 2012, Viličić i sur. 2009). Uz već spomenute vrste, za ovo razdoblje su također značajne vrste *Chaetoceros thronsdensii*, vrste roda *Ceratium* (*C. furca*, *C. tripos*, *C. fusus*), *Leptocylindrus minimus*, *Prorocentrum micans* te *Pseudosolenia calcar-avis* koje su tipične proljetne vrste istočnog dijela sjevernog Jadrana (Godrijan i sur. 2013) ali i *Chaetoceros socialis* koji je uz zapadnu obalu sjevernog Jadrana tipična proljetna vrsta (Bernardi Aubry i sur. 2004), dok je uz istočnu obalu karakteristična jesenska vrsta (Godrijan i sur. 2013). (Slika 9)

U ljetnom razdoblju na području cijelog sjevernog Jadrana daljnjim porastom temperature te porastom saliniteta radi slabijeg dotoka rijeka, poglavito rijeke Po dolazi do sniženja koncentracija hranjivih soli. Bez obzira na sniženu koncentraciju, hranjivih soli je i dalje dovoljno za održavanje visoke biomase fitoplanktona. U ranijim ljetnim mjesecima brojnost dijatomeja se smanjuje, a nano- i dinoflagelati postaju učestaliji (Marić i sur. 2012, Bernardi Aubry i sur. 2004). Glavninu populacije dinoflagelata na području uz zapadnu obalu sjevernog Jadrana čine vrste *Ceratium fusus*, *Gymnodinium* sp., *Prorocentrum micans* i *Prorocentrum minimum* (Bernardi Aubry i sur. 2004), uz istočnu obalu sjevernog Jadrana doprinos dinoflagelata fitoplanktonskoj zajednici je manji u odnosu na zapadnu obalu to se uglavnom radi o vrstama rodova *Ceratium*, *Dinophysis* i *Prorocentrum*. Doprinos dijatomeja na ovom području po nekim je istraživanjima ponekad viši od 50% (Godrijan i sur. 2013). Sredinom ljetnog razdoblja može doći do naglog porasta dijatomeja sa dominantnim vrstama *Ceratulina pelagica*, *Chaetoceros compressus* i *Proboscia alata*, iz razloga što dominiraju velike vrste s relativno velikim udjelom ugljika, može doći do nepodudaranja maksimuma brojnosti i biomase (Bernardi Aubry i sur. 2004). Osim već spomenutih vrsta, vrste koje su karakteristične za ovo razdoblje godine su i *Chaetoceros affinis*, *Chaetoceros vixvisibilis* koja je u srpnju 2009. godine napravila bloom radi širenja vode iz rijeke Po po cijelom sjevernom

Jadrana, *Hemiaulus hauckii*, *Proboscia alata*, *Rhabdosphaera clavigera* i *Syracosphaera pulchra* (Godrijan i sur. 2013, Bernardi Aubry i sur. 2004). (Slika 9)

U jesenskom razdoblju na području uz zapadnu obalu sjevernog Jadrana dolazi do povišenja koncentracije hranjivih soli, naglog pada temperature, smanjenja sunčevog zračenja te zbog takvih uvjeta, bez obzira na količinu hranjivih soli može doći do opadanja brojnosti fitoplanktona. U ovom razdoblju raste flagelatna frakcija, a od dijatomeja su često prisutne vrste *Asterionellopsis glacialis*, *Leptocylindrus danicus*, *Lioloma pacificum* i *Skeletonema grevillei* (Marić Pfannkuchen i sur. 2018, Godrijan i sur. 2013, Bernardi Aubry i sur. 2004). Ukoliko neku godinu dođe do uvjeta koji pogoduju rastu fitoplanktonskih organizama, može doći do cvjetanja mo, kao što je zabilježeno 2004. godine na području cijelog sjevernog Jadrana. Došlo je do sezonskog hlađenja vode, remineralizacije hranjivih soli koji su doneseni na površinu pri čemu su se pomiješali sa dotokom hranjivih soli i došlo je do cvjetanja fitoplanktona (Socal i sur. 2008). Na području istočne obale u ovom razdoblju dolazi do godišnjih pikova nanoplanktona, a u kasnim jesenskim mjesecima i dijatomeja i mikroplanktona (Marić i sur. 2012). Ovakva jesenska cvjetanja mora u izravnoj su vezi sa prekidom stratifikacije što dozvoljava podizanje hranjivih soli iz pridnenih slojeva na površinu morske vode (Godrijan i sur. 2013). Osim već spomenutih vrsta, za ovo razdoblje su također značajne vrste *Calciosolenia murray*, *Chaetoceros socialis*, *Dictyocha fibula*, *Ophiaster hidroideus* te *Paralia sulcata* (Godrijan i sur. 2013). (Slika 9)

Uz vrste koje se pojavljuju u određenim sezonama postoji određeni broj vrsta prisutnih tokom cijele godine, s većom ili manjom brojnošću, neke od njih su kokolitoforida *Emiliana huxleyi* i dijatomeje *Ceratulina pelagica*, *Chaetoceros brevis*, *C. curvisetus*, *C. decipiens*, *Dactiliosolen fragilissimus*, *Guinardia flacida*, *G. striata*, *Rhizosolenia imbricata* te *Thalassionema nitzschoides* (Godrijan i sur. 2013). (Slika 9)



**Slika 9.** Sezonska sukcesija fitoplanktonskih vrsta u sjevernom Jadranu

### **3. CILJEVI I HIPOTEZE**

#### **3.1. Ciljevi**

1. Okarakterizirati prilagodbe odabranih vrsta dijatomeja sjevernog Jadrana na prostorno-vremenske promjene koncentracija hranjivih soli (fosfora) u ekosustavu.
2. Opisati pojedine strategije odabranih vrsta dijatomeja sjevernog Jadrana za svladavanje limitacije fosforom te korištenje tih strategija u nadmetanju za resurse unutar prirodnih fitoplanktonskih zajednica.
3. Povezati dobivene rezultate sa dugoročnim promjenama u cilju boljeg razumijevanja dinamike i ekologije određene vrste te njene prilagodbe na klimatske promjene u Sjevernom Jadranu.

#### **3.2. Hipoteze**

1. U *in vitro* uvjetima limitacije fosforom stanice dijatomeja odgovaraju promjenama koje se očituju u brzini rasta, smanjenoj fluorescenciji i broju plastida, aktivacijom enzima alkalne fosfataze kao i morfološkim promjenama frustule. Morfološke promjene stanice mogu izaći iz okvira opisa vrste.
2. Pojedine vrste dijatomeja različitim prilagodbama na uvjete limitacije fosforom zauzimaju svoju ekološku nišu u fitoplanktonskoj zajednici sjevernog Jadrana.
3. Sjeverni Jadran je primjer modelnog ekosustava u kojem nalazimo različite ekološke uvjete na relativno malom geografskom području te ga kao takvog smatramo jako dobrim okolišem za ovaj tip istraživanja.

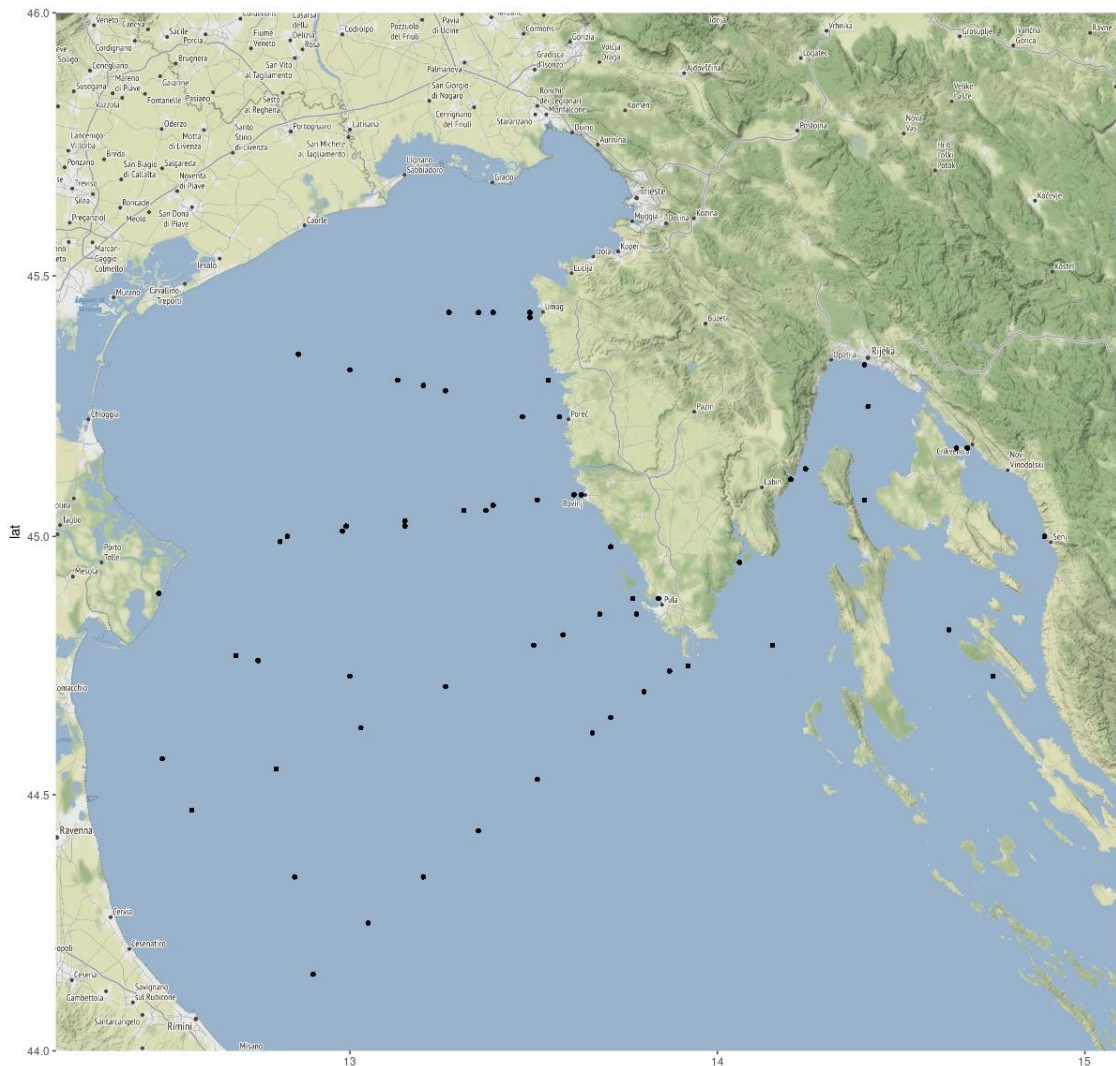
## **4. MATERIJALI I METODE**

U sklopu projekta „Životne strategije fitoplanktona u sjevernom Jadranu“ financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2014-09-6563) sveukupno je istraženo 30 različitih fitoplanktonskih vrsta, od toga je bilo 29 dijatomeja i jedan dinoflagelat. Za izradu ovog doktorata koristila sam devet od 29 istraženih vrsta dijatomeja. Vrste istraživane u ovom doktoratu odabrane su obzirom na podjelu dijatomeja na radijalne centrice, multipolarne centrice, arafidne penate i rafidne penate (Kooistra i sur. 2007). Za skupine radijalne centrice, arafidne penate i rafidne penate odabrane su po dvije vrste, dok su za skupinu multipolarnih centrica odabrane tri vrste. Za svaku odabranu vrstu provedena je statistička analiza podataka iz Baze dugoročnih podataka Centra za istraživanje mora u Rovinju te eksperimentalne analize određenih parametara.

### **4.1. Statističke analize podataka iz Baze dugoročnih podataka Centra za istraživanje mora u Rovinju, Institut Ruđer Bošković**

#### **4.1.1. Prostorna i vremenska rasprostranjenost fitoplanktonskih vrsta**

Za izradu prostorne i vremenske rasprostranjenosti odabranih vrsta dijatomeja u ovom doktoratu su korišteni podaci iz Baze podataka o dugoročnim podacima Centra za istraživanje mora u Rovinju, Institut Ruđer Bošković (Degobbis i sur. 2000, Viličić i sur. 2002, Kraus i sur. 2016, Marić Pfannkuchen i sur. 2012, Mozetič i sur. 2010). Baza podataka sadrži brojne podatke za različite parametre, među kojima su i podaci o brojnosti fitoplanktonskih organizama u razdoblju od 1972. do 2017. godine. Od 2014. do 2017. godine, baza podataka je nadopunjena i sa podacima analiza uzoraka koje sam samostalno obradila. U ovom doktoratu iz baze podataka su korišteni su svi podaci vezani za odabrane fitoplanktonske vrste na kojima su se radile i eksperimentalne analize. Korišteni su podaci od sveukupno 9618 analiziranih uzoraka na 84 postaje, od kojih sam samostalno analizirala 550 uzoraka sa 39 postaja na području cijelog sjevernog Jadrana sjeverno od geografske širine 44°N (Slika 10).



**Slika 10.** Postaje uzorkovanja na kojima su prikupljeni uzorci za kvantitativnu i kvalitativnu analizu fitoplanktona u razdoblju od 1972. do 2017. godine (Baza podataka o dugoročnim podacima Centra za istraživanje mora u Rovinju, Institut Ruđer Bošković)

Za svaki uzorak analiziran je udio određene vrste u mikrofitoplanktonskoj zajednici i njihova ukupna brojnost. Udio u mikrofitoplanktonskoj zajednici izračunat kao ukupna brojnost mikrofitoplanktona podijeljena s brojnošću određene vrste. Podaci su grupirani na dva načina, jedan je prostorno uvjetovan, na način da prikazuje postaje uzorkovanja na kojoj je kroz godine zabilježena određena vrsta, s prikazom ukupne brojnosti te vrste i njenim doprinosom u mikrofitoplanktonskoj zajednici na pojedinoj postaji. Drugi način je vremenski uvjetovan, na način da su podaci grupirani po mjesecima s prikazom doprinosa određene vrste ukupnoj brojnosti mikrofitoplanktona.

#### 4.1.2. Taksonomska identifikacija i kvantitativna analiza fitoplanktonske zajednice svjetlosnim mikroskopom

Uzorkovanja su se u početku provodila Van Dornovim, a kasnije Niskinovim crpcima zapremnine 5 litara na dubinama od 0, 5, 10, 20, 30 m (gdje je to moguće) i dva metra od dna. Prikupljeni uzorci fitoplanktona (200 mL) korišteni za kvantitativnu analizu fiksirani su neutraliziranim formaldehidom (konačna koncentracija 2%) ili otopinom neutralnog lugola. Uzorci su analizirani u poduzorcima od 50 ml nakon 40 h sedimentacije u komoricama za sedimentaciju. Brojnost stanica određena je brojanjem stanica pomoću svjetlosnog inverznog mikroskopa, Zeiss Axiovert 200, sljedeći Utermöhlovu metodu (Utermöhl 1958). Stanice su brojane u vidnim poljima i transektima pomoću faznog kontrasta na način da se prvo broje stanice 2-20  $\mu\text{m}$  u pola ili cijelom transektu na povećanju od 400x. Zatim se stanice mikroplanktona broje na jednom ili dva cijela transekta na povećanju od 200x, a nakon toga se na povećanju od 100x pregleda cijela komorica i na taj način broje velike stanice male abundancije. Ukoliko se neka vrsta pojavljuje u izrazito velikom broju, takva vrsta se može brojati metodom nasumično odabranih probnih polja na povećanju od 200x. Točnost brojanja ovom metodom iznosi  $\pm 10\%$ . Ovako dobivene vrijednosti preračunavaju se u broj stanica po litri morske vode (stanice  $\text{L}^{-1}$ ) prateći sljedeću formulu:

$$\text{stanice } \text{L}^{-1} = N \times (A_t/A_c) \times 1000/V$$

V – sedimentacijski volumen (mL)

$A_t$  – površina komorice za brojanje ( $\text{mm}^2$ )

$A_c$  – površina transekta ( $\text{mm}^2$ )

N – broj stanica izbrojanih za pojedinu vstu (Edler i Elbrächter 2010)

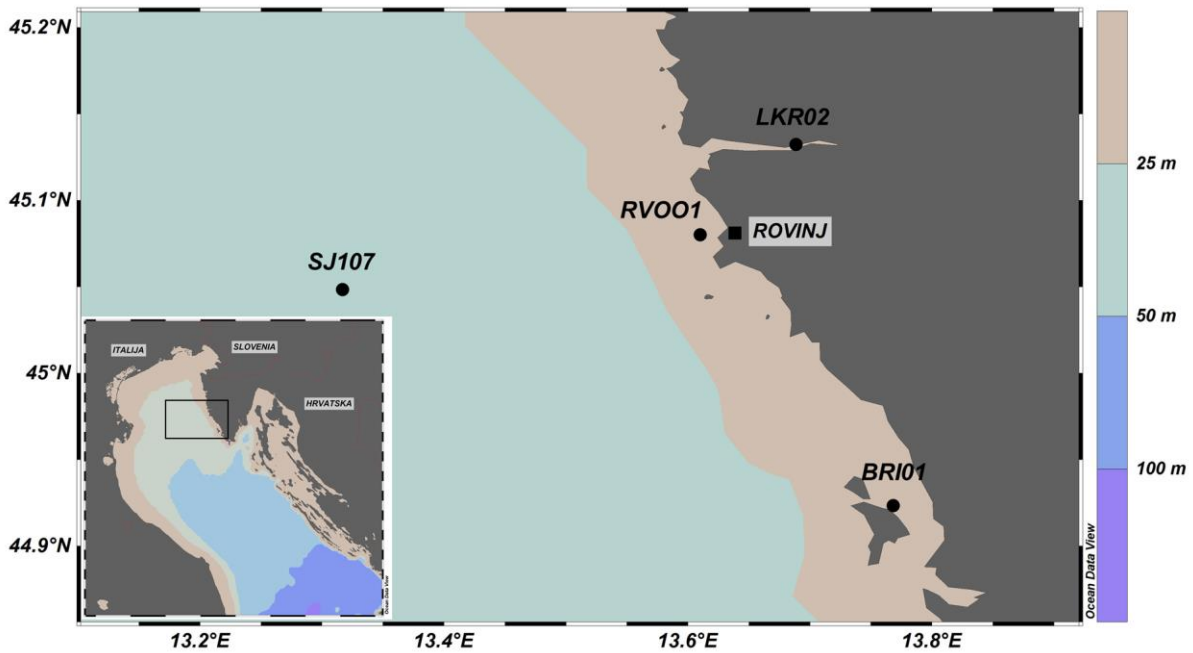
Da bi se vrste taksonomski identificirale svjetlosnim mikroskopom korišteni su standardni ključevi i priručnici za identifikaciju morskog fitoplanktona koji poblizje opisuju morfološke karakteristike pojedinih vrsta: Identifying marine phytoplankton, Tomas 1997. (Tomas 1995) i Fitoplankton Jadranskog mora: biologija i taksonomija, Viličić 2002. (Viličić 2002) i drugi kao što su (Horner 2002, Bérard-Therriault i sur. 1999, Hasle i Syversten 1995, Thronsen 1993, Round i sur. 1990, Hustedt 1930).



## 4.2. Eksperimentalne analize

### 4.2.1. Uzorkovanje i uspostavljanje monoklonalnih kultura

Uzorci korišteni za uspostavljanje monoklonalnih kultura korištenih za eksperimentalne analize prikupljeni su u sjevernom Jadranu (NA) na postajama RV001 (45°04' N, 13°36' E), SJ107 (45°02' N, 13°19' E), LKR02 (45°07' N, 13°41' E) i BRI01 (44°55' N, 13°46' E) (Slika 11, Tablica 1).



Slika 11. Područje uzorkovanja: označene su postaje (RV001, SJ107, LKR02 i BRI01) na kojima su uzeti uzorci korišteni za uspostavu monoklonalnih kultura.

Uzorci za uspostavu monoklonalnih kultura prikupljeni su fitoplanktonskom mrežom, promjera otvora 50 cm, duljine 2,50 m, veličine oka 52  $\mu\text{m}$ . Mreža se povlačila vertikalno s dubine od 15 m do površine. Izolacija vrsta se vršila ručno, mikropipetama iz živih mrežnih uzoraka izolirajući jednu stanicu ili jedan lanac stanica. Određivanje vrsta vršilo se na invertnom svjetlosnom mikroskopu Axiovert 200 (Zeiss GmbH, Oberkochen, Njemačka). Monoklonalne kulture uzgajane su u F/2 mediju pipravljenom prema (Guillard 1975) u sterilnim bočicama za uzgoj organizama, volumena 40 ml u inkubacijskoj komori (Memmert ICH110, Njemačka) na 16°C i 75  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  s fotopedriodom 12:12 h svjetlo-tama. Medij je pripremljen s morskom vodom iz sjevernog Jadrana koja je stajala u mraku minimalno dva mjeseca. Takva morska voda filtrirana je dva puta kroz MF-Millipore™ membranski filter, veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore Ltd.) i sterilizirana prokuhavanjem u mikrovalnoj pećnici (Keller i sur. 1988). U sterilnu morsku vodu dodaju se

određeni volumeni hranjivih soli  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ , metali u tragovima i vitamini (Guillard 1975). Monoklonalne kulture pridružene su Zbirci kultura Centra za istraživanje mora u Rovinju pod brojevima CIM856, CIM857, CIM859, CIM863, CIM869, CIM874, CIM876, CIM915 i CIM965 (Tablica 1). Kada su kulture došle u fazu ekspanzijskog rasta, bile su spremne za molekularnu identifikaciju vrsta i *in vitro* eksperimentalnu fazu.

**Tablica 1.** Popis istraživanih kultura sa postajama i datumom uzorkovanja

ŠIFRA KULTURE	DATUM UZORKOVANJA	POSTAJA UZORKOVANJA	KOORDINATE	
			Zemljopisna širina	Zemljopisna dužina
CIM856	12.12.2016	RV001	45°04' N	13°36' E
CIM857	17.11.2016	RV001	45°04' N	13°36' E
CIM859	27.01.2016	RV001	45°04' N	13°36' E
CIM863	04.11.2016	LKR02	45°07' N	13°41' E
CIM869	27.01.2017	SJ107	45°02' N	13°19' E
CIM874	04.10.2017	SJ107	45°02' N	13°19' E
CIM876	20.11.2017	RV001	45°04' N	13°36' E
CIM915	13.11.2018	LKR02	45°07' N	13°41' E
CIM965	15.01.2021	BRI01	44°55' N	13°46' E

#### 4.2.2. Taksonomska identifikacija vrsta molekularnim metodama

Za taksonomsku identifikaciju staničnih kultura molekularnim metodama, korištenih za eksperimentalne analize, korišteno je barkodiranje sa tri molekularna markera (barkoda) (Tablica 2): 5' krajnja regija velike podjedinice ribuloza bisfosfat karboksilaze (*rbcL*), V4 regija 18S rDNA i D1-D3 regija 28S rDNA. Stanične kulture (25 - 40 mL) korištene u eksperimentima filtrirane su na 1,2  $\mu\text{m}$  celuloznom filtru (Merck Millipore) i pohranjene na -80°C do daljnje obrade. Genomska DNA izolirana je koristeći kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) umnoženi su barkodovi specifičnim početnicama: *rbcL* sa *rbcL66+* (5'-TTAAGGAGAAATAAATGTCTCAATCTG-3') i *DtrbcL3R* (5'-ACACCGWACATACGCATCCA-3') (MacGillivray i Kaczmaraska 2011, Alverson 2008), 18S sa *D512* (5'-ATTCCAGCTCCAATAGCG-3') i *D978* (5'-GACTACGATGGTATCTAATC-3') i 28S sa *D1R* (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3') i

D3Ca (5'-ACGAACGATTTGCACGTCAG-3') (Zimmermann i sur. 2011). Reakcijska smjesa (25  $\mu$ L) sadržavala je 200  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> svakog dNTP-a (deoksiribonukleotid trifosfata), 0,3  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> svake početnice, 4 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1x DreamTaq zelenog pufera, 0,2 U DreamTaq DNA polimeraze (Thermo Scientific) i 5 ng genoma DNK. PCR uvjeti bili su sljedeći: početna denaturacija od 10 minuta na 95°C, 33 ciklusa po 30 s na 95°C, 30 s na 52°C i 1 min na 72°C te završna elongacija od 7 min na 72 ° C. Umnoženi PCR produkti pročišćeni su koristeći kit MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Pročišćeni PCR produkti poslani su na uslugu Sanger sekvenciranja u Macrogen Europe (Nizozemska). Dobivene sekvence obrađene su i analizirane koristeći bioinformatički program Geneious 7.1.7. softvera (Kearse i sur. 2012). Mrežni alat BLAST (Basic Local Alignment Tool) (Altschul i sur. 1997) je korišten za pretraživanje i usporedbu s referentnim sekvencama u bazi podataka GenBank, NCBI (Clark i sur. 2016).

**Tablica 2.** Barkodovi korišteni za taksonomsku identifikaciju vrsta molekularnim metodama

BARKOD	NAZIV POČETNICE	SEKVENCA POČETNICE
<i>rbcL</i>	rbcL66+	5'-TTAAGGAGAAATAAATGTCTCAATCTG-3'
	DtrbcL3R	5'-ACACCCWGACATACGCATCCA-3'
V4 regija 18S	D512	5'-ATTCCAGCTCCAATAGCG-3'
rDNA	D978	5'-GACTACGATGGTATCTAATC-3'
D1-D3 regija 28S	D1R	5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3'
rDNA	D3Ca	5'-ACGAACGATTTGCACGTCAG-3'

#### 4.2.3. Identifikacija vrsta kombinacijom molekularnih metoda i svjetlosne mikroskopije

Kulture iz Zbirke kultura Centra za istraživanje mora u Rovinju određene su do razine vrste kombinacijom opisanih molekularnih metoda i svjetlosnom mikroskopijom.

Kulture CIM869 i CIM874 svjetlosnim mikroskopom su određene do razine roda kao *Leptocylindrus* spp. Glavne karakteristike ovog roda su: dugačke cilindrične stanice međusobno usko povezane vanjskom stranom valvi u lance. Središnji dio valve je blago konkavan ili ispupčen (Tomas 1995). Ove dvije kulture molekularno su određene do razine vrste pomoću 18S i *rbcL* barkoda. CIM869 određena je kao *Leptocylindrus aporus*, dok je CIM874 određena kao *L. hargravesii*.

Kultura CIM857 svjetlosnim mikroskopom i barkodovima 18S i 28S određena je do razine vrste kao *Chaetoceros decipiens*. Na svjetlosnom mikroskopu vidjelo se da su lanci

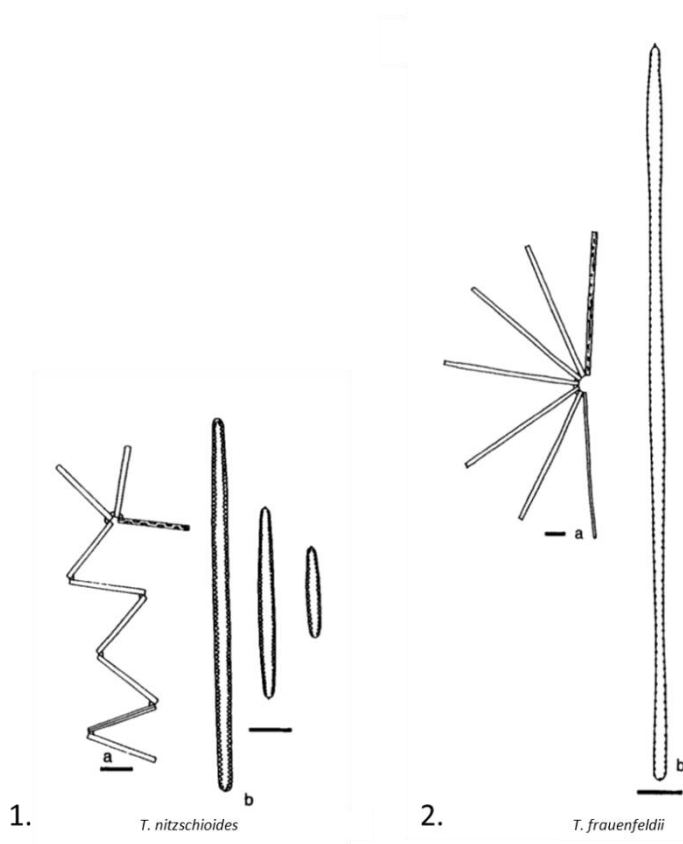
ravni i čvrsti, da kutovi valvi dodiruju kutove susjedne stanice, aperture su bile široke, susjedne sete su djelomično bile spojene po dužini, nakon čega se perivalvarno granaju. Završne sete su bile deblje od ostalih te se pri početku udaljavaju jedna od druge, zatim su savijene i paralelne sa osi lanca. Navedene karakteristike odgovarale su opisu vrste u Eversen i Hasle 1975 (Evensen i Hasle 1975).

Kultura CIM863 također je svjetlosnim mikroskopom i barkodovima 28S i *rbcL* određena do razine vrste kao *Chaetoceros peruvianus*. Na svjetlosnom mikroskopu vidjelo se da su stanice heterovalvarne, gornja valva bila je zaobljena dok je donja bila ravna. Sete na gornjoj valvi izlazile su približno iz centra valve perivalvarno usmjere. Na izlazu iz valve sete su se dodirivale, nakon čega su se granale te spuštale u suprotnom smjeru prema donjoj valvi, ujedno se udaljavajući od valvi. Sete na donjoj valvi izlazile su iz ruba valve, blago su se širile prema vani. Izgled ove vrste odgovarao je opisu vrste u Koch i Rivera 1984 (Koch i Rivera 1984).

Kulture CIM859 i CIM915 svjetlosnom mikroskopijom su određene do razine roda kao *Pseudo-nitzschia* spp. Glavne karakteristike ovog roda su jako izdužene stanice koje su u centralnom dijelu stanice šire te se prema krajevima sužavaju bilo da se gleda valva ili cingulum (engl. *girdle view*). Lanci su stepenasti na način da im se krajevi valvi djelomično preklapaju (duljina dijela koji se preklapa razlikuje se od vrste do vrste i to je jedna od karakteristika vrste) (Tomas 1995). Ove dvije kulture molekularno su određene do razine vrste kao *P. delicatissima* (18S i 28S) i *P. calliantha* (18S, 28S, *rbcL*).

Kulture CIM856 i CIM965 u početku su svjetlosnim mikroskopom određene do razine roda kao *Thalassionema* sp. gledajući generalne karakteristike roda. Glavne karakteristike roda su pravokutne stanice ukoliko se gleda cingulum, ukoliko se gleda valva stanice variraju od blago proširenih u sredini (vretenaste) do linearnih ili izrazito proširenih u sredini i pri krajevima, također im jedan vrh može biti zaobljen a drugi se blago sužavati. Stanice mogu biti izopolarne ili heteropolarne. Mogu se krajevima valvi povezivati u „cik-cak“ i/ili „lepezaste“ kolonije koje povezuje organska tvar (Tomas 1995). Obzirom na izgled kolonije i veličinu stanica (Slika 12) koristeći svjetlosni mikroskop pretpostavili smo da je kultura CIM856 *T. frauenfeldii* što se molekularnom identifikacijom potvrdilo pomoću barkodova 18S, 28S i *rbcL*. Kultura CIM965 morfološki prema izgledu lanaca i stanica odgovara vrsti *T. nitzschoides*. Trenutno sekvence za barkodove 18S, 28S i *rbcL* nisu dostupne za *T. nitzschoides*, odnosno navedeni barkodovi za tu vrstu još uvijek nisu sekvencirani. Sekvence kulture CIM965 su različite od sekvence vrste *T. frauenfeldii* što bi odgovaralo morfološkoj

identifikacij kao *T. nitzschoides*. Iz tog razloga kulturu CIM965 u ovom doktoratu nazivam *Thalassionema cf. nitzschoides*.



**Slika 12.** Shematski prikaz veličinskih odnosa i formacija kolonija koje tvore vrste *Thalassionema nitzschoides* (1.), kolonija – cingularni pogled (a), valvarni pogled (b) i *T. frauenfeldii* (2.), kolonija – cingularni pogled (a), valvarni pogled (b). Mjerilo: 20 $\mu$ m [Izvor: (Tomas 1995)]

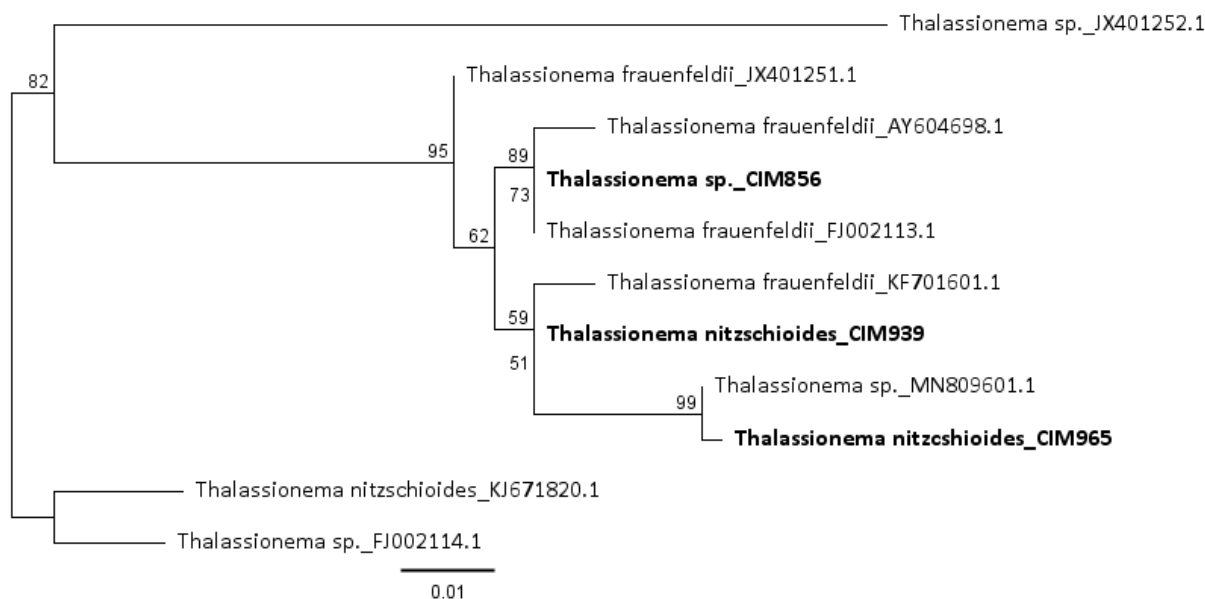
Kultura CIM876 je svjetlosnim mikroskopom određena do razine roda kao *Skeletonema* spp. Glavne karakteristike ovog roda su stanice čvrsto povezane u lance jako produženim tubularnim izdancima s potpornjem (engl. *strutted processes*) koji tvore rubni prsten na valvi. Obzirom na ovu jedinstvenu strukturu, lanci vrsta ovog roda se teško mogu zamijeniti s bilo kojom drugom dijatomejom. Ova kultura je do razine vrste određena korištenjem 18S barkoda.

Za sve kulture korištene u eksperimentima uspješno je umnožen i sekvenciran barem jedan od tri (18S, 28S i *rbcL*) korištena barkoda. Molekularna identifikacija kultura provedena je tako da je za svaki uspješno umnoženi barkod i svaku kulturu napravljena filogenetska rekonstrukcija pripadajućeg roda. Za filogenetsku rekonstrukciju roda korištene su sve dostupne referentne sekvence u javno dostupnoj bazi podataka GenBank (Clark, Karsch-Mizrachi et al. 2016). Na ovaj način je taksonomska identifikacija dijatomeja

molekularnim metodama (barkodiranjem) potvrdila za sve kulture taksonomsku identifikaciju svjetlosnim mikroskopom do razine roda (Tablica 3). Za kulture CIM857, CIM863 i CIM856 je barkodiranjem potvrđena identifikacija svjetlosnim mikroskopom do razine vrste dok je za kulture CIM869, CIM874, CIM876, CIM859 i CIM915 barkodiranje omogućilo dodatnu identifikaciju do razine vrste kad su te kulture svjetlosnim mikroskopom identificirane samo do razine roda. Samo je kulturu CIM965, svjetlosnom mikroskopijom identificiranu kao *Thalassionema nitzschoides*, barkodiranje ipak identificiralo tek do razine roda kao *Thalassionema* sp. jer filogenetskom rekonstrukcijom roda (Slika 13, Prilog 1) njena jedina uspješno umnožena barkod sekvenca (*rbcL*) ne pokazuje pripadnost grupi gdje se smješta poznata jedina referentna *T. nitzschoides rbcL* sekvenca (GenBank Acc.Number KJ671820) već CIM965 pripada drugoj grupi u kojoj pokazuje 99.8% identičnost sa referentnom sekvencom *Thalassionema* sp. (GenBank Acc.Number MN809601). Daljnja taksonomska identifikacija ove kulture CIM965 sa druga dva barkoda (18S i 28S) kao i elektronskim mikroskopom omogućit će pouzdaniju identifikaciju, ali do tada za potrebe ovog doktorskog rada kulturu CIM965 nazivamo *Thalassionema* cf. *nitzschoides*. Također, bolja pokrivenost baze podataka sekvencama roda *Thalassionema*, omogućit će u budućnosti pouzdaniju identifikaciju do razine vrste.

**Tablica 3.** Prikaz taksonomske identifikacije kultura metodom svjetlosne mikroskopije i molekularnom metodom barkodiranja te barkodovi korišteni za pojedinu vrstu

	SOJ	NAZIV VRSTE (identifikacija svjetlosnom mikroskopijom)	BARKOD	NAZIV VRSTE (molekularna identifikacija)
<b>RADIJALNE CENTRICE</b>	CIM869	<i>Leptocylindrus</i> spp.	18S i <i>rbcL</i>	<i>Leptocylindrus aporus</i>
	CIM874	<i>Leptocylindrus</i> spp.	18S i <i>rbcL</i>	<i>Leptocylindrus hargravesii</i>
<b>MULTIPOLARNE CENTRICE</b>	CIM857	<i>Chaetoceros decipiens</i>	18S i 28S	<i>Chaetoceros decipiens</i>
	CIM863	<i>Chaetoceros peruvianus</i>	28S i <i>rbcL</i>	<i>Chaetoceros peruvianus</i>
	CIM876	<i>Skeletonema</i> spp.	18S	<i>Skeletonema grevillei</i>
<b>ARAFIDNE PENATNE DIJATOMEJE</b>	CIM856	<i>Thalassionema frauenfeldii</i>	18S, 28S i <i>rbcL</i>	<i>Thalassionema frauenfeldii</i>
	CIM965	<i>Thalassionema nitzschooides</i>	<i>rbcL</i>	<i>Thalassionema</i> sp.
<b>RAFIDNE PENATNE DIJATOMEJE</b>	CIM859	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	18S i 28S	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>
	CIM915	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	18S i 28S	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>



**Slika 13.** Filogenetska rekonstrukcija (metoda najveće vjerojatnosti (Maximum likelihood - ML), supstitucijski model Kimura) roda *Thalassionema* na osnovu *rbcL* barkoda koristeći dostupne referentne sekvence iz GenBank baze podataka i sekvence kultura korištenih u eksperimentima fiziologije. Za GenBank sekvence je uz naziv vrste naveden i pripadajući GenBank pristupni broj, a nazivi sekvenci kultura CIM baze su označeni podebljano te je navedena identifikacija kulture svjetlosnim mikroskopom i pripadajući broj kulture u CIM bazi. Uz pripadajuće čvorove filogenetskog stabla navedene su vrijednosti samoučitavanja (“bootstrap”)

#### 4.2.4. Eksperimentalni dizajn

Kulture za eksperimentalne *in vitro* analize pripravljene su inokulacijom monoklonalnih kultura CIM856 (*Thalassionema frauenfeldii*), CIM857 (*Chaetoceros decipiens*), CIM859 (*Pseudo-nitzschia delicatissima*), CIM863 (*Chaetoceros peruvianus*), CIM869 (*Leptocylindrus aporus*), CIM874 (*Leptocylindrus hargravesii*), CIM876 (*Skeletonema grevillei*), CIM915 (*Pseudo-nitzschia calliantha*) ili CIM965 (*Thalassionema cf. nitzschioides*) u dva različita medija. Mediji su pripremani na isti način kao i medij korišten za uspostavu monoklonalnih kultura. Uvjeti bogati fosforom simulirani su F/2 medijem (Guillard 1975), a uvjeti stresa zbog nedostatka anorganskog fosfora simulirani su P limitiranim medijem (F/2 medij bez dodatka  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) (Smodlaka Tanković i sur. 2018a). Svaki od simuliranih uvjeta pratio se u tri primjerka (triplikatima). Svaki triplikat je pripremljen na način da se 1 mL pojedine određene kulture inokulirao u 200 mL određenog medija (F/2 ili P limitiranog). Tijekom cijelog eksperimentalnog razdoblja kulture su inkubirane u inkubacijskoj komori (Mettler ICH110, Njemačka) s ciklusom svjetlo-tamno od 12:12 h u sterilnim bočicama za uzgoj organizama od 250 mL na 16 °C i 75  $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Pripremljene kulture praćene su tijekom eksperimentalnog razdoblja koje se mijenjalo ovisno o vrsti, a trajalo je dok stanice u jednom od simuliranih uvjeta nisu ušle u stacionarnu fazu rasta, što je najčešće bilo dva tjedna. Mjereni parametri su: dinamika rasta, morfologija stanica, intenzitet fluorescencije klorofila, aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze i koncentracija otopljenog fosfata (Tablica 4). Dinamika rasta, intenzitet fluorescencije klorofila, APA i koncentracija otopljenog fosfata mjereni su svaki drugi dan (s razmakom od 48 h), dok su kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze mjereni samo zadnji dan eksperimenta. Morfološke analize su rađene na kraju eksponencijalne faze rasta stanica. Vrijednosti intenziteta fluorescencije klorofila i APA mjerene su fluorimetrijski, dok su koncentracije otopljenog anorganskog fosfata mjerene spektrofotometrijski. Za svaki od mjerenih parametara provedena su tri neovisna mjerenja u tri zasebne kulture svakog simuliranog uvjeta, a prikazani rezultati su prosjeci navedenih trostrukih mjerenja svakog simuliranog uvjeta. Prilikom analize krivulje rasta i duljine lanaca, brojevi stanica svih triplikata analizirani su zajedno te je izračunat prosjek.

**Tablica 4.** Prikaz svih kultura korištenih u eksperimentalnim analizama. Za svaku kulturu je prikazano trajanje eksperimenta (u danima) i parametri koji su mjereni za svaku pojedinu kulturu (+).

	TRAJANJE EKSPERIMENTA	DINAMIKA RASTA	MORFOLOGIJA STANICA	INTENZITET FLUORESCENCIJE KLOROFILA	APA	KINETIKA APA <sup>e</sup>	LOKALIZACIJA APA <sup>e</sup>	OTOPLJENI FOSFAT
	[dani]	Mjerenje provedeno svakih 48h	Mjerenje provedeno na kraju eksponencijalne faze rasta	Mjerenje provedeno svakih 48h	Mjerenje provedeno svakih 48h	Mjerenje provedeno zadnji dan eksperimenta	Mjerenje provedeno zadnji dan eksperimenta	Mjerenje provedeno svakih 48h
CIM856	14	+			+	+		+
CIM857	14	+			+	+		+
CIM859	11	+			+	+		+
CIM863	18	+	+		+	+	+	+
CIM869	17	+	+	+	+	+	+	+
CIM874	17	+	+	+	+	+	+	+
CIM876	19	+	+	+	+	+		+
CIM915	14	+		+	+	+		+
CIM965	17	+		+	+	+		+



### *Dinamika rasta*

Brojnost stanica i morfološke karakteristike stanica (duljine lanaca) analizirane svaki drugi dan u Sedgewick-Rafter komoricama za brojanje od 1 mL na mikroskopu Zeiss Axiovert 200. Izbrojano je najmanje 100 stanica ili najmanje 0.5 mL svakog triplikata kulture. Brojnost stanica izražena je kao stanice L<sup>-1</sup>, što je dobiveno na način da je broj stanica izbrojan u određenom volumenu preračunat je u stanice L<sup>-1</sup>. Analizom krivulje rasta u programu R studio prema modelu sigmoidalnog rasta izračunati su točka infleksije i najkraće generacijsko vrijeme.

### *Morfologija stanica*

Promjene u morfologiji između stanica koje su raste u različitim uvjetima viđene su kod četiri od devet istraženih vrsta u ovom doktoratu. Kod navedene četiri vrste provedene su detaljne morfološke analize na kraju faze eksponencijalnog rasta, kada su razlike bile najvidljivije. Poduzorci od 20 µL za svaku kulturu analizirani su DAPI bojanjem na epifluorescentnom mikroskopu Zeiss Axioimager, koristeći Zeissov set filtera 49 (engl. *filter set 49*) za epifluorescenciju, kao i fazni kontrast svijetlog polja za transiluminaciju. Analizirane su samo kulture bez bakterijske frakcije, veličine (0,2-3 µm) i DAPI pozitivnih čestica. Morfološke analize provedene su na fotografijama snimljenim svjetlosnim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, opremljenim Nomarskim diferencijalnim interferencijskim kontrastom (DIC), faznim kontrastom i optikom svijetlog polja. Svjetlosne mikrografije snimljene su digitalnom kamerom Zeiss AxioCam, a sva morfološka mjerenja izvršena su u programskom paketu Axiovision 4.8 (ZEISS, Oberkochen, Njemačka). Mjerene su dužine stanica (pervalvarna os), širine stanica, ukupna dužina seta i širina seta, ovisno o kojoj se vrsti radilo. Terminologija korištena za opis morfoloških značajki vrsta slijedila je Anonymous (Anonymous 1975) i Ross et al. (Ross i sur. 1979). Da bi opisali morfološke karakteristike vrsta kojima su rađene analize morfoloških promjena između dva različita uvjeta koristili smo se ključevima i znanstvenim člancima koji pobliže opisuju morfološke karakteristike svake pojedine vrste (Nanjappa i sur. 2013, Zingone i sur. 2005, Lundholm i sur. 2003, Viličić 2002, Tomas 1995).

### *Intenzitet fluorescencije klorofila*

Intenzitet fluorescencije klorofila mjeren je svaki drugi ili treći dan u crnim mikropločama s 96 jažica. Uzorci od 200 µL su pripremani u mračnom okruženju. Mjerenja su provedena na čitaču mikroploča (Infinite M200Pro, Tecan GmbH, Austrija) kojim je

mjeren intenzitet fluorescencije uz ekscitaciju na 460 nm i emisiju na 685 nm. Mjereni su triplicati svake kulture. Stanična fluorescencija klorofila izračunata je kao izmjerena fluorescencija klorofila podijeljena brojem stanica za svaki uzorak. Broj stanica svakog uzorka u jažicama dobiven je na način da je broj stanica u litri (objašnjeno u poglavlju 4.4.) preračunat u broj stanica u 200  $\mu\text{L}$ . Konačna vrijednost fluorescencije prikazana je kao srednja vrijednost pojedinog triplikata mjerenja za pojedinu kulturu.

#### *Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze*

Aktivnost enzima alkalne fosfataze (APA) *in vitro*, kao i sve druge analize mjerene su svakog drugog ili trećeg dana, kako je opisano u (Smodlaka Tanković i sur. 2018a, Ivančić i sur. 2016). Mjerenja su rađena u crnim mikropločama s 96 jažica. Supstrat 4-metilumbelliferyl fosfat (MUF-P, Sigma Aldrich, Njemačka) dodavan je kulturama s konačnim reakcijskim volumenom od 250  $\mu\text{L}$  i konačnom koncentracijom od 50  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (koncentracija zasićenja). Supstrat je pripremljen prema protokolu opisanom u (Hoppe 1983). Koncentracije produkta mjerene su neposredno nakon dodavanja supstrata i dalje nakon 10, 30 i 60 minuta reakcijskog vremena. Između svakog mjerenja, reakcijska smjesa u mikropločama inkubirana je na 16 °C kako bi se enzimatska aktivnost odvijala u istim uvjetima u kojima se uzgajaju kulture korištene za eksperimentalne analize. Intenzitet fluorescencije produkta mjeren je na spektrofluorimetru Tecan M200 Pro (ekscitacija na 365 nm i emisija na 460 nm). Izrađene su standardne krivulje s koncentracijama u rasponu od 0 do 0,923  $\mu\text{mol L}^{-1}$  za 4-metilumbelliferyl (MUF, Sigma Aldrich, Njemačka). Standardna krivulja potrebna je za izračun koncentracije produkta razgradnje MUF-P u jažicama s uzorkom. Rezultati su izraženi u  $\text{fmol h}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$ . Specifična APA (sAPA) u  $\text{fmol h}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$  dobivena je tako da je izračunata srednja vrijednost relativne fluorescencije pojedinog triplikata mjerenja za oba uvjeta rasta, izmjerena APA je podijeljena s brojem stanica u uzorku i preračunata u  $\text{fmol h}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$  po jažici pomoću standardne krivulje. Kao negativne kontrole korišteni su čisti F/2 i P limitirani medij, sterilna morska voda te deionizirana voda. APA je izražena je kao nagib enzimatske reakcije u vremenu od 100 min, a broj stanica u jažici dobiven je na način da je broj stanica u litri (objašnjeno u poglavlju 4.4.) preračunat u broj stanica u 200  $\mu\text{L}$ .

Kinetički parametri APAe mjereni su kada su kuture ušle u stacionarnu fazu rasta. Reakcijska smjesa pripremljena je u crnim mikropločama s 96 jažica u koje se dodavalo 200  $\mu\text{L}$  kulture i 8  $\mu\text{L}$  supstrata MUF-P. Supstrat se dodavao s 15 koncentracija između 0,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  i 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Koncentracije produkta mjerene su neposredno nakon dodavanja supstrata

i dalje nakon 10, 30 i 60 minuta reakcijskog vremena. Između svakog mjerenja, reakcijska smjesa u mikropločama inkubirana je na 16 °C. Također su kao negativne kontrole korišteni čisti F/2 i P-limit medij, sterilna morska voda te deionizirana voda. Intenzitet fluorescencije produkta mjeren je na spektrofluorimetru Tecan M200 Pro (ekscitacija na 365 nm i emisija na 460 nm). Izrađena je standardna krivulja s koncentracijama u rasponu od 0 do 0,923  $\mu\text{mol L}^{-1}$  za 4-metilumbelliferyl (MUF, Sigma Aldrich, Njemačka) koja je korištena za izračun koncentracija produkta enzimske reakcije u svakoj jažici. Michaelis-Mentenov model enzimatski katalizirane reakcije pokazuje da se pri niskim koncentracijama supstrata brzina enzimske reakcije naglo povećava te kada se približi maksimalnoj brzini ( $V_{\text{max}}$ ) enzima, brzina se usporava (Michaelis i Menten 1913). Ovim modelom izračunate su maksimalna brzina ( $V_{\text{max}}$ ) i Michaelis-mentenova konstanta ( $K_M$ ).

Lokalizacija APAe izvedena je pomoću ELF\_97 kompleta za otkrivanje endogene fosfataze (E6601) (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) kako je opisano u radovima (Ivančić i sur. 2016, Yamaguchi i sur. 2006, Lomas i sur. 2004). Žive stanice su bile inkubirane s ELF supstratom i analizirane Zeiss Axioimager epifluorescentnim mikroskopom. Autofluorescencija je pokazala količinu i lokalizaciju plastida (Filterset 14 Zeiss), a netopivi fluorescentni produkt APAe lokaliziran je pomoću posebno prilagođenog seta filtera (ekscitacija: 340/26, longsplitter 400 longpass, emisija 525/50).

### *Otopljeni fosfat*

Koncentracija otopljenog anorganskog fosfata određena je kolorimetrijskom metodom prema preporuci Stricklanda i Parsonsa (Strickland i Parsons 1972). Uzorci su pripremljeni u prozirnim mikrotitarskim pločama dodavanjem 200  $\mu\text{L}$  filtriranog medija u kojem su rasle kulture korištene u eksperimentima u 20  $\mu\text{L}$  miješanog reagensa (molibdat, sumporna kiselina, citrat i tartarat u omjeru 1:2.5:5:0.5). Konačni volumen u jažicama iznosio je 220  $\mu\text{L}$ . Za kalibraciju je korištena otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s koncentracijama u rasponu od 0,15 do 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Kao negativne kontrole koristili su se čisti mediji za uzgoj fitoplanktona (F/2 i P limitirani), sterilna morska voda i deionizirana voda. Mjerenja su provedena na čitaču mikroploča (Infinite M200Pro, Tecan GmbH, Austrija), a mjerila se apsorbancija na 889 nm. Unos staničnog fosfata izračunat je kao količina uklonjenog fosfata iz medija u kojem su rasle kulture. Za izračun brzina unosa fosfora je korištena brojnost stanica na dan mjerenja (donja granica) kao minimalna brzina i brojnost stanica na prijašnjem mjerenju (gornja granica) kao maksimalna brzina. Obzirom da ni broj stanica niti koncentracija supstrata ne ostaju konstantni između mjerenja stvarna brzina unosa mora biti između navedenih granicama.

### 4.3. Obrada podataka

Prostorna i vremenska rasprostranjenost analizirana je u softverskom programu R. Krivulje rasta analizirane su pomoću nelinearnog uklapanja uz pretpostavku sigmoidnog rasta paketima Growthcurver i Ggplot2 u softverskom programu R (Sprouffske i Wagner 2016, Team 2015, Fonda Umani i sur. 2005). Rezultati analiza kinetike APAe analizirani su u softverskom programu R (Ritz i sur. 2015). Višestruka analiza varijance provedena je pomoću funkcije MANOVA, a t-testovi (Welch's Two Sample t-test) izvedeni su pomoću funkcijskog t-testa osnovnog paketa programa R (Team 2015). Razina statističke značajnosti za različite parametre prikazana je s p-vrijednošću, gdje su značajne statističke razlike prikazane kao vrijednosti  $\leq 0,05$ .

## 5. REZULTATI

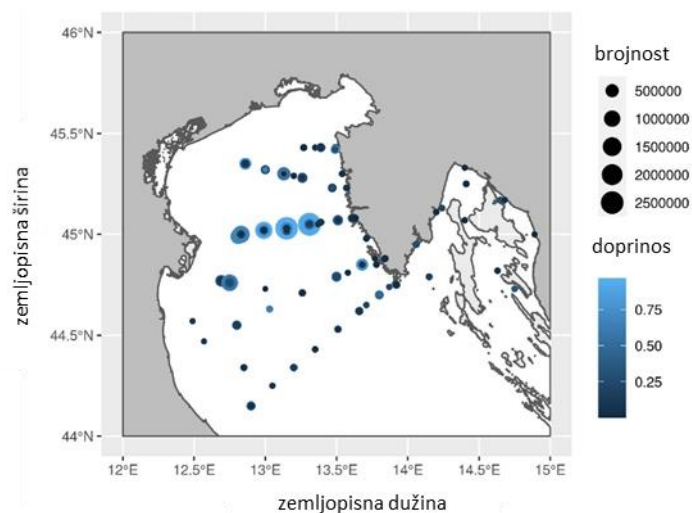
### 5.1. Statističke analize dugoročnog niza podataka prostorne i vremenske rasprostranjenosti odabranih vrsta dijatomeja

U nastavku su prikazani rezultati statističkih analiza podataka iz Baze dugoročnih podataka Centra za istraživanje mora u Rovinju odabranih vrsta dijatomeja.

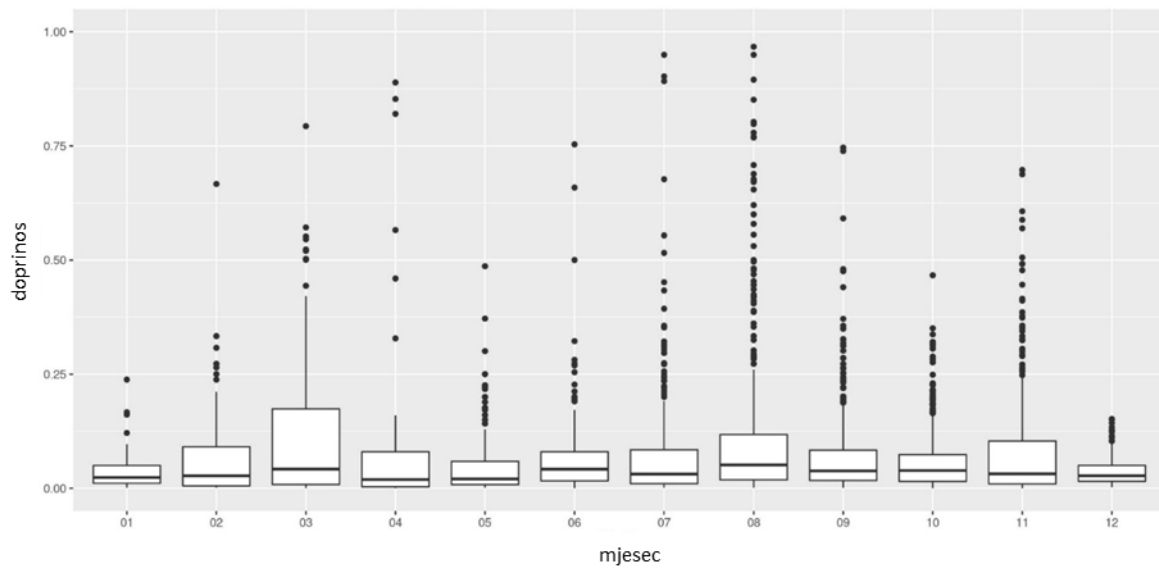
#### 5.1.1. Radijalne centrice

*Leptocylindrus* spp.

Sve vrste roda *Leptocylindrus*, u bazi podataka, grupirane su zajedno, obzirom da se u sklopu sustavnog monitoringa svjetlosnom mikroskopijom ne mogu nedvojbeno razlikovati te se nalaze pod *Leptocylindrus* spp. Analizirani podaci su pokazali da su vrste roda *Leptocylindrus* uočene u cijelom sjevernom Jadranu, imale su visoki doprinos u mikrofitoplanktonskoj zajednici, često preko 75%. Brojnost vrsta ovog roda kreće se u rasponu od  $5 \times 10^5$  do  $2,5 \times 10^8$  stanica  $L^{-1}$ . Visoka ukupna brojnost (Tcount) vrsta ovog roda zabilježena je na eutrofnom području sjevernog Jadrana (Slika 14). Redoviti povišeni doprinos ovih vrsta u mikrofitoplanktonskoj zajednici pojavljuje su u ožujku, kolovozu i studenom (Slika 15).



**Slika 14.** Postaje uzorkovanja. Nijanse plave boje označavaju relativni doprinos vrsta roda *Leptocylindrus* u mikrofitoplanktonskoj zajednici. Veličina točki označava ukupnu brojnost (Tcount) *Leptocylindrus* spp. u sjevernom Jadranu.

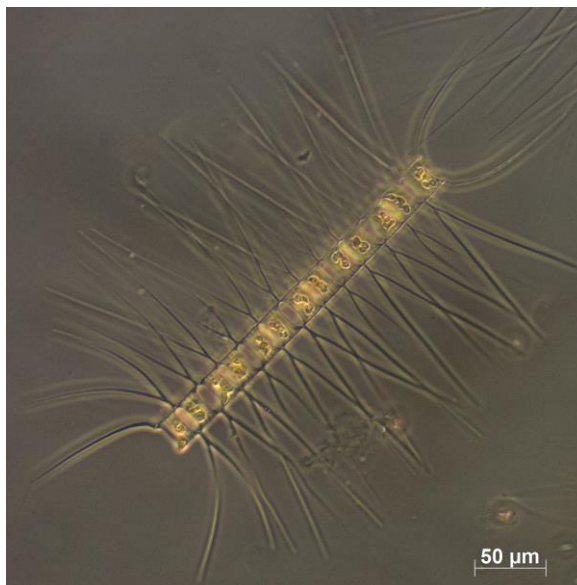


**Slika 15.** Doprinos vrsta *Leptocylindrus* spp. ukupnoj brojnosti mikrofitoplanktona kroz godinu.

### 5.1.2. Multipolarne centrice

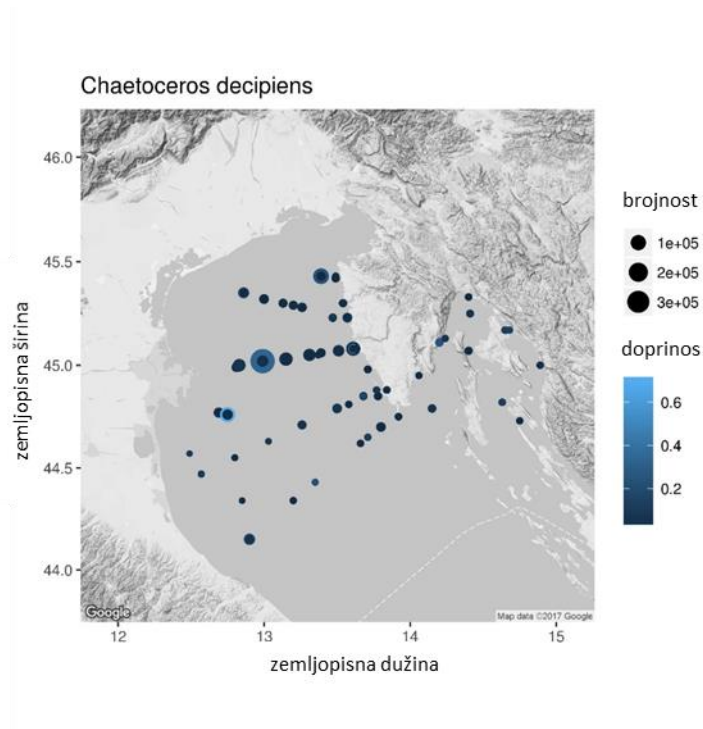
#### *Chaetoceros decipiens* Cleve 1873

Analizirani podaci pokazali su da se vrsta *C. decipiens* (Slika 16) pojavljuje se na većini postaja uzorkovanja u sjevernom Jadranu (Slika 17).

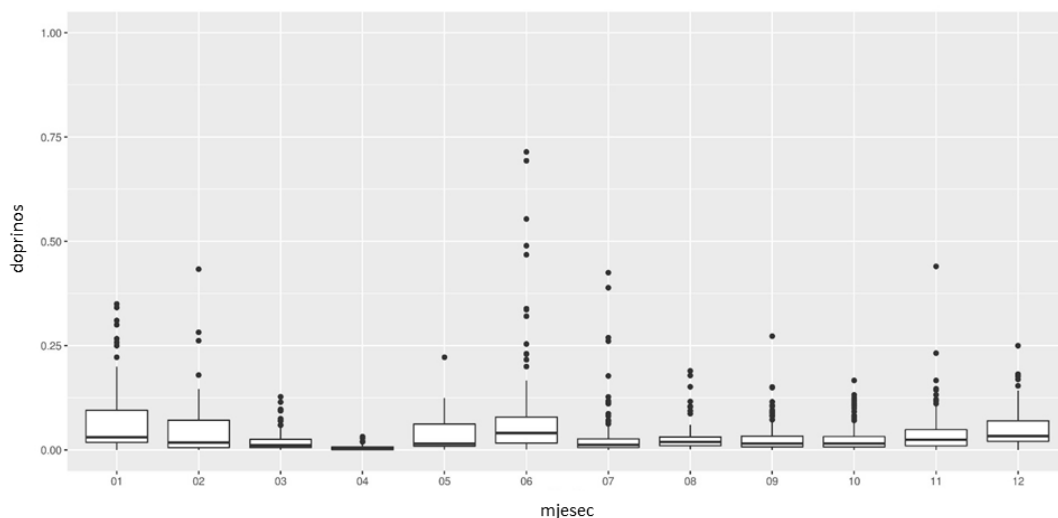


**Slika 16.** *C. decipiens* – svjetlosni mikroskop

Relativna brojnost ove vrste kreće se u rasponu od  $1 \times 10^5$  do  $3 \times 10^5$  stanica  $L^{-1}$ . Relativni doprinos u mikrofitoplanktonskoj zajednici rijetko prelazi 30%. Povećani doprinos podjednako je zabilježen u eutrofnijem području i u oligotrofnijim područjima (Slika 17). Relativni doprinos ove vrste u mikrofitoplanktonskoj zajednici nizak je tijekom cijele godine i gotovo nikad ne prelazi 30%, do blagog porasta dolazi u siječnju i lipnju (Slika 18).



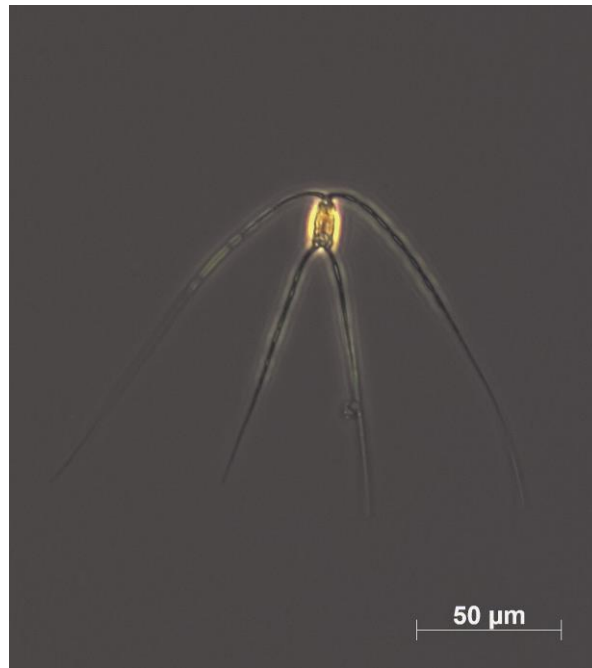
**Slika 17.** Postaje uzorkovanja. Nijanse plave boje označavaju relativni doprinos vrste *C. decipiens* u mikrofitoplanktonskoj zajednici. Veličina točki označava ukupnu brojnost (Tcount) *C. decipiens*. u sjevernom Jadranu.



**Slika 18.** Doprinos vrste *C. decipiens* ukupnoj brojnosti mikrofitoplanktona kroz godinu.

*Chaetoceros peruvianus* Brightwell 1856

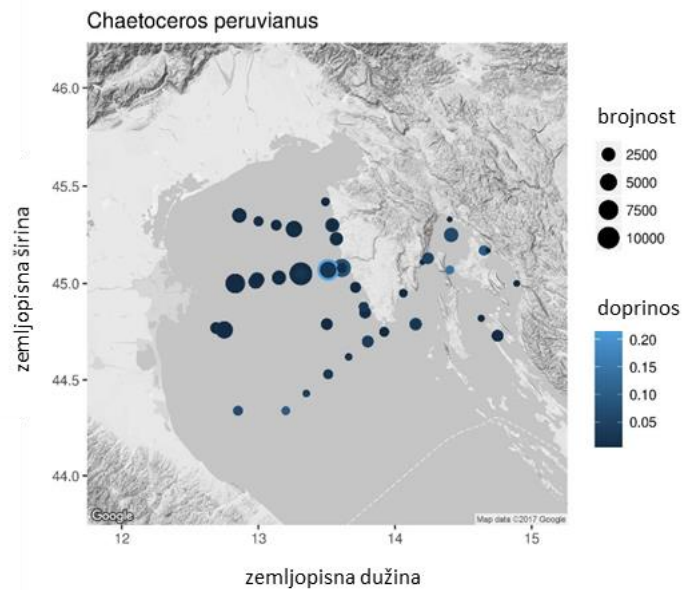
Podaci prostorne i vremenske rasprostranjenosti vrste *C. peruvianus* (Slika 19) pokazuju da se ova vrsta pojavljuje na većini postaja uzorkovanja u sjevernom Jadranu (Slika 20).



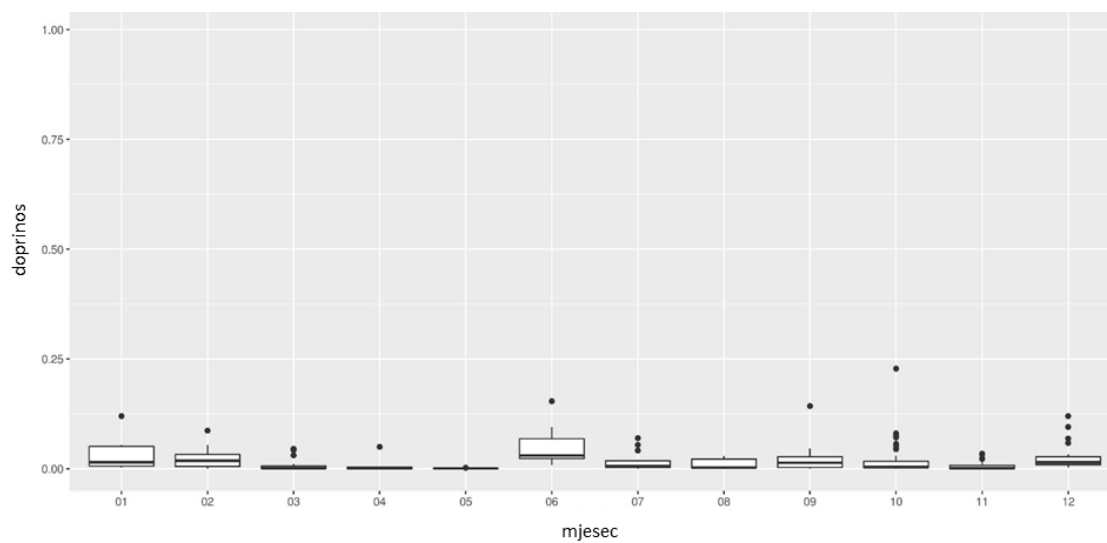
**Slika 19.** *C. peruvianus* – svjetlosni mikroskop

Relativna brojnost ove vrste kreće se u rasponu od  $2,5 \times 10^3$  do  $1 \times 10^4$  stanica/L s najvećom brojnošću u sjeverozapadnom dijelu Jadranskog mora. Relativni doprinos u mikrofitoplanktonskoj zajednici nikad ne prelazi 25%. Najveći doprinos je zabilježen na oligotrofnijem području uz istočnu obalu sjevernog Jadrana (Slika 20). Relativni doprinos ove vrste u mikrofitoplanktonskoj zajednici iznimno je nizak tijekom cijele godine sa blagim porastom u siječnju i lipnju i nikad ne prelazi 25% (Slika 21).





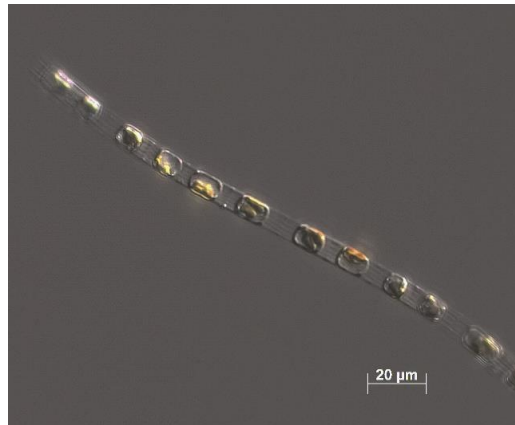
**Slika 20.** Postaje uzorkovanja. Nijanse plave boje označavaju relativni doprinos vrste *C. peruvianus* u mikrofitoplanktonskoj zajednici. Veličina točki označava ukupnu brojnost (Tcount) *C. peruvianus* u sjevernom Jadranu.



**Slika 21.** Doprinos vrste *C. peruvianus* ukupnoj brojnosti mikrofitoplanktona kroz godinu.

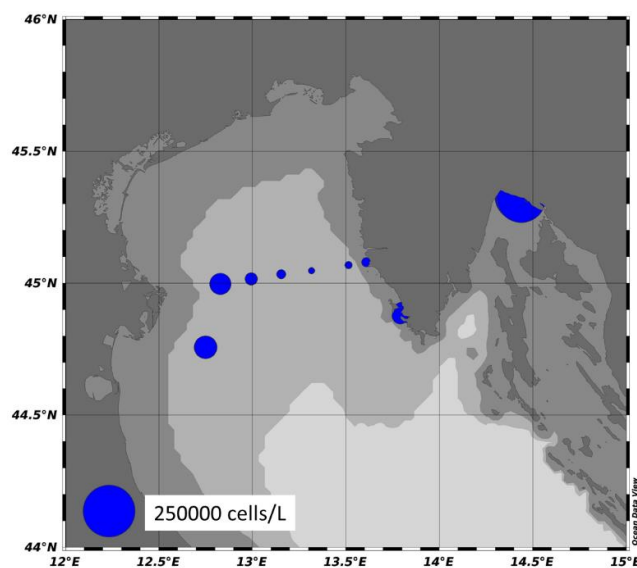
*Skeletonema grevillei* Sarno i Zingone 2005

Za ovu vrstu postoji relativno malo podataka u bazi podataka, ako usporedimo s ostalim opisanim vrstama u ovom doktoratu, obzirom da je u Jadranskom moru otkrivena tek 2014. godine (Marić Pfannkuchen i sur. 2018), što je ujedno bio i prvi zapis ove vrste u Mediteranu.

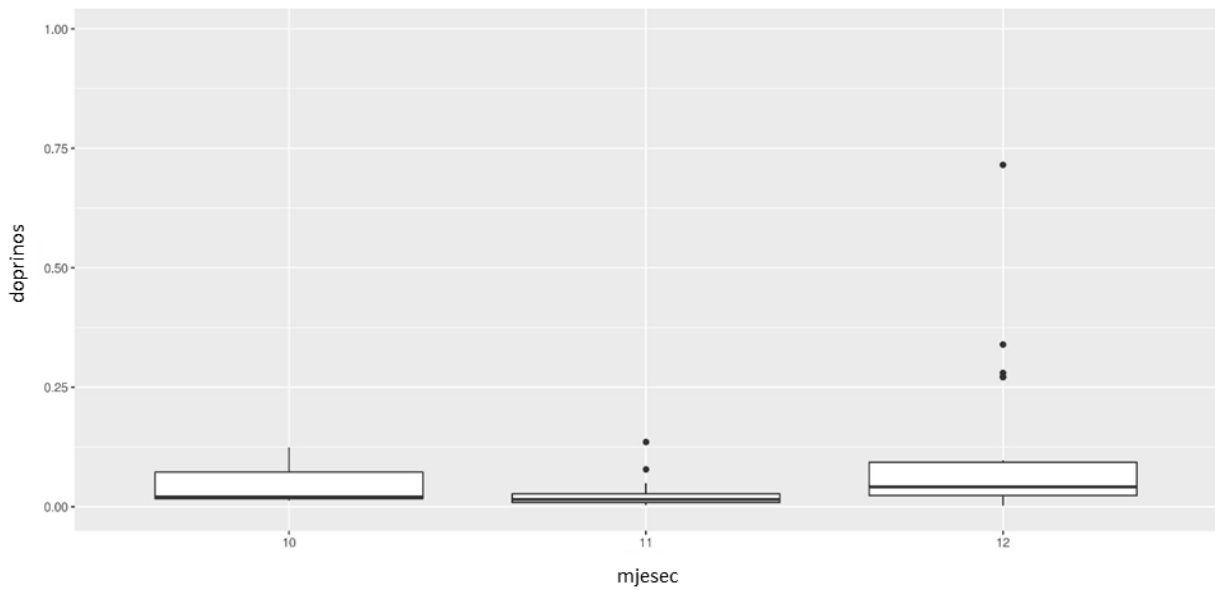


**Slika 22.** *S. grevillei* – svjetlosni mikroskop

Analizirani podaci pokazuju da ukupna brojnost vrste *S. grevillei* (Slika 22) doseže  $2,5 \times 10^5$  stanica  $L^{-1}$ , a najveću brojnost dosegla je u oligotrofnom području uz istočnu obalu Jadrana (Slika 23). Ova vrsta pojavljuje se u listopadu, studenom i prosincu, a najveći doprinos u mikrofitoroplanktonskoj zajednici viđen je u prosincu, s tim da rijetko prelazi 25% (Slika 24).



**Slika 23.** Postaje uzorkovanja. Veličina točki označava ukupnu brojnost (Tcount) *S. grevillei* u sjevernom Jadranu.

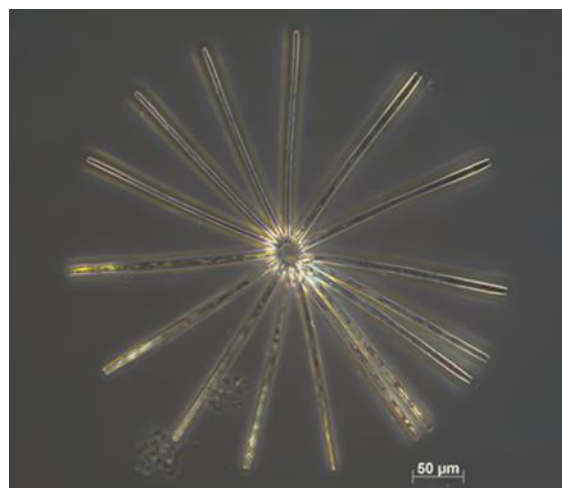


**Slika 24.** Doprinos vrste *S. grevillei* ukupnoj brojnosti mikrofitoplanktona. Podaci su grupirani po mjesecima za razdoblje 1972.-2017. Doprinos je izračunat kao ukupna količina mikrofitoplanktona podijeljena s brojnošću *S. grevillei*.

### 5.1.3. Arafidne penatne dijatomeje

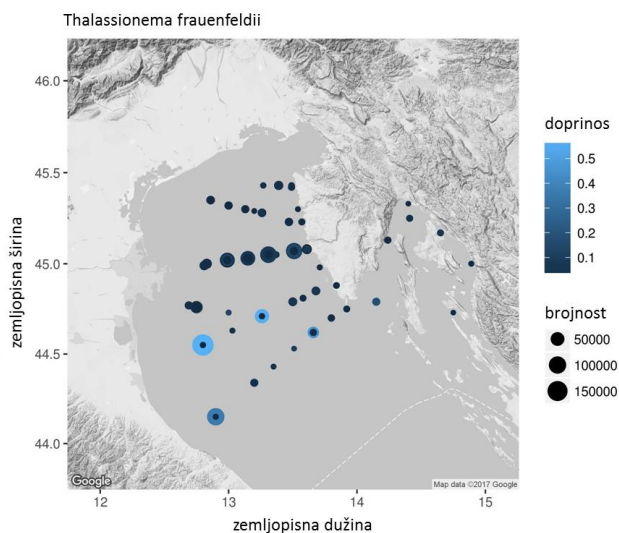
*Thalassionema frauenfeldii* (Grunow) Tempère i Peragallo 1910

Analizirani dugoročni podaci pokazuju da se *T. frauenfeldii* (Slika 25) pojavljuje na većini postaja uzorkovanja u sjevernom Jadranu (Slika 26).



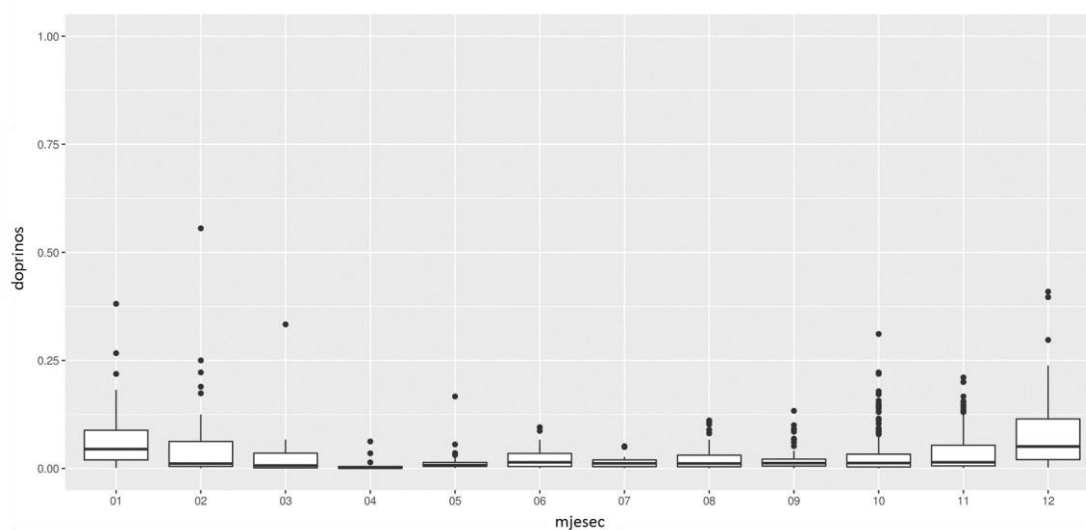
**Slika 25.** Lanac *T. frauenfeldii* – svjetlosni mikroskop

Vrsta *T. frauenfeldii* imala je viši doprinos mikrofitoplanktonskoj zajednici na eutrofnijem području bliže zapadnoj obali sjevernog Jadrana (Slika 26). Relativni doprinos ove vrste u mikrofitoplanktonskoj zajednici rijetko prelazi 50%. Relativna brojnost vrste *L. hargravesii* kreće se u rasponu od  $5 \times 10^4$  do  $1,5 \times 10^5$  stanica  $L^{-1}$  (Slika 26).



**Slika 26.** Postaje uzorkovanja. Nijanse plave boje označavaju relativni doprinos vrsta *T. frauenfeldii* u mikrofitoplanktonskoj zajednici. Veličina točki označava ukupnu brojnost (Tcount) vrsta u sjevernom Jadraniu.

Dugoročni podaci također pokazuju relativno niski doprinos vrste *T. frauenfeldii* u mikrofitoplanktonskoj zajednici tijekom cijele godine sa blagim porastom u siječnju, veljači i prosincu. Relativni doprinos ove vrste rijetko prelazi 25% (Slika 27).



**Slika 27.** Doprinos vrste *T. frauenfeldii* ukupnoj brojnosti mikrofitoplanktona kroz godinu.

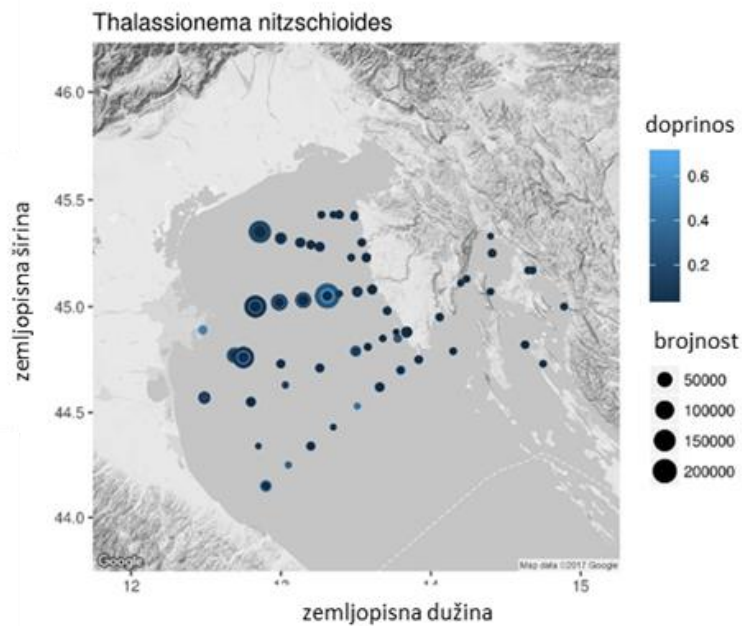
*Thalassionema nitzschioides* (Grunow) Mereschkowsky 1902

Vrsta *T. nitzschioides* (Slika 28) pojavljuje se na većini postaja uzorkovanja u sjevernom Jadranu, a relativna brojnost ove vrste kreće se u rasponu od  $5 \times 10^4$  do  $2 \times 10^5$  stanica  $L^{-1}$  (Slika 29).



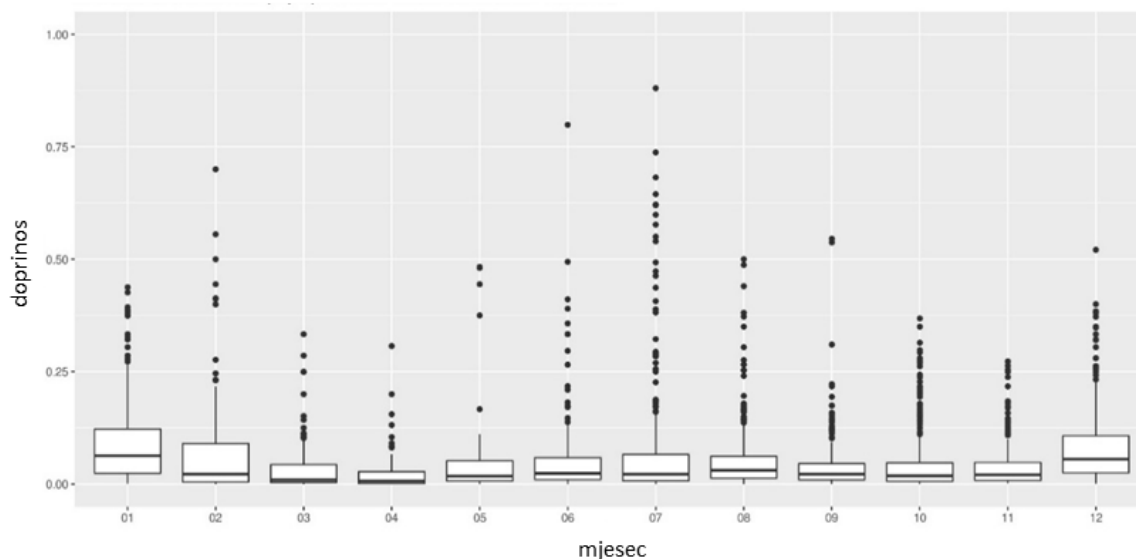
**Slika 28.** Lanac *T. nitzschioides* – svjetlosni mikroskop

Relativni doprinos u mikrofitoplanktonskoj zajednici rijetko prelazi 60%, a najveći je zabilježen na eutrofnom području uz zapadnu obalu jadranskog mora (Slika 29).



**Slika 29.** Postaje uzorkovanja. Nijanse plave boje označavaju relativni doprinos vrsta *T. nitzschioides* u mikrofitoplanktonskoj zajednici. Veličina točki označava ukupnu brojnost (Tcount) vrsta u sjevernom Jadranu.

Dugoročni podaci također pokazuju relativno niski doprinos vrste *T. nitzschioides* u mikrofitoplanktonskoj zajednici tijekom cijele godine sa blagim porastom u siječnju, veljači i prosincu (Slika 30). Relativni doprinos ove vrste rijetko prelazi 25%, s povremenim iznimnim razdobljima s preko 25% do čak 80% doprinosa u srpnju (Slika 30).

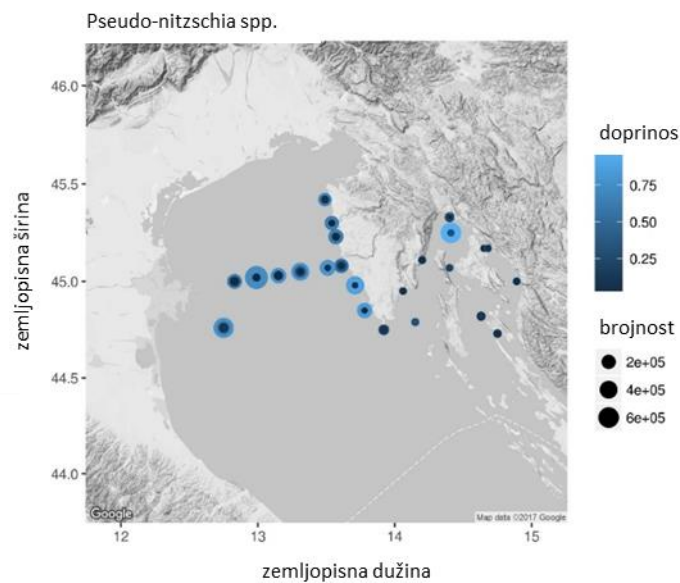


**Slika 30.** Doprinos vrste *T. nitzschioides* ukupnoj brojnosti mikrofitoplanktona kroz godinu.

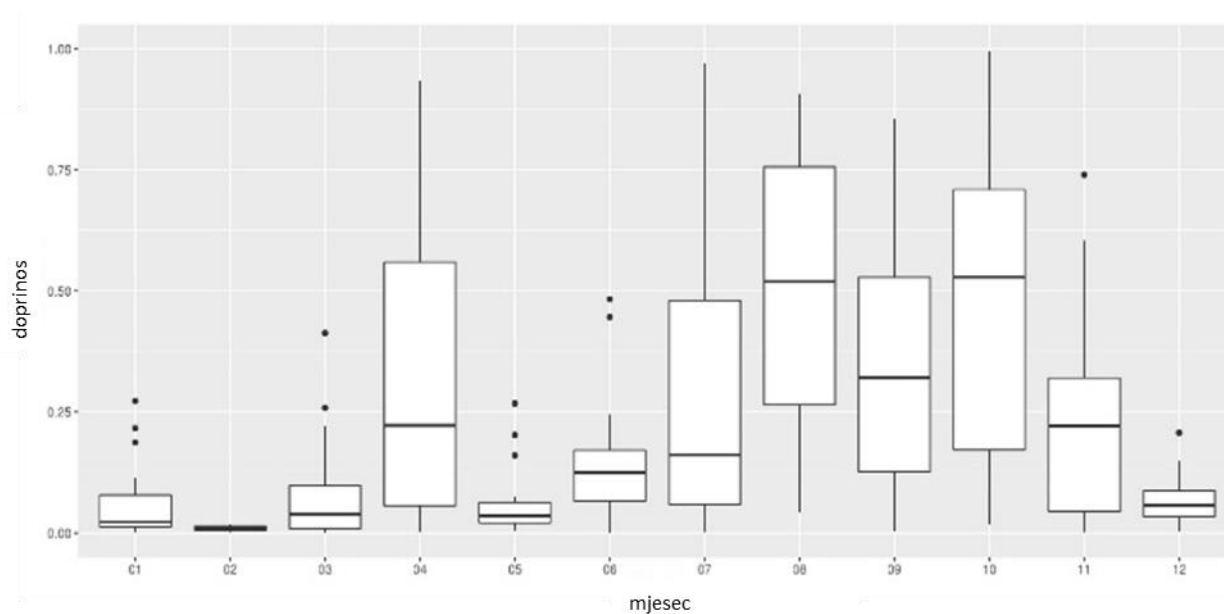
#### 5.1.4. Rafidne penatne dijatomeje

##### *Pseudo-nitzschia* spp.

Sve vrste roda *Pseudo-nitzschia*, u bazi podataka, grupirane su zajedno, obzirom da se u sklopu sustavnog monitoringa svjetlosnom mikroskopijom ne mogu nedvojbeno razlikovati te se nalaze pod *Pseudo-nitzschia* spp. Podaci cu pokazali visoki doprinos ovih vrsta u mikrofitoplanktonskoj zajednici na većini analiziranih postaja, koji često prelazi 75%. Ukupna brojnost vrsta roda *Pseudo-nitzschia* kretala se u rasponu od  $2 \times 10^5$  stanica/L do  $6 \times 10^5$  stanica/L u cijelom sjevernom Jadranu. Povećani doprinos podjednako je zabilježen u eutrofnijem području i u oligotrofnijim područjima (Slika 31). Analizirani podaci pokazali su redoviti visoki doprinos vrsta ovog roda u mikrofitoplanktonskoj zajednici, koji često prelazi 75%, u travnju te od srpnja do studenog (Slika 32).



**Slika 31.** Postaje uzorkovanja. Nijanse plave boje označavaju relativni doprinos vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u mikrofitoplanktonskoj zajednici. Veličina točki označava ukupnu brojnost (Tcount) *Pseudo-nitzschia* spp. u sjevernom Jadranu.



**Slika 32.** Doprinos vrsta *Pseudo-nitzschia* spp. ukupnoj brojnosti mikrofitoplanktona kroz godinu.

## 5.2. Eksperimentalne analize odabranih vrsta dijatomeja

U nastavku su prikazani rezultati eksperimentalnih analiza (dinamika rasta, morfološke reakcije na različitu dostupnost fosfora, intenzitet fluorescencije klorofila, aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze te dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata) za odabrane vrste dijatoeja.

### 5.2.1. Radijalne centrice

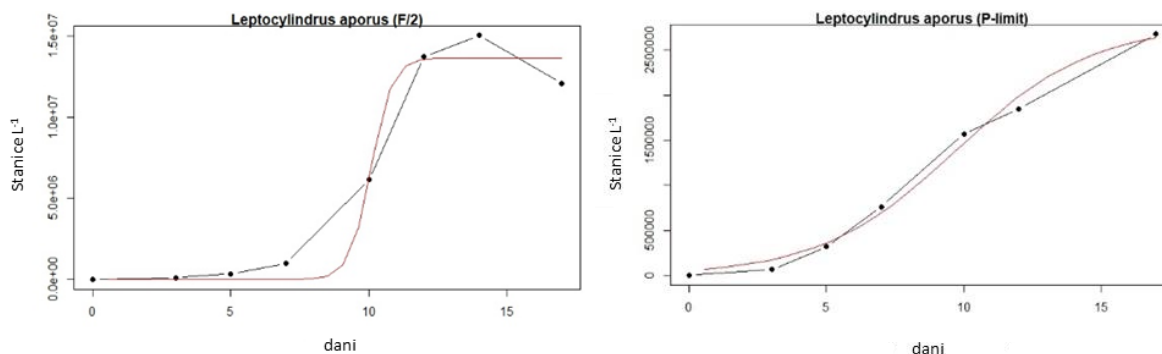
#### 5.2.1.1. *Leptocylindrus aporus* (F.W.French i Hargraves) D. Nanjappa i A. Zingone 2013

##### Dinamika rasta

Kulture su u F/2 mediju kao i u P limitiranom mediju na početku eksperimenta imale brojnost stanica od  $82,9 \times 10^3$  stanica  $L^{-1}$ . Početak eksponencijalne faze ova vrsta je dosegla nakon 7 dana u F/2 mediju, a stacionarne faze nakon 12 dana. U P imitiranom mediju početak eksponencijalne faze dosegnele su nakon 3 dana, a stacionarnu fazu do kraja ekperimentalnog razdoblja nisu postigle (Tablica 5). Točku infleksije (najkraće generacijsko vrijeme) *L. aporus*, u F/2 mediju dosegnuo je nakon 10,01 dana, dok je u P limitiranom mediju dostigao nakon 9,72 dana (Tablica 5). Najkraće generacijsko vrijeme za kulture u F/2 bilo je 0,26 dana, dok je za one u P limitiranom mediju bilo 1,72 dana (Slika 33).

Tablica 5. Dinamika rasta vrste *L. aporus* prikazana kao stanice  $L^{-1}$

Vrsta	Medij	Početak eksponencijalnog rasta			Točka infleksije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze		
		[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev
<i>L. aporus</i>	F/2	7	1.07E+06	8.22E+05	10.01	6.23E+06	4.72E+06	12	1.38E+07	8.98E+06
	P-limit	3	1.48E+05	5.43E+04	9.72	1.65E+06	7.68E+05	/	/	/



Slika 33. Krivulje rasta *L. aporus*: prosječne brojnosti stanica u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

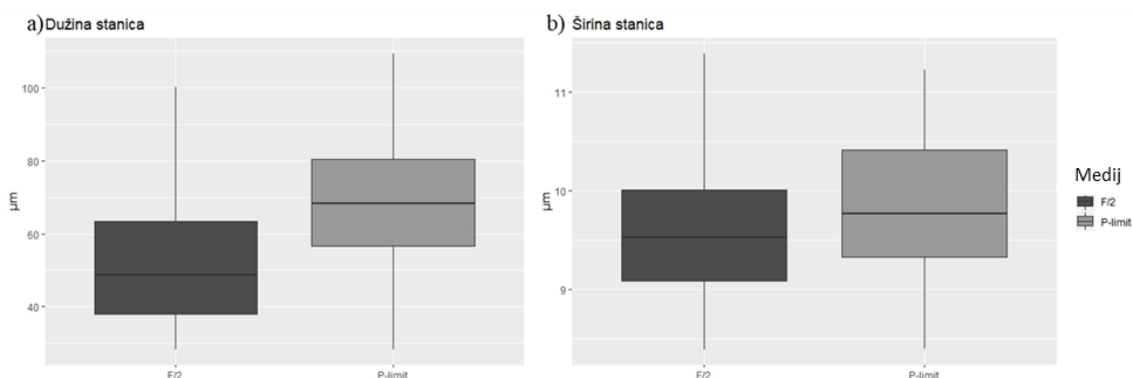


### Morfološke reakcije na različitu dostupnost fosfora

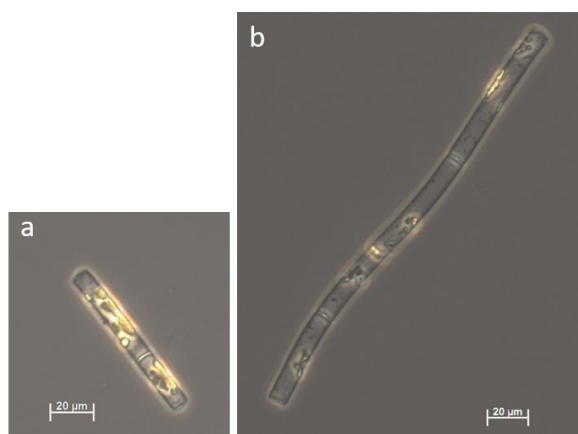
Stanice *L. aporus* u P limitiranom mediju pokazale su značajne morfološke razlike u usporedbi sa stanicama uzgojenim u F/2 mediju. Broj analiziranih stanica iznosio je 30 za F/2, odnosno 45 za P limitirani medij. Značajne razlike u duljinama stanica (pervalvarna os) (p-vrijednost =  $3,13 \times 10^{-4}$ ) otkrivene su Welch t-testom za dva uzorka (Slika 34, Tablica 6). Prosječna duljina stanica iznosila je 53,05  $\mu\text{m}$  u F/2 i 69,86  $\mu\text{m}$  u P limitiranom mediju. Testirani Welch t-testom za dva uzorka također je pokazao da nije bilo značajne razlike u širini stanica između različitih medija (p-vrijednost =  $6,8 \times 10^{-2}$ ) (Slika 34, Tablica 6). Razlike između stanica u dva različita medija vidljive su na slici 34 (Slika 35).

**Tablica 6.** Morfometrijski parametri vrste *L. aporus*: duljina i širina stanica prikazani u  $\mu\text{m}$ .

Vrsta	Medij	Dužina			Širina		
		[ $\mu\text{m}$ ]	stdev	p	[ $\mu\text{m}$ ]	stdev	p
<i>L. aporus</i>	F/2	53.05	18.53	3.13E-04	9.40	1.05	6.80E-02
	P-limit	69.86	18.92		9.80	0.66	

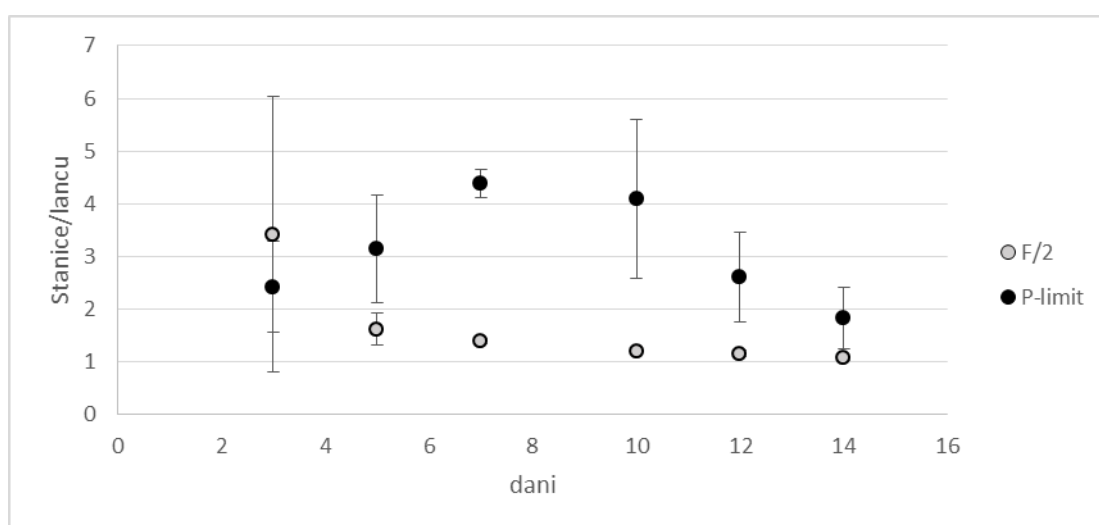


**Slika 34.** Dužina stanica (pervalvarna os) (a) i širina stanica (b) vrste *L. aporus* analiziranih u F/2 i P limitiranom mediju.



**Slika 35.** Stanice *L. aporus* uzgojene u F/2 (a) i P limitiranom (b) mediju. Svjetlosni mikroskop.

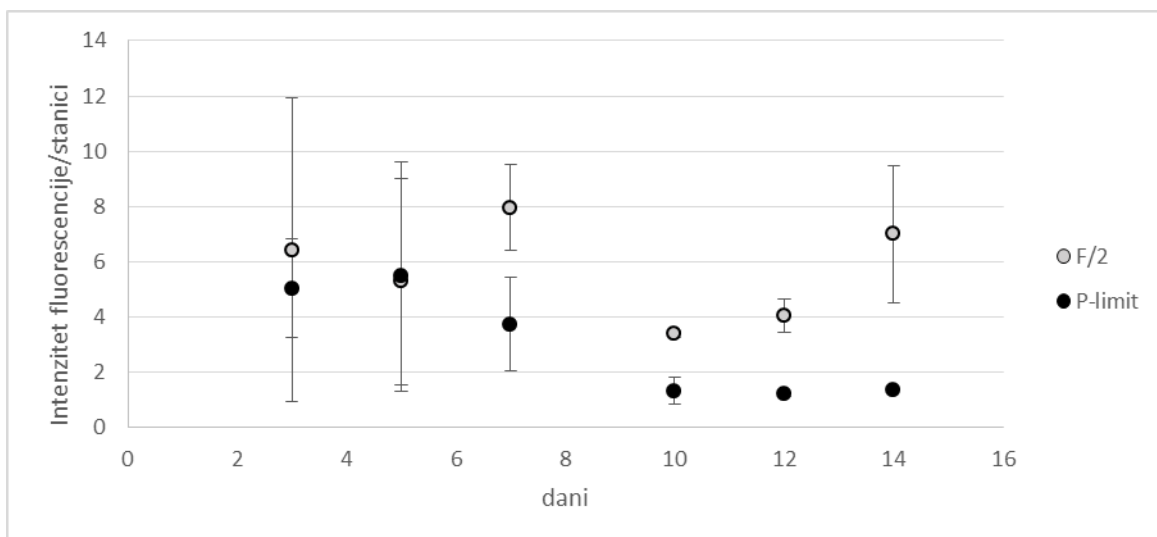
Analiza prosječnih duljina lanaca pokazala je da su lanci tijekom cijelog eksperimenta bili duži u P limitiranom mediju. Broj analiziranih lanaca u F/2 mediju u prosjeku je bio 764 (u rasponu od 205 do 1241 analiziranih lanaca svaki dan eksperimenta), a u P limitiranom mediju 435 (u rasponu od 189 do 687 analiziranih lanaca svaki dan eksperimenta). *L. aporus* imao je maksimalnu prosječnu duljinu lanca od 3 stanice po lancu trećeg dana eksperimenta u F/2 mediju, a 4 stanice po lancu sedmog i osmog dana u P limitiranom mediju. Minimalna prosječna duljina lanca bila je 1 stanica po lancu od sedmog do sedamnaestog dana u F/2 mediju, dok je u mediju s ograničenim fosforom minimalna prosječna duljina lanca bila 2 stanice po lancu trećeg i četrnaestog dana eksperimenta (Slika 36).



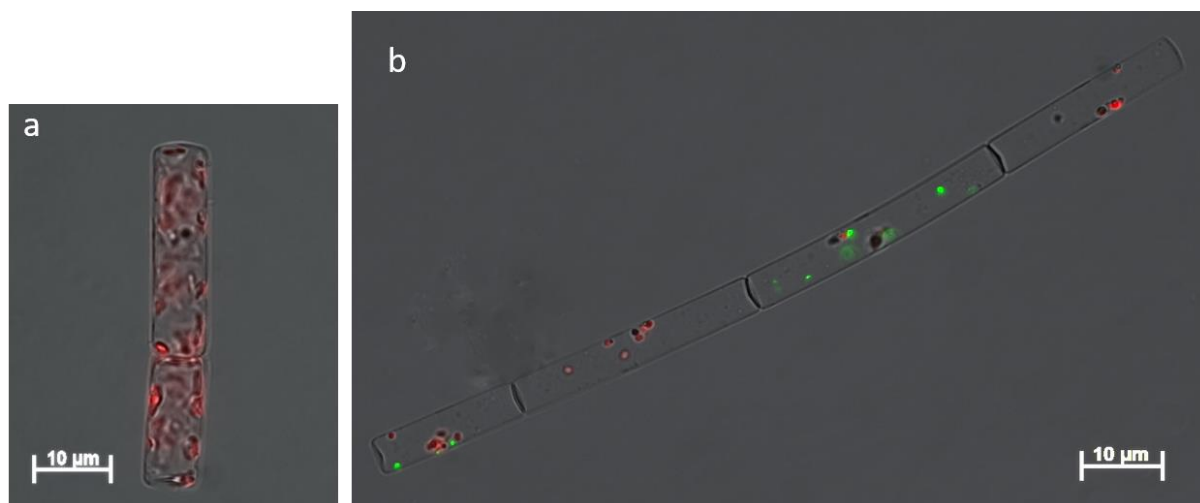
**Slika 36.** Prosječne duljine lanaca vrste *L. aporus* u F/2 i P limitiranom mediju mjerene svaki drugi ili treći dan za cijelo vrijeme trajanja eksperimenta. Lanci su bili duži u P limitiranom mediju za vrijeme cijelog eksperimentalnog razdoblja.

#### *Intenzitet fluorescencije klorofila*

Mjereni intenzitet fluorescencije klorofila/stanici tijekom cijelog eksperimenta bio je veći u F/2 nego u P limitiranom mediju. Najveća razlika između medija zabilježena je posljednjeg dana eksperimenta. Tijekom faze usporenog rasta (lag faza), nizak broj stanica rezultirao je relativno velikim standardnim odstupanjima (Slika 37). Razlike između stanica u dva različita uvjeta dostupnosti fosfora mogu se vidjeti epifluorescentnom mikroskopijom te su prikazane na slici 38. Plastidi (prikazani crvenom bojom) su manji u stanicama uzgojenim u P limitiranom mediju.



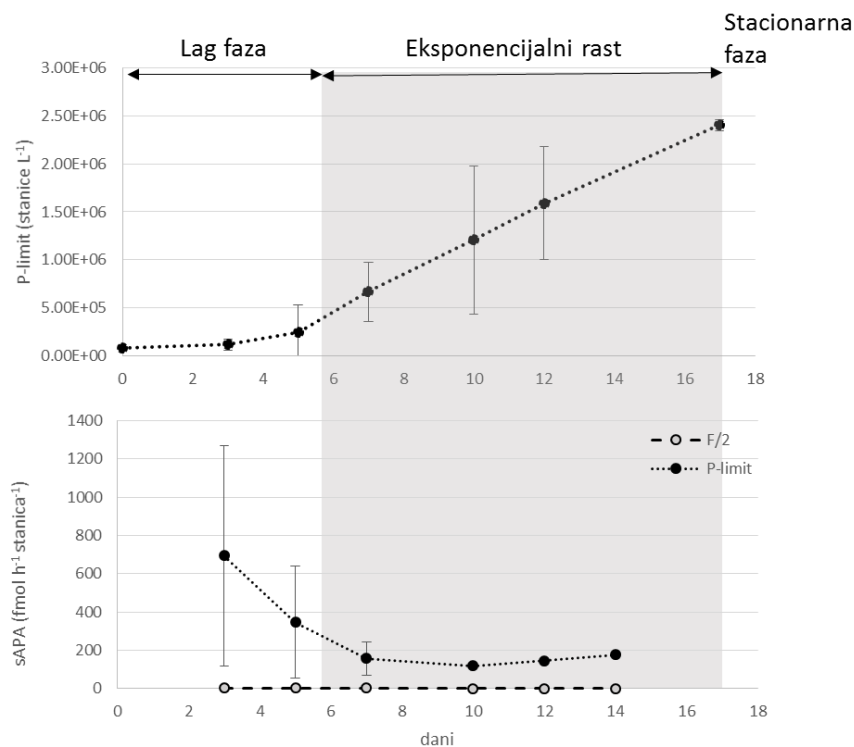
**Slika 37.** Intenzitet fluorescencije klorofila *L. aporus* po stanici u F/2 i P limitiranom mediju mjereno tijekom trajanja eksperimenta.



**Slika 38.** Stanice *L. aporus* u F/2 (a) i P limitiranom (b) mediju. Epifluorescentni mikroskop (zeleni signal - lokalizacija APAe na stanicama, crveni signal - plastidi).

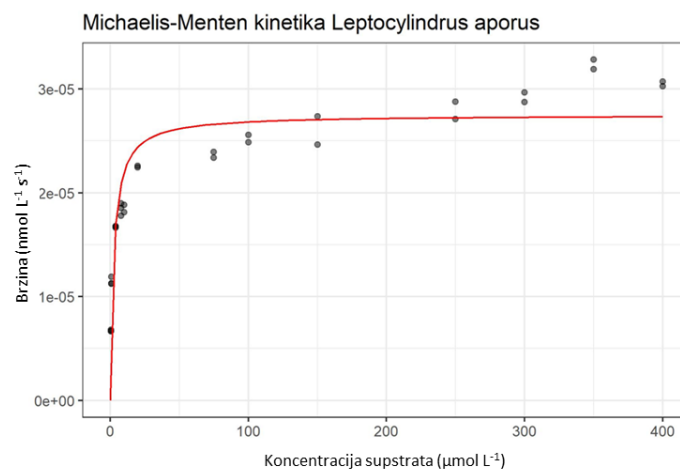
#### *Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze*

U P limitiranom mediju izmjerena je maksimalna sAPA od  $694 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$  na početku eksperimenta, aktivnost se smanjivala tijekom lag faze i faze eksponencijalnog rasta kada je postigla minimalnu vrijednost od  $117 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$ . U F/2 mediju uočena je niska sAPA koja je pri prvom mjerenju iznosila  $3 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$  te se aktivnost kontinuirano smanjivala do kraja faze eksponencijalnog rasta kada je izračunata vrijednost od  $0,5 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$ , nakon čega se počela polako povećavati do  $0,8 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$  (Slika 39).



**Slika 39.** Dinamika sAPAe po stanici vrste *L. aporus* u F/2 i P limitiranom mediju u usporedbi sa krivuljom rasta navedene vrste u P limitiranom mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

Michaelis-Menten-ovim modelom enzimski katalizirane reakcije izračunata je maksimalna brzina ( $V_{max}$ ) enzima koja je iznosila  $2,75 \times 10^{-5} \text{ nmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$  koja se stabilizirala pri koncentraciji supstrata višim od  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Istim modelom izračunata i Michaelis-mentenova konstanta ( $K_M$ ) od  $2,51 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Takva niska vrijednost i ukazuje na enzim s visokim afinitetom prema supstratu (Slika 40).

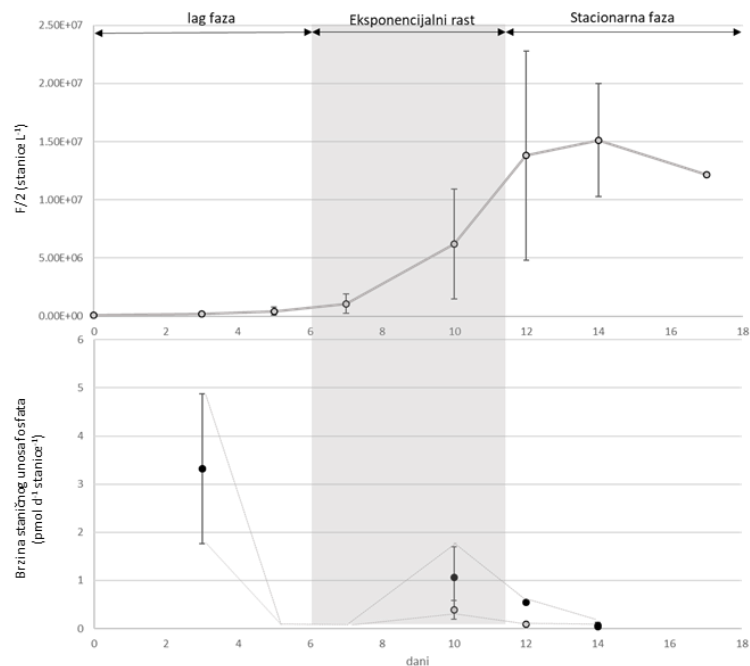


**Slika 40.** Michaelis-Mentenova krivulja kinetike enzima APe kod vrste *L. aporus* u P limitiranom mediju.

Nakon inkubacije stanica sa supstratom ELF\_97, fluorescentni se produkt zelene boje nakupio na površini stanica. Zeleni signal (Slika 38b) ukazuje na lokalizaciju APA na stanicama, dok crveni signal ukazuje na autofluorescenciju plastida. Kod ove vrste bilo je vidljivo da je APA koncentrirana oko nekoliko točki na površini stanica koje nisu posebno povezane sa prepoznatljivim unutarstaničnim strukturama, kao što su plastidi (crveni signal), velike vakuole, jezgra i sl. Na slici 38 vidljiva je razlika između stanica koje su rasle u F/2 mediju (a) i stanica koje su rasle u P limitiranom mediju (b). Stanice koje su rasle u F/2 mediju imaju puno veći broj plastida u stanicama i ti plastidi su vidljivo veći nego kod stanica koje su rasle u P limitiranom mediju, kod kojih su plastidi jedva vidljivi.

### Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata

Izračunate brzine staničnog unosa otopljenog anorganskog fosfata u F/2 mediju bile su između  $0,03 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  i  $3,32 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanice}^{-1}$ . Koncentracije otopljenog anorganskog fosfata u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimenta bile su ispod razine detekcije našeg instrumenta ( $0,02 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) te brzine unosa nisu računane. Dinamika brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata pokazala je povećanu brzinu staničnog unosa u lag fazi rasta, zatim smanjene brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata tijekom faze eksponencijalnog rasta i blagi porast na početku stacionarne faze (Slika 41).



**Slika 41.** Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata kod vrste *L. aporus* u F/2 mediju uspoređena sa krivuljom rasta navedene vrste u F/2 mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), ekspancijalne i stacionarne faze rasta stanica.

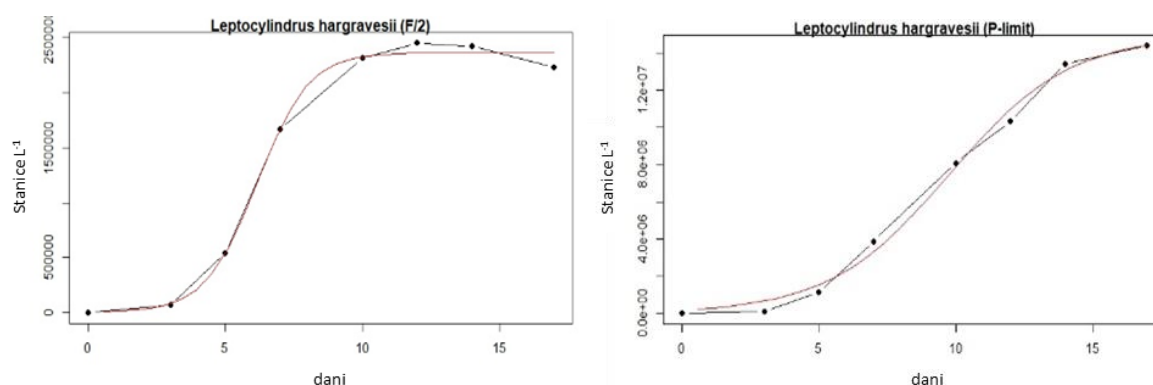
### 5.2.1.2. *Leptocylindrus hargravesii* D. Nanjappa & A. Zingone 2013

#### Dinamika rasta

Kulture u F/2 i P limitiranom mediju na početku eksperimenta imale su brojnost stanica od  $16,8 \times 10^3$  stanica  $L^{-1}$ . Početak eksponencijalne faze ova vrsta je dosegla nakon 3 dana u oba medija, a stacionarne nakon 10 dana u F/2 i 14 dana u P limitiranom mediju (Tablica 7). Točku infleksije *L. hargravesii*, u F/2 mediju dosegnuo je nakon 6,16 dana, dok je u P limitiranom mediju to dostigao nakon 9,77 dana (Tablica 7). Najkraće generacijsko vrijeme za kulture u F/2 mediju bilo je 0,66 dana, dok je za one u P limitiranom mediju bilo 1,53 dana (Slika 42).

**Tablica 7.** Dinamika rasta vrste *L. hargravesii* prikazana kao stanice  $L^{-1}$

Vrsta	Medij	Početak eksponencijalnog rasta			Točka infleksije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze		
		[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev
<i>L. hargravesii</i>	F/2	3	8.63E+04	2.81E+04	6.16	1.69E+06	7.78E+04	10	2.34E+06	2.41E+05
	P-limit	3	1.08E+05	1.61E+04	9.77	8.09E+06	1.56E+06	14	1.34E+07	6.18E+05



**Slika 42.** Krivulje rasta *L. hargravesii*: prosječne brojnosti stanica u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

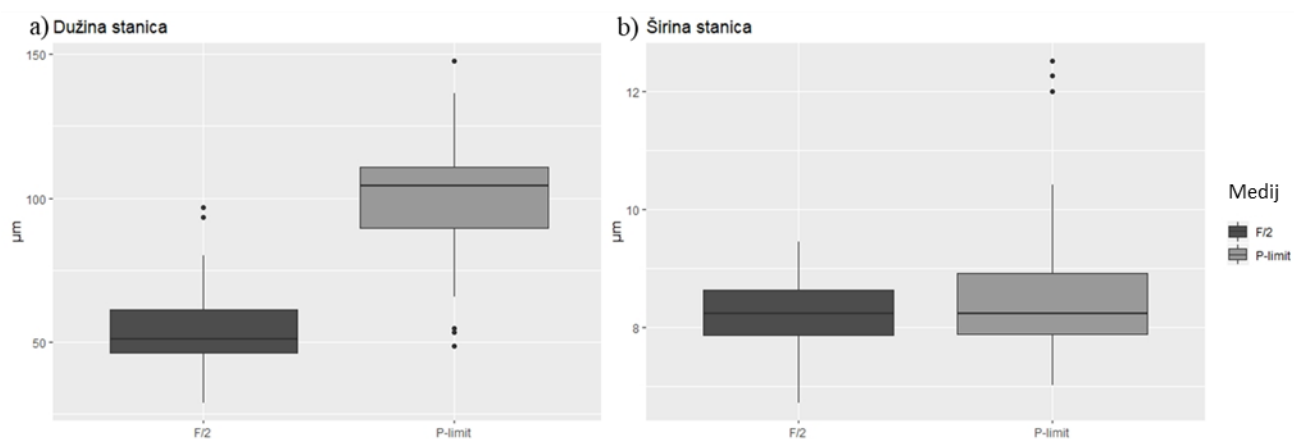
#### Morfološke reakcije na različite hranjive uvjete

Stanice *L. hargravesii* u P limitiranom mediju pokazale su značajne morfološke razlike u usporedbi sa stanicama uzgojenim u F/2 mediju. Broj analiziranih stanica iznosio je 27 (F/2), odnosno 50 stanica (P limitirani medij). Značajne razlike u duljini stanica (pervalvarna os) ( $p$ -vrijednost =  $4,42 \times 10^{-14}$ ) otkrivene su Welch t-testom za dva uzorka (Slika 43a, Tablica 8). Prosječna duljina stanica iznosila je 54,92  $\mu m$  u F/2 i 104,82  $\mu m$  u P limitiranom mediju. Testirani Welch t-test za dva uzorka također je pokazao da nije bilo značajne razlike u širini

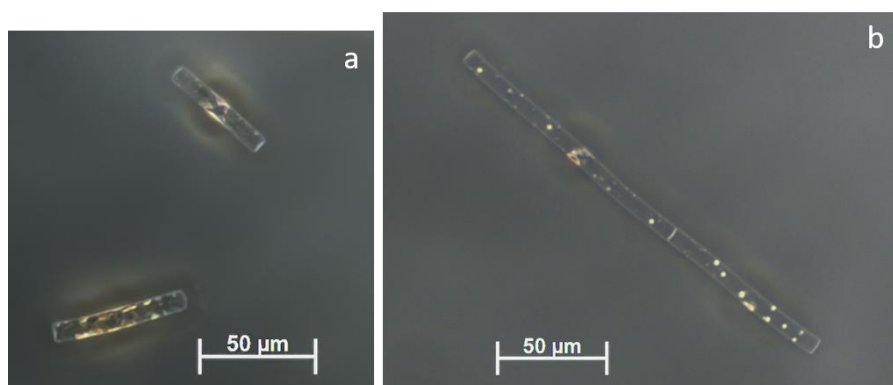
stanica između različitih medija (p-vrijednost =  $1,10 \times 10^{-2}$ ) (Slika 43b, Tablica 8). Razlike između stanica u dva različita medija vidljiva je na slici 44, fotografiranoj na svjetlosnom mikroskopu.

**Tablica 8.** Morfometrijski parametri vrste *L. hargravesii*: duljina i širina stanica prikazani u  $\mu\text{m}$ .

Vrsta	Medij	Dužina			Širina		
		[ $\mu\text{m}$ ]	stdev	p	[ $\mu\text{m}$ ]	stdev	p
<i>L. hargravesii</i>	F/2	54.92	15.99	4.42E-14	8.25	0.65	1.10E-01
	P-limit	104.82	31.18		8.59	1.18	



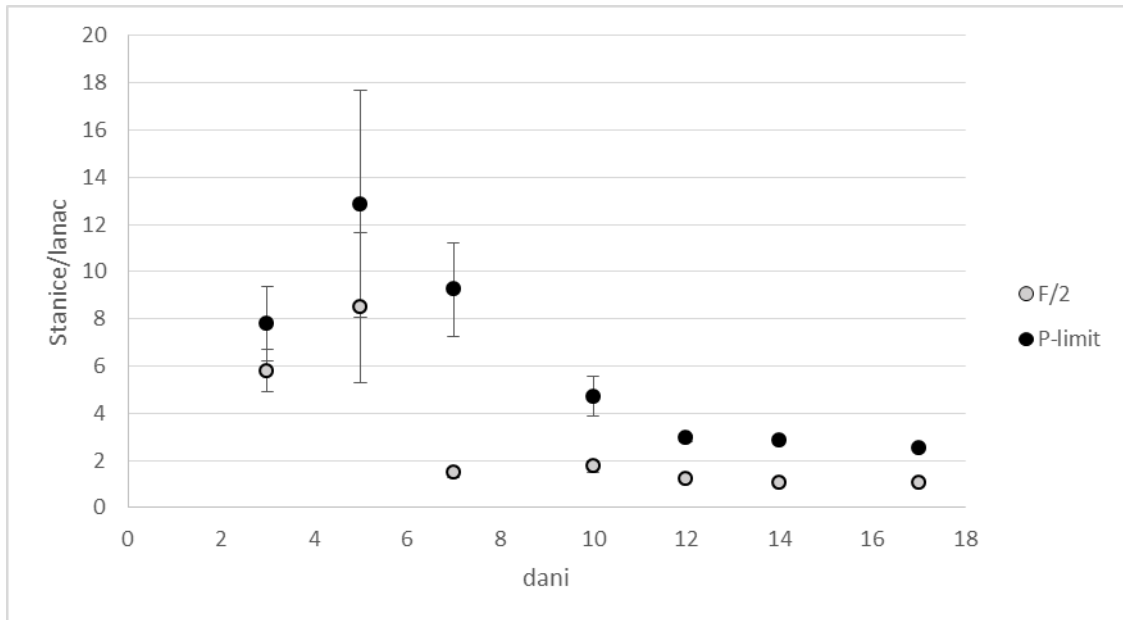
**Slika 43.** Dužina stanica (pervalvarna os) (a) i širina stanica (b) vrste *L. hargravesii* analiziranih F/2 i P limitiranom mediju.



**Slika 44.** Stanice *L. hargravesii* uzgojene u F/2 (a) i P limitiranom (b) mediju. Svjetlosni mikroskop.

Analiza prosječnih duljina lanaca pokazala je da su lanci tijekom cijelog eksperimenta bili dulji u P limitiranom mediju od onih u F/2 mediju. Broj analiziranih lanaca u F/2 mediju u prosjeku je bio 595 (u rasponu od 44 do 1184 analiziranih lanaca svaki dan eksperimenta), a u P limitiranom mediju 433 (u rasponu od 43 do 868 analiziranih lanaca svaki dan eksperimenta). Petog dana eksperimenta *L. hargravesii* imao je maksimalnu prosječnu duljinu

lanca od 8 stanice po lancu u F/2 mediju i 13 stanice po lancu u P limitiranom mediju. Minimalna prosječna duljina lanca bila je 1 stanice po lancu sedmog i dvanaestog dana u F/2 mediju, dok je u P limitiranom minimalna prosječna duljina lanca bila 1 stanice po lancu sedamnaestog dana eksperimenta (Slika 45) .

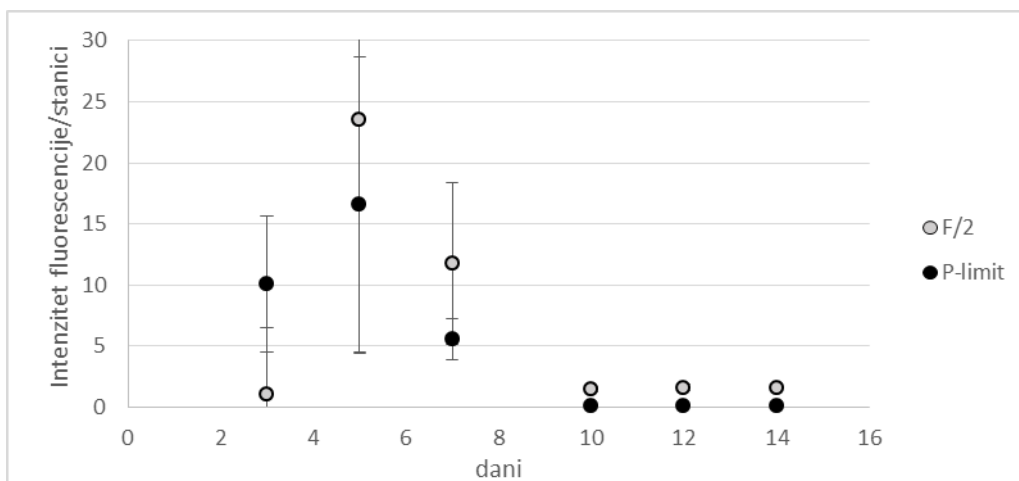


**Slika 45.** Prosječne duljine lanca vrste *L. hargravesii* u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta. Lanci su bili duži u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimentalnog razdoblja.

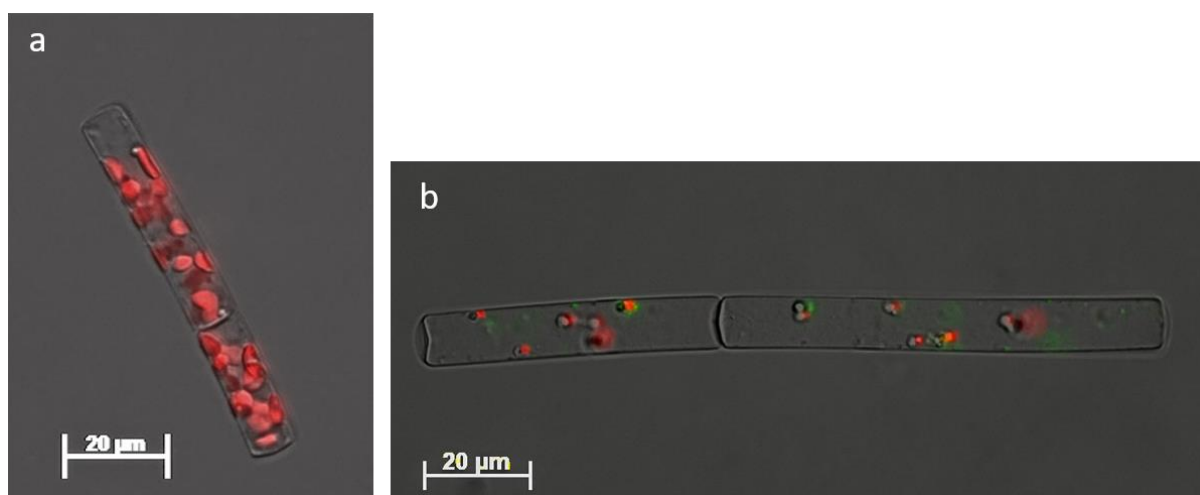
#### *Intenzitet fluorescencije klorofila*

Mjereni intenzitet fluorescencije klorofila/stanici tijekom cijelog eksperimenta bio je veći u F/2 nego u P limitiranom mediju. Najveća razlika između medija zabilježena je posljednjeg dana eksperimenta. Tijekom faze usporenog rasta (lag faza), nizak broj stanica rezultirao je relativno velikim standardnim odstupanjima (Slika 46). Razlike između stanica u dva različita uvjeta dostupnosti fosfora mogu se vidjeti epifluorescentnom mikroskopijom te su prikazane na slici 47. Plastidi (prikazani crvenom bojom) su manji u stanicama uzgojenim u P limitiranom mediju.





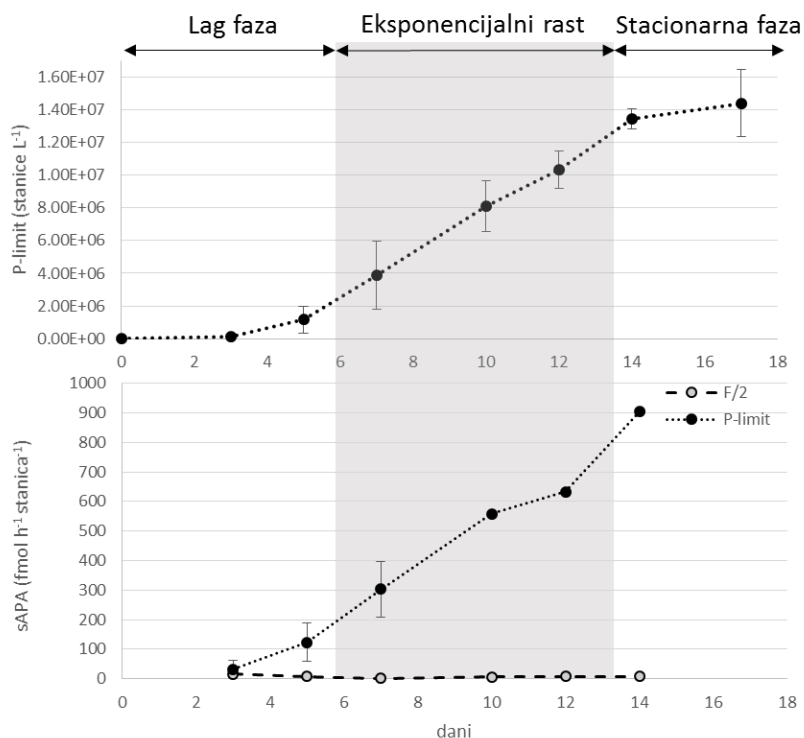
**Slika 46.** Intenzitet fluorescencije klorofila *L. hargravesii* po stanici u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.



**Slika 47.** Stanice *L. hargravesii* u F/2 (a) i P limitiranom (b) mediju. Epifluorescentni mikroskop (zeleni signal - lokalizacija APAe na stanicama, crveni signal - plastidi).

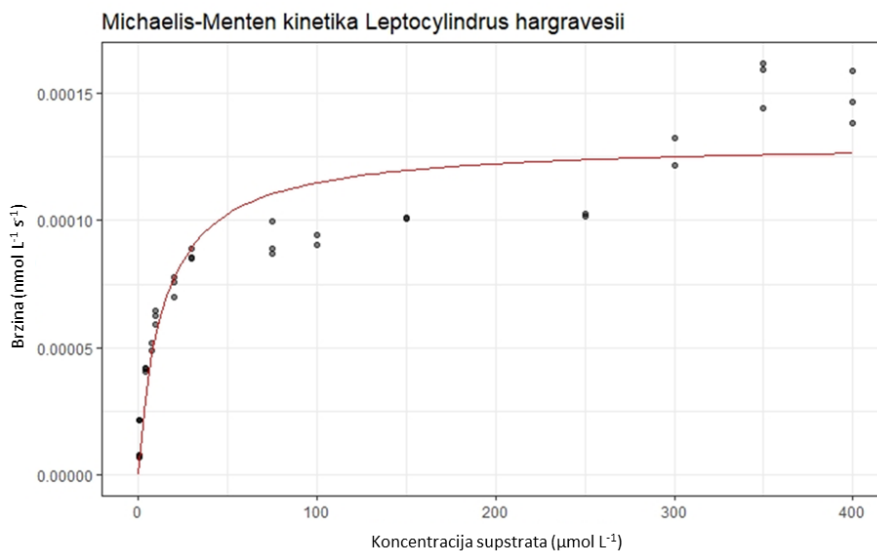
#### *Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze*

U P limitiranom mediju izmjerena je minimalna sAPA koja je iznosila  $32 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  na početku eksperimenta, ta se aktivnost kontinuirano povećavala kroz fazu eksponencijalnog rasta do maksimalne aktivnosti od  $904 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  na kraju faze eksponencijalnog rasta. U F/2 mediju izmjerena je niska sAPA te je maksimalna aktivnost iznosila  $16 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  na početku eksponencijalne faze rasta, a nakon toga se kontinuirano smanjivala do  $2 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  u sredini eksponencijalne faze, nakon čega se ponovo počela povećavati do 14tog dana kada je dosegla  $8 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  (Slika 48).



**Slika 48.** Dinamika sAPAE po stanici vrste *L. hargravesii* u F/2 i P limitiranom mediju u usporedbi sa krivuljom rasta navedene vrste u P limitiranom mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

Maksimalna brzina ( $V_{max}$ ) enzima iznosila je  $1,31 \times 10^{-04} \text{ nmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a stabilizirala se pri koncentracijama supstrata višim od  $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Michaelis-mentenova konstanta ( $K_M$ ) iznosila je  $13,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Ovakva niska vrijednost ukazuje na enzim s visokim afinitetom prema supstratu (Slika 49).

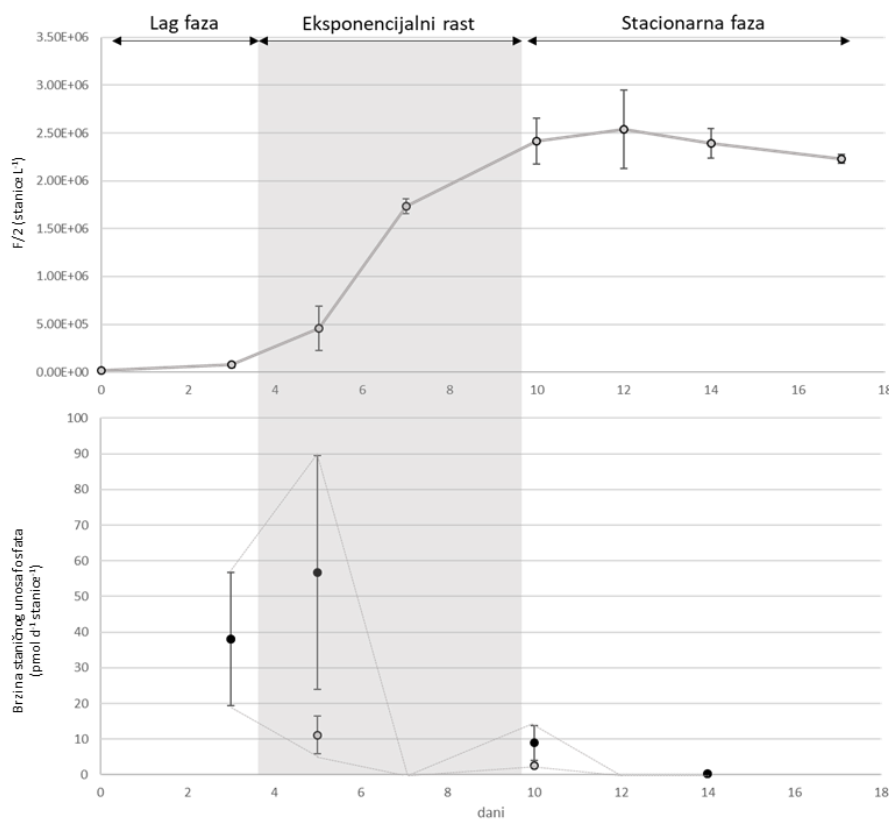


**Slika 49.** Michaelis-Mentenova krivulja kinetike APAE kod vrste *L. hargravesii* u P limitiranom mediju.

Kod ove vrste bilo je vidljivo da je APA difuzno raspoređena na nekoliko mjesta na površini stanica te je kolokalizirana sa unutarstaničnim strukturama kao što su plastidi (crveni signal). Na slici 47 vidljiva je razlika između stanica koje su rasle u F/2 mediju (a) i stanica koje su rasle u P limitiranom mediju (b). Stanice koje su rasle u F/2 mediju imaju puno veći broj plastida u stanicama te su ti plastidi vidljivo veći u odnosu na plastide u stanicama koje su rasle u P limitiranom mediju.

### Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata

Izračunate brzine staničnog unosa otopljenog anorganskog fosfata u F/2 mediju bile su između  $0,29 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  i  $56,75 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanice}^{-1}$ . Koncentracije otopljenog anorganskog fosfata u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimenta bile su ispod razine detekcije našeg instrumenta ( $0,02 \text{ }\mu\text{M}$ ) te brzine unosa nisu računane. Dinamika brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata pokazala je povećanu brzinu staničnog unosa u lag fazi rasta te nastavak povećanja i tijekom rane faze eksponencijalnog rasta, zatim smanjene brzine unosa sredinom faze eksponencijalnog rasta i blagi porast na početku stacionarne faze (Slika 50).



**Slika 50.** Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata kod vrste *L. hargravesii* u F/2 mediju uspoređena sa krivuljom rasta navedene vrste u F/2 mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

## 5.2.2. Multipolarne centrice

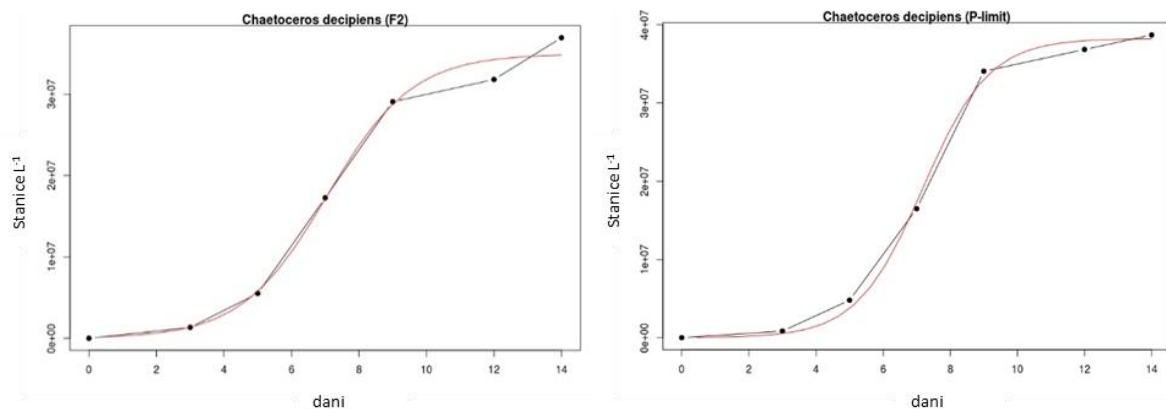
### 5.2.2.1. *Chaetoceros decipiens* Cleve 1873

#### Dinamika rasta

Kulture u F/2 mediju kao i u P limitiranom mediju na početku eksperimenta imale su brojnost stanica od  $6,1 \times 10^4$  stanica  $L^{-1}$ . Početak eksponencijalne faze ova vrsta je dosegla nakon 5 dana u oba medija, a stacionarne nakon 9 dana u oba medija (Tablica 9). Točku infleksije (najkraće generacijsko vrijeme), u F/2 mediju dosegnuo je nakon 7.05 dana, a u P limitiranom mediju nakon 7.18 dana (Tablica 9). Najkraće generacijsko vrijeme za kulture u F/2 bilo je 0.88 dana, dok je za one u P limitiranom mediju bilo 0.68 dana (Slika 51).

**Tablica 9.** Dinamika rasta vrste *C. decipiens* prikazana kao stanice  $L^{-1}$

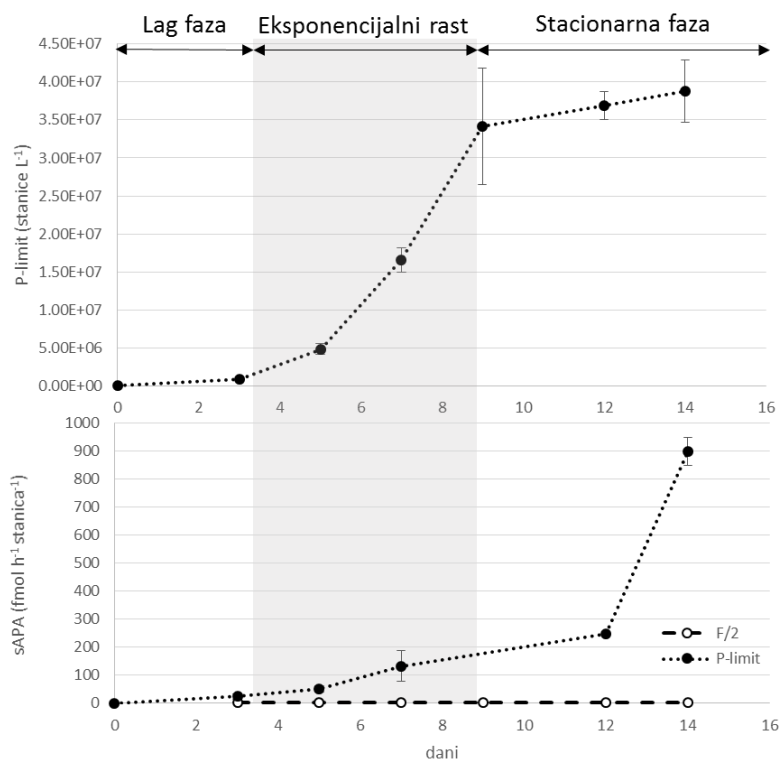
Vrsta	Medij	Početak eksponencijalnog rasta			Točka infleksije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze		
		[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev
<i>C. decipiens</i>	F/2	5	5.6E+06	3.9E+05	7.05	1.7E+07	2.0E+06	9	2.9E+07	2.0E+06
	P-limit	5	4.8E+06	7.1E+05	7.18	1.7E+07	1.6E+06	9	3.4E+07	7.7E+06



**Slika 51.** Krivulje rasta *C. decipiens*: prosječne brojnosti stanica u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

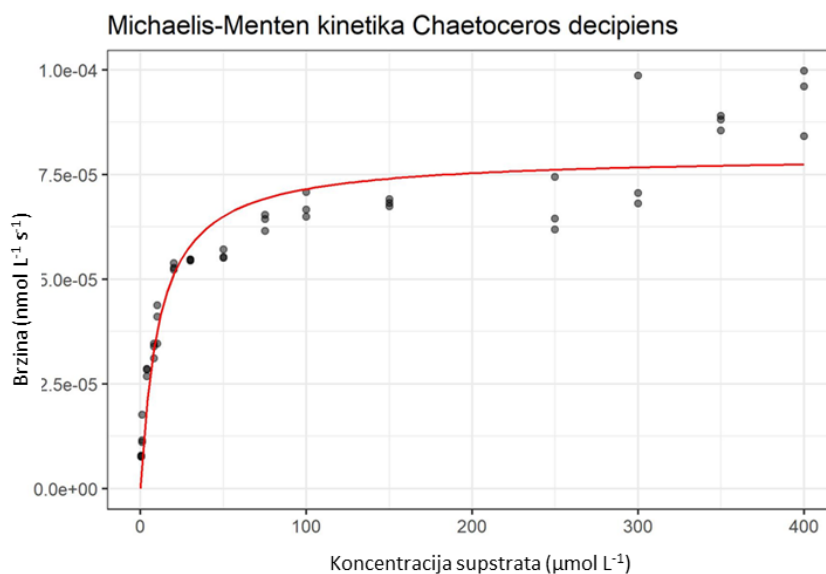
#### Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze

U P limitiranom mediju izmjerena je minimalna sAPA od 24  $\text{fmol h}^{-1}$  stanica $^{-1}$  na početku eksperimenta, ta se aktivnost kontinuirano povećavala kroz fazu eksponencijalnog rasta i tijekom stacionarne faze. Između 12. i 14. dana, naglo je porasla do maksimalne aktivnosti od 899  $\text{fmol h}^{-1}$  stanica $^{-1}$  na kraju eksperimenta. U F/2 mediju sAPA nije bila mjerljiva (Slika 52).



**Slika 52.** Dinamika sAPAE vrste *C. decipiens* u F/2 i P limitiranom mediju u usporedbi sa krivuljom rasta navedene vrste u P limitiranom mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), ekspancionalne i stacionarne faze rasta stanica.

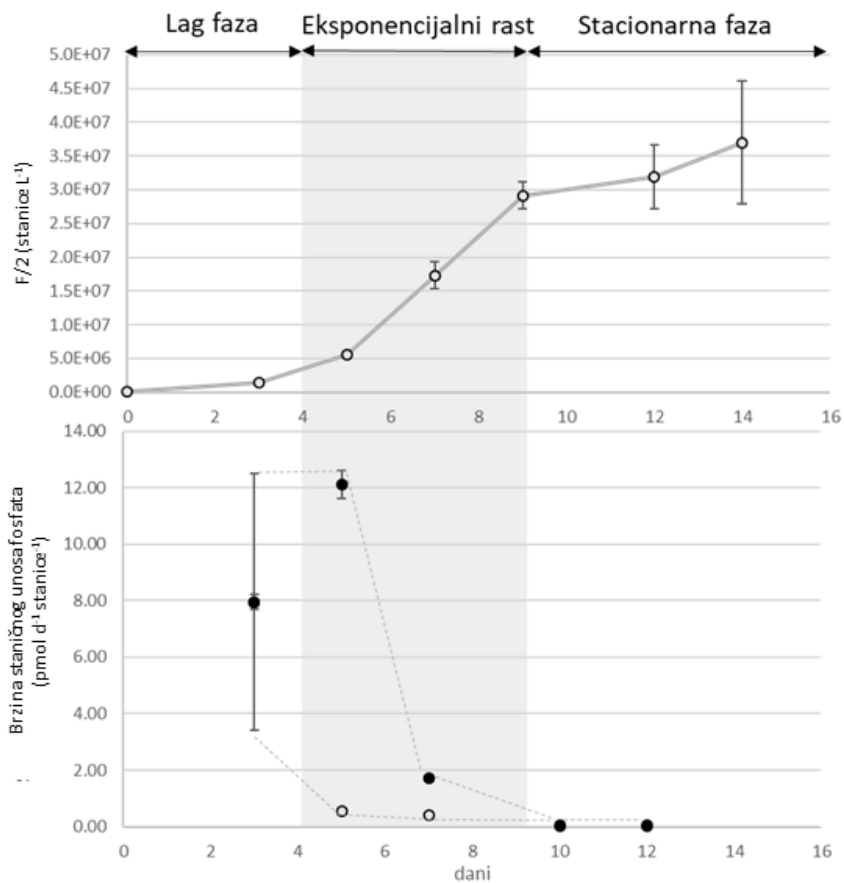
Maksimalna brzina ( $V_{\max}$ ) enzima iznosila je  $7.95 \times 10^{-5} \text{ nmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a stabilizirala se pri koncentraciji supstrata višom od  $150 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Također je izračunata i niska  $K_M$  vrijednost od  $11,14 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (Slika 53).



**Slika 53.** Michaelis-Mentnova krivulja kinetike APAE kod vrste *C. decipiens* u P limitiranom mediju.

### Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata

Izračunate brzine staničnog unosa otopljenog anorganskog fosfata u F/2 mediju bile su između  $0,02 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  i  $12,11 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanice}^{-1}$ . Koncentracije otopljenog anorganskog fosfata u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimenta bile su ispod razine detekcije našeg instrumenta ( $0,02 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) te brzine unosa nisu računane. Dinamika brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata pokazala je povećanu brzinu staničnog unosa u lag fazi, koja se dodatno povećala na početku eksponencijalne faze rasta. Sredinom eksponencijalne faze, brzina je pala te se kontinuirano smanjivala do kraja eksperimenta (Slika 54).



**Slika 54.** Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata kod vrste *C. decipiens* u F/2 mediju uspoređena sa krivuljom rasta navedene vrste u F/2 mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

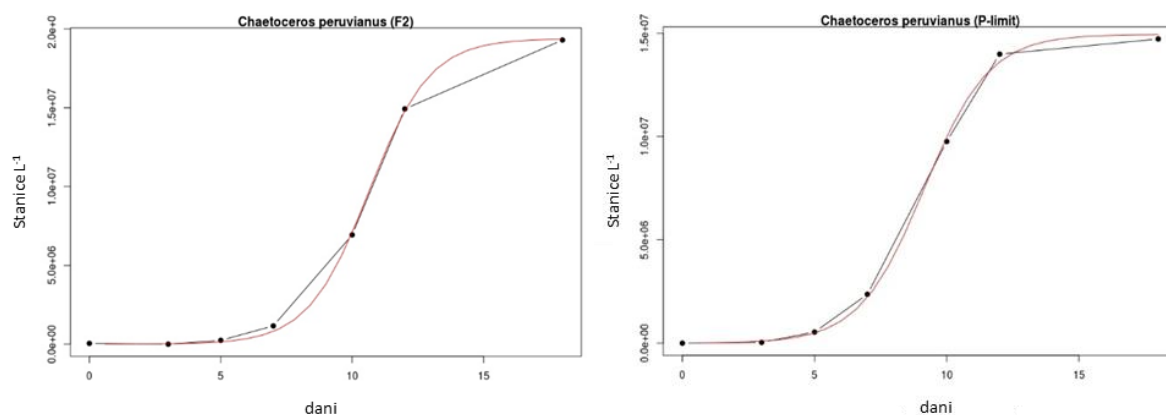
### 5.2.2.2. *Chaetoceros peruvianus* Brightwell 1856

#### Dinamika rasta

Kulture u F/2 i P limitiranom mediju na početku eksperimenta imale su brojnost stanica od  $4,27 \times 10^5$  stanica  $L^{-1}$ . Početak eksponencijalne faze ova vrsta je dosegla nakon 7 dana u oba medija, a stacionarne nakon 18 dana u oba medija (Tablica 10). Točku inflekcije u F/2 mediju *C. peruvianus* je dosegao nakon 10,90 dana, a u P limitiranom mediju nakon 9,15 dana (Tablica 10). Najkraće generacijsko vrijeme za kulture u F/2 bilo je 0.81 dan, dok je za one u P limitiranom mediju bilo 0.85 dana (Slika 55).

**Tablica 10.** Dinamika rasta vrste *C. peruvianus* prikazana kao stanice  $L^{-1}$

Vrsta	Medij	Početak eksponencijalnog rasta			Točka inflekcije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze		
		[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev
<i>C. peruvianus</i>	F/2	7	1.54E+06	2.34E+05	10.9	7.31E+06	6.00E+05	18	1.97E+07	4.71E+06
	P-limit	7	2.79E+06	1.83E+05	9.15	1.02E+07	1.03E+06	18	1.33E+07	2.29E+06



**Slika 55.** Krivulje rasta *C. peruvianus*: prosječne brojnosti stanica u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

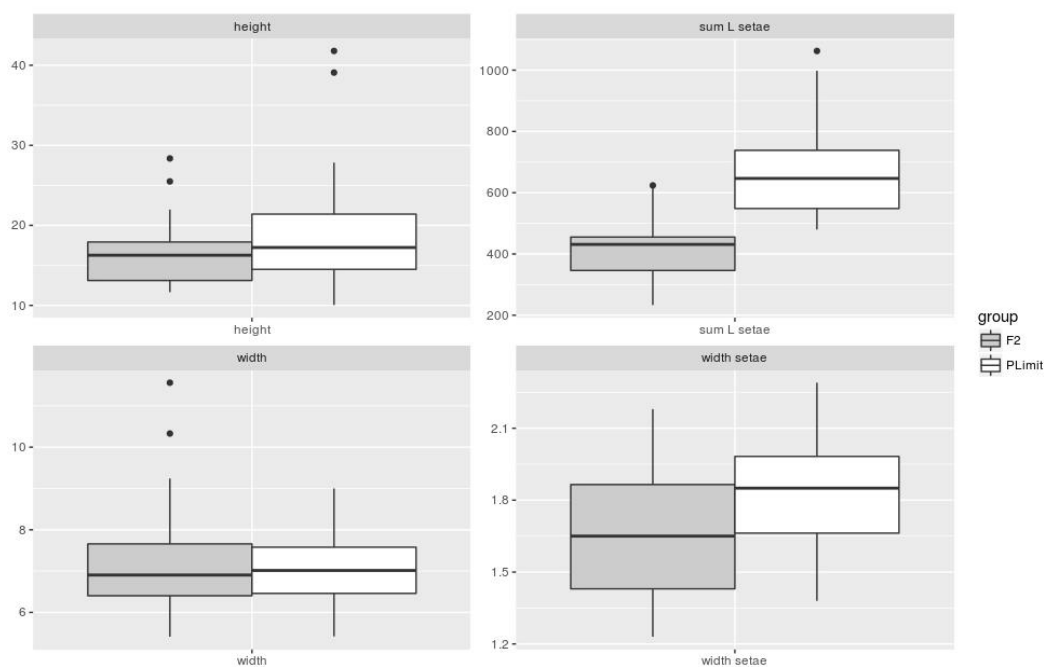
#### Morfološke reakcije na različite hranjive uvjete

Stanice *C. peruvianus* u P limitiranom mediju pokazale su značajne morfološke razlike u usporedbi sa stanicama uzgojenim u F/2 mediju. Značajne morfološke razlike otkrivene su Welch t-testom za dva uzorka. Parametri koji su se značajno razlikovali su: dužina stanica (pervalvarna os) (p-vrijednost =  $3,893 \times 10^{-3}$ ), širina seta (p-vrijednost =  $1,27 \times 10^{-2}$ ) i zbroj dužina sve četiri sete po stanici (p-vrijednost =  $4,73 \times 10^{-9}$ ) (Slika 56, Tablica 11). Prosječna dužina stanica iznosila je  $16,47 \mu m$  u F/2 i  $19,28 \mu m$  u P limitiranom mediju. Prosječna širina seta bila  $1,65 \mu m$  u F/2 i  $1,83 \mu m$  u P limitiranom mediju, dok je prosječna ukupna dužina seta po stanici iznosila je  $4,18 \times 10^2 \mu m$  u F/2 i  $6,72 \times 10^2 \mu m$  u P limitiranom mediju. Razlike

između stanica u dva različita medija vidljive su na slici 57 fotografiranoj na svjetlosnom mikroskopu.

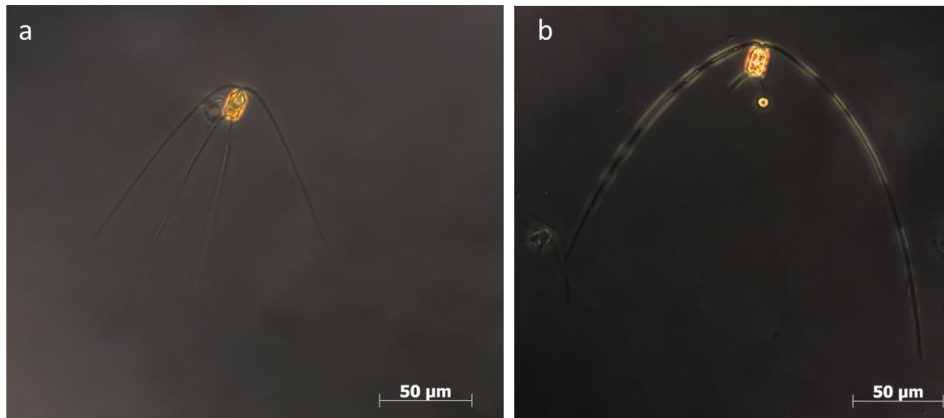
**Tablica 11.** Morfometrijski parametri vrste *C. peruvianus*: dužina i širina stanica i širina i ukupna dužina seta prikazani u  $\mu\text{m}$ .

Vrsta	Medij	Dužina stanica			Širina stanica		
		[ $\mu\text{m}$ ]	stdev	p	[ $\mu\text{m}$ ]	stdev	p
<i>C. peruvianus</i>	F/2	16,47	4,10	3,89E-03	7,2	1,46	4,11E-01
	P-limit	19,28	7,37		7,0	9,26	
		Ukupna dužina seta			Širina seta		
		[ $\mu\text{m}$ ]	stdev	p	[ $\mu\text{m}$ ]	stdev	p
	F/2	4,18E+02	1,01E+02	4,73E-9	1,65	2,63E-01	1,27E-02
	P-limit	6,72E+02	1,63E+02		1,83	2,23E-01	



**Slika 56.** Dužina stanica (pervalvarna os), širina stanica, ukupna dužina seta i širina seta vrste *C. peruvianus* analiziranih F/2 i P limitiranom mediju.

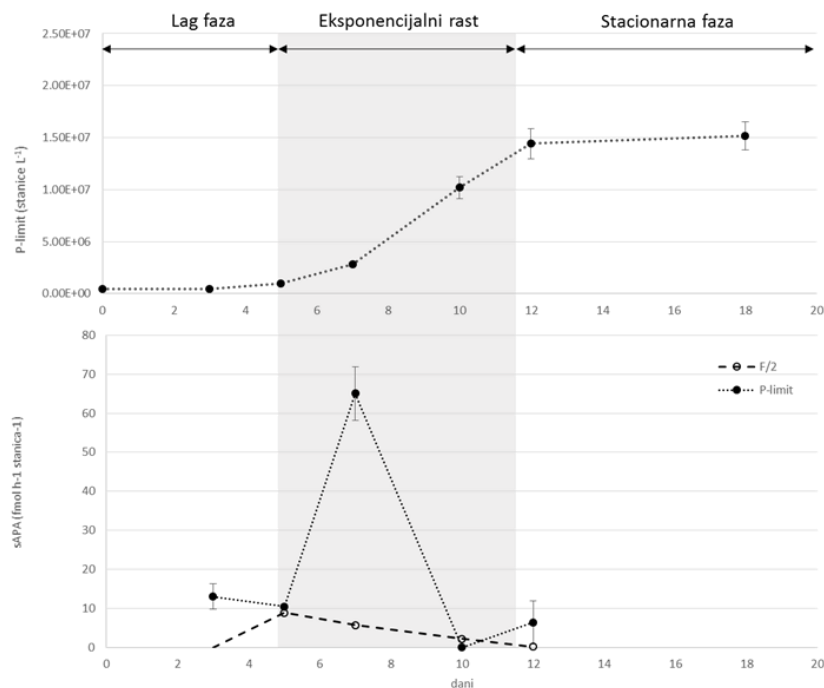




**Slika 57.** Stanice *C. peruvianus* uzgojene u F/2 (a) i P limitiranom (b) mediju. Svjetlosni mikroskop.

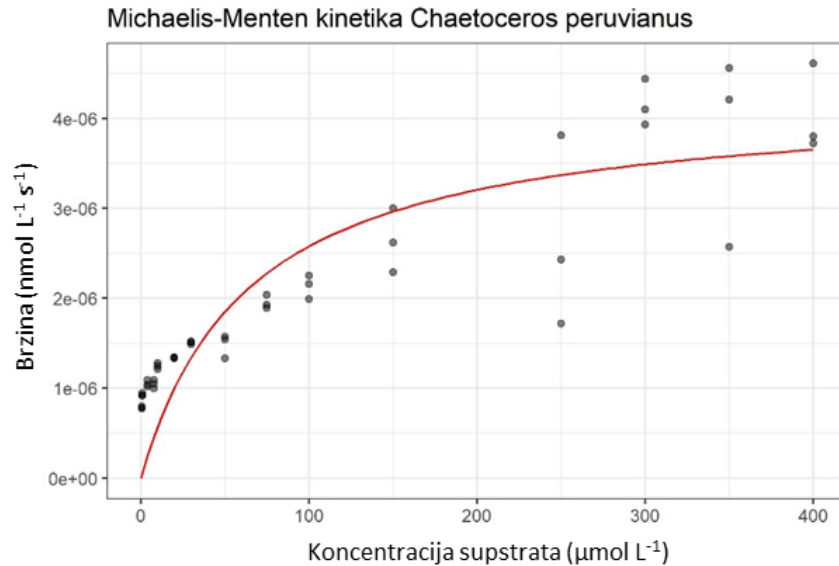
### Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze

U P limitiranom mediju izmjerena je maksimalna sAPA od  $65 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  na početku eksponencijalne faze rasta. Tijekom ove i stacionarne faze sAPA se smanjivala do minimalne vrijednosti od  $10 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ . U F/2 mediju izmjerene su niske vrijednosti sAPAE od oko  $8 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  tijekom lag faze i na početku eksponencijalne faze, nakon čega je kontinuirano opadala tijekom eksponencijalne faze rasta stanica i ostala niska i na početku stacionarne faze ( $0,2 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ ) (Slika 58).



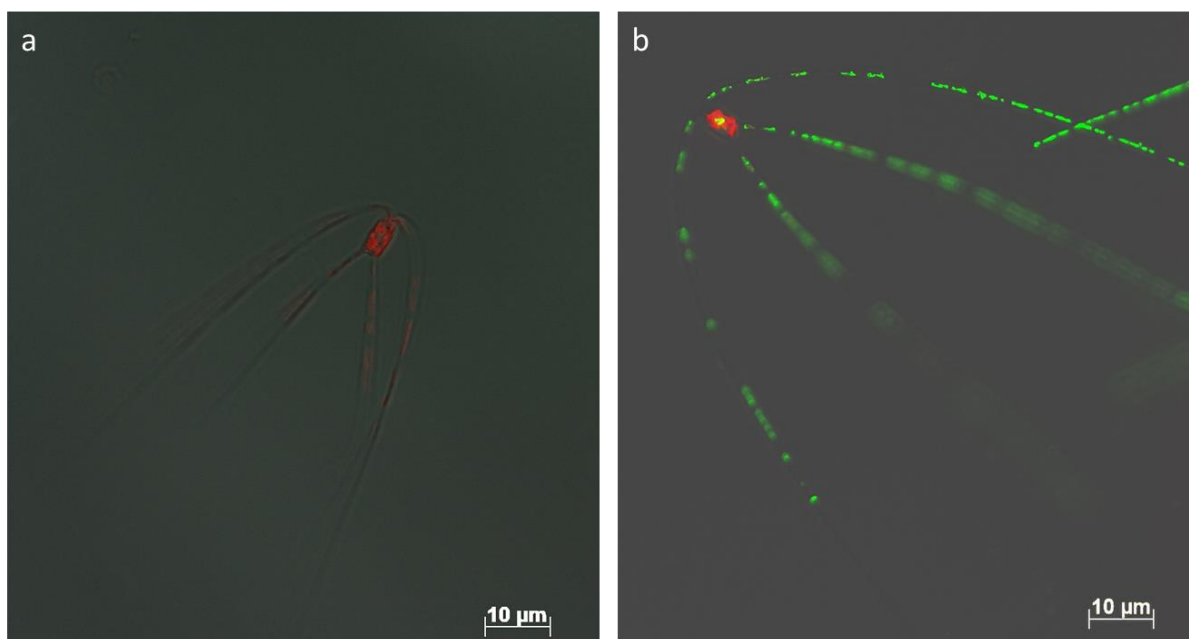
**Slika 58.** Dinamika sAPAE po stanici vrste *C. peruvianus* u F/2 i P limitiranom mediju u usporedbi sa krivuljom rasta navedene vrste u P limitiranom mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

Maksimalna brzina ( $V_{max}$ ) enzima iznosila je  $4,24 \times 10^{-6}$  nmol L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, dok je  $K_M$  vrijedost iznosila 64,59  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Ovako visoka vrijednost ukazuje na enzim izrazito niskog afiniteta prema supstratu (Slika 59).



**Slika 59.** Michaelis-Mentenova krivulja kinetike APAe kod vrste *C. peruvianus* u P limitiranom mediju

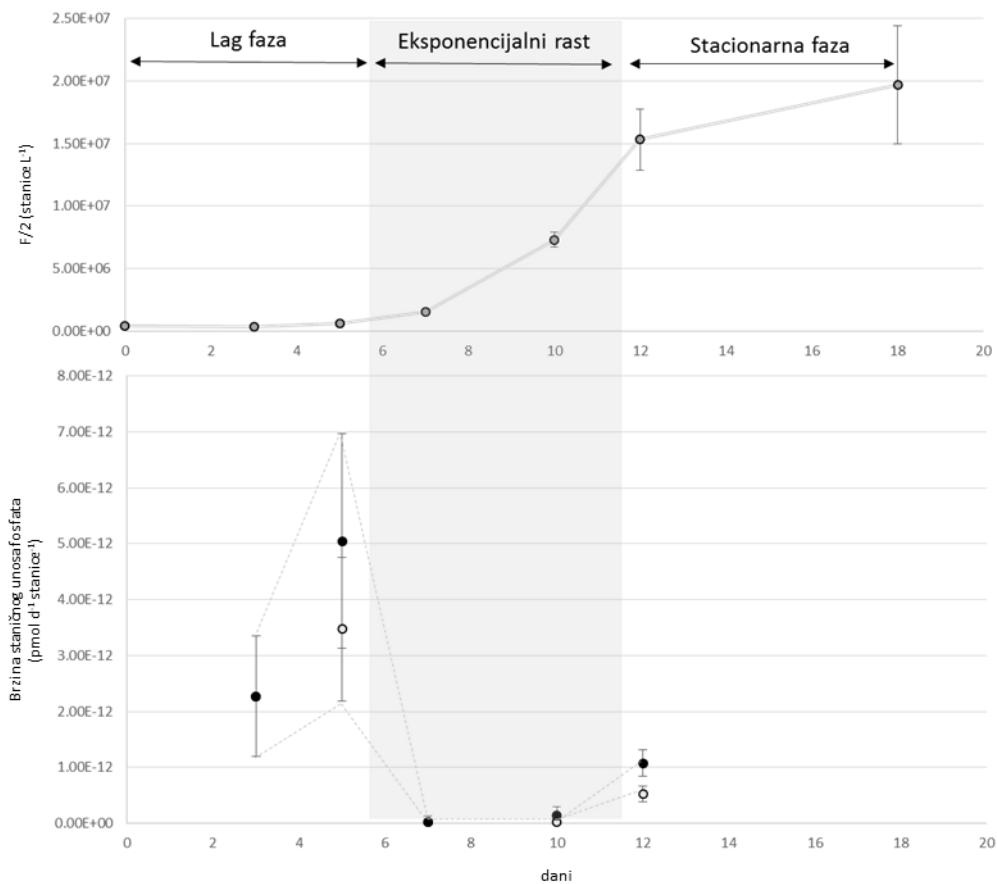
Kod ove vrste vidljivo je da je cjelokupna aktivnost enzima točkasto raspoređena po setama stanice (Slika 60).



**Slika 60.** Stanice *C. peruvianus* u F/2 (a) i P limitiranom (b) mediju. Epifluorescentni mikroskop (zeleni signal - lokalizacija APAe na stanicama, crveni signal - plastidi).

### Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata

Izračunate brzine staničnog unosa fosfata u F/2 mediju bile su između  $0,01 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  i  $5,04 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanice}^{-1}$ . Koncentracije otopljenog anorganskog fosfata u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimenta bile su ispod razine detekcije našeg instrumenta ( $0,02 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) te brzine unosa nisu računane. Dinamika brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata pokazala je visoku brzinu po stanici te njen porast tijekom lag faze. Nakon toga je slijedilo naglo smanjenje i vrlo niske stope unosa tijekom eksponencijalne faze rasta stanica, da bi na početku stacionarne faze rasta stanica došlo do blagog povećanja (Slika 61).



**Slika 61.** Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata kod vrste *C. peruvianus* u F/2 mediju uspoređena sa krivuljom rasta navedene vrste u F/2 mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

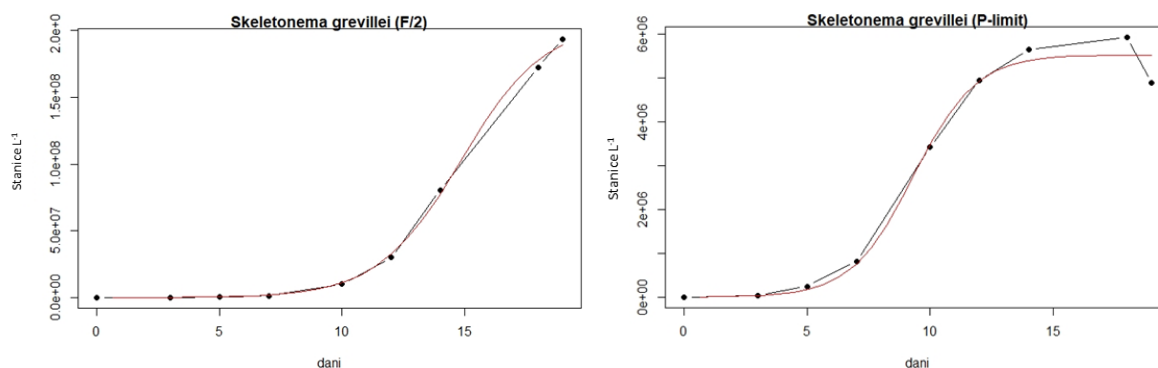
### 5.2.2.3. *Skeletonema grevillei* Sarno i Zingone 2005

#### Dinamika rasta

Kulture u F/2 i P limitiranom mediju na početku eksperimenta imale su brojnost stanica od  $4,54 \times 10^4$  stanica  $L^{-1}$ . Početak eksponencijalne faze ova vrsta je dosegla nakon 10 dana u F/2, a u P limitiranom nakon pet dana. Početak stacionarne faze u F/2 mediju nije dosegnut do kraja eksperimenta, dok je u P limitiranom mediju dosegnut nakon 12 dana (Tablica 12). Točku inflekcije (najkraće generacijsko vrijeme) *S. grevillei*, u F/2 mediju dostignula je nakon 14,9 dana, a u P limitiranom mediju nakon 9,32 dana (Tablica 12). Najkraće generacijsko vrijeme za kulture u F/2 bilo je 1,18 dana, dok je za one u P limitiranom mediju bilo 0,87 dana (Slika 62).

**Tablica 12.** Dinamika rasta vrste *S. grevillei* prikazana kao stanice  $L^{-1}$

Vrsta	Medij	Početak eksponencijalnog rasta			Točka inflekcije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze		
		[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev
<i>S. grevillei</i>	F/2	10	9.97E+06	4.16E+05	14,9	7.89E+07	6.71E+06	/	/	/
	P-limit	5	3.47E+06	1.07E+06	9,32	1.07E+06	7.74E+05	12	5.00E+06	1.08E+06

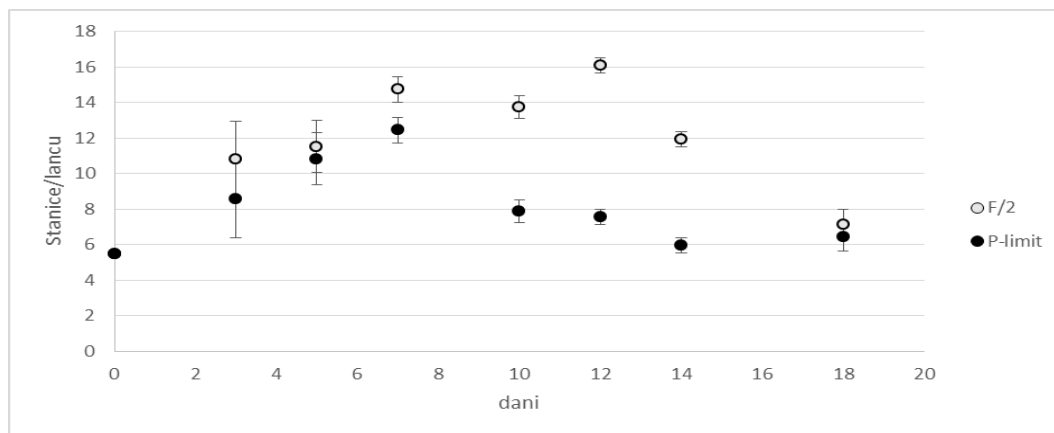


**Slika 62.** Krivulje rasta *S. grevillei*: prosječne brojnosti stanica u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

#### Morfološke reakcije na različite hranjive uvjete

Analiza prosječnih duljina lanaca pokazala je da su lanci tijekom cijelog eksperimenta bili dulji u F/2 mediju, za razliku od stanica koje su rasle u P limitiranom mediju. Broj analiziranih lanaca u F/2 mediju u prosjeku je bio 110 (u rasponu od 26 do 255 analiziranih lanaca svaki dan eksperimenta), a u P limitiranom mediju 132 (u rasponu od 25 do 248 analiziranih lanaca svaki dan eksperimenta). *S. grevillei* je imala maksimalnu prosječnu duljinu lanca od 16 stanica lanac<sup>-1</sup> u F/2 mediju 12. dan eksperimenta i 12 stanica lanac<sup>-1</sup> u P

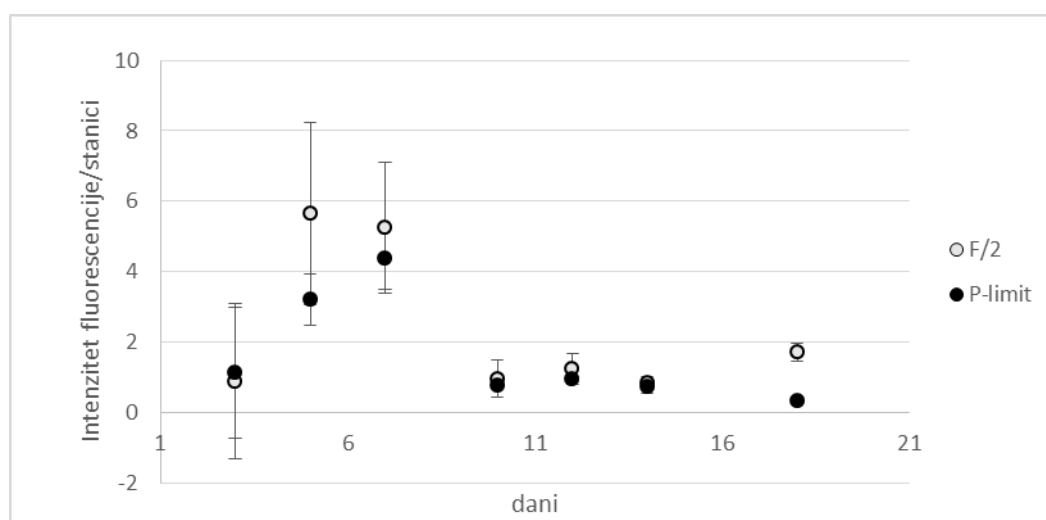
limitiranom mediju, sedmi dan eksperimenta. Minimalna prosječna duljina lanca bila je 5 stanica lanac<sup>-1</sup> prvog dana eksperimenta u oba medija (Slika 63). Kod ove vrste nisu uočene druge morfološke razlike između stanica koje su rasle u F/2 i P limitiranom mediju.



**Slika 63.** Prosječne duljine lanca vrste *S. grevillei* u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

#### *Intenzitet fluorescencije klorofila*

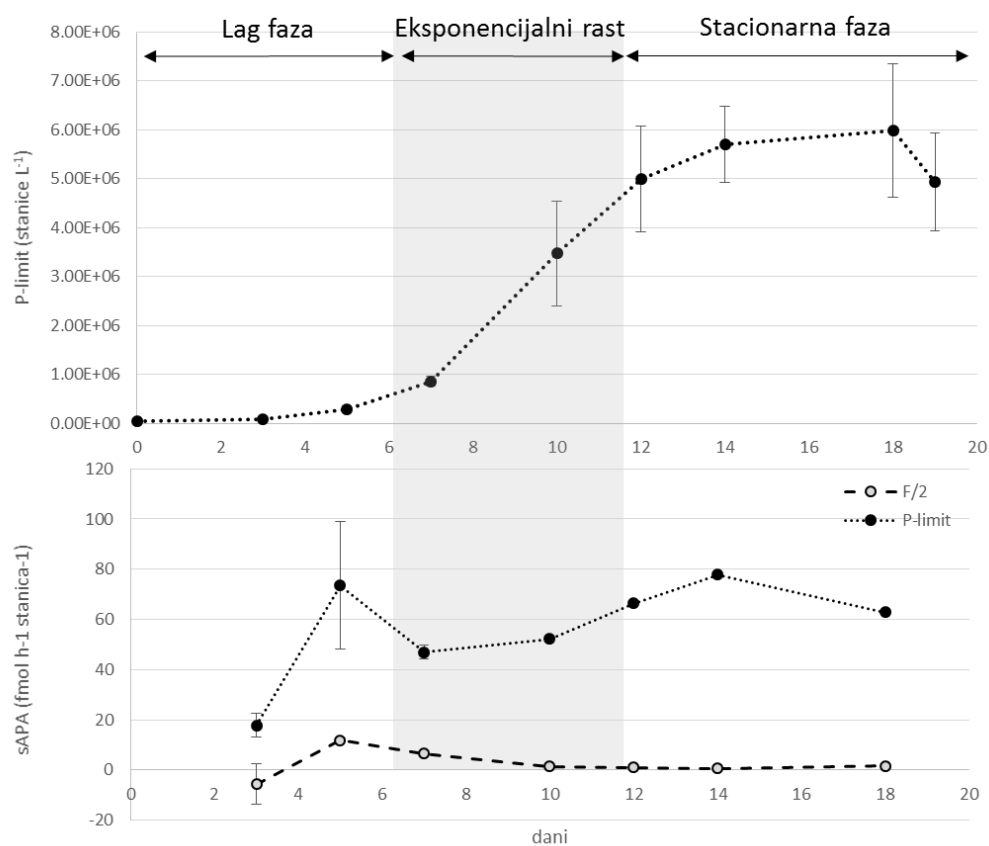
Mjereni intenzitet fluorescencije klorofila/stanici na početku eksperimenta bio je veći u F/2 nego u P limitiranom mediju. U nastavku trajanja eksperimenta razlika se smanjila ali su i dalje stanice koje su rasle u F/2 mediju imale djelomično veći intenzitet fluorescencije klorofila po stanici. Najveća razlika između medija zabilježena je petog dana eksperimenta. Tijekom faze usporenog rasta (lag faza), nizak broj stanica rezultirao je relativno velikim standardnim odstupanjima (Slika 64).



**Slika 64.** Intenzitet fluorescencije klorofila *S. grevillei* po stanici u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

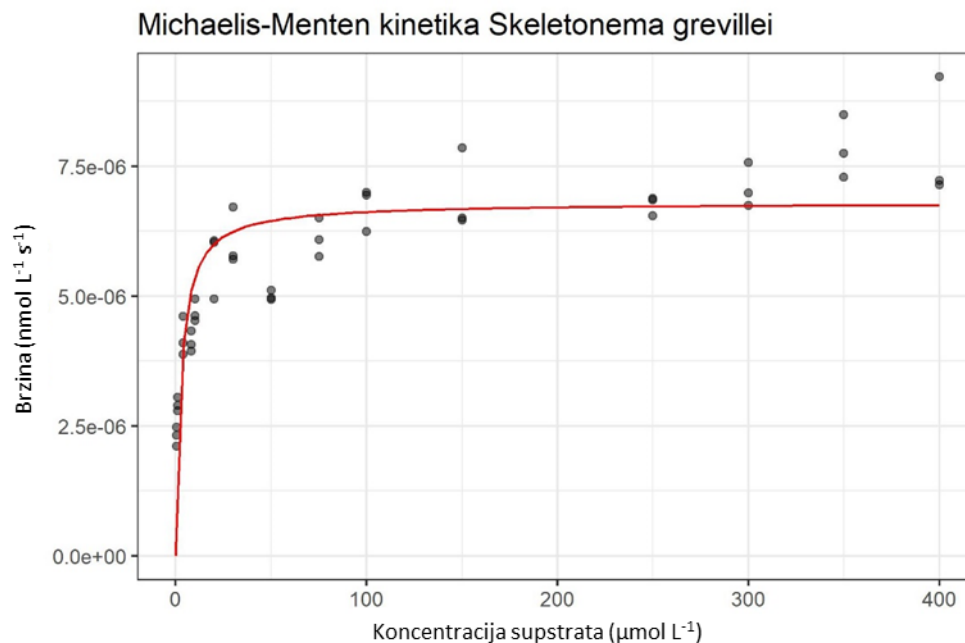
### Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze

U P limitiranom mediju izmjerena je minimalna sAPA od  $17 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  na početku eksperimenta. Aktivnost se naglo povećala peti dan eksperimenta dok su stanice još uvijek bile u fazi usporenog rasta, nakon čega je aktivnost kontinuirano rasla do početka stacionarne faze kada je dosegla maksimalnu aktivnost  $37 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ . U F/2 mediju uočena je niska aktivnost. Maksimum je izmjeren peti dan kada je iznosio  $11 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ , nakon čega je kontinuirano opadao i ostao na granici detekcije do kraja eksperimenta. Minimum je izmjeren 14. dan eksperimenta sa vrijednosti od  $0,6 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  (Slika 65).



**Slika 65.** Dinamika sAPAE po stanici vrste *S. grevillei* u F/2 i P limitiranom mediju u usporedbi sa krivuljom rasta navedene vrste u P limitiranom mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), ekspancijalne i stacionarne faze rasta stanica.

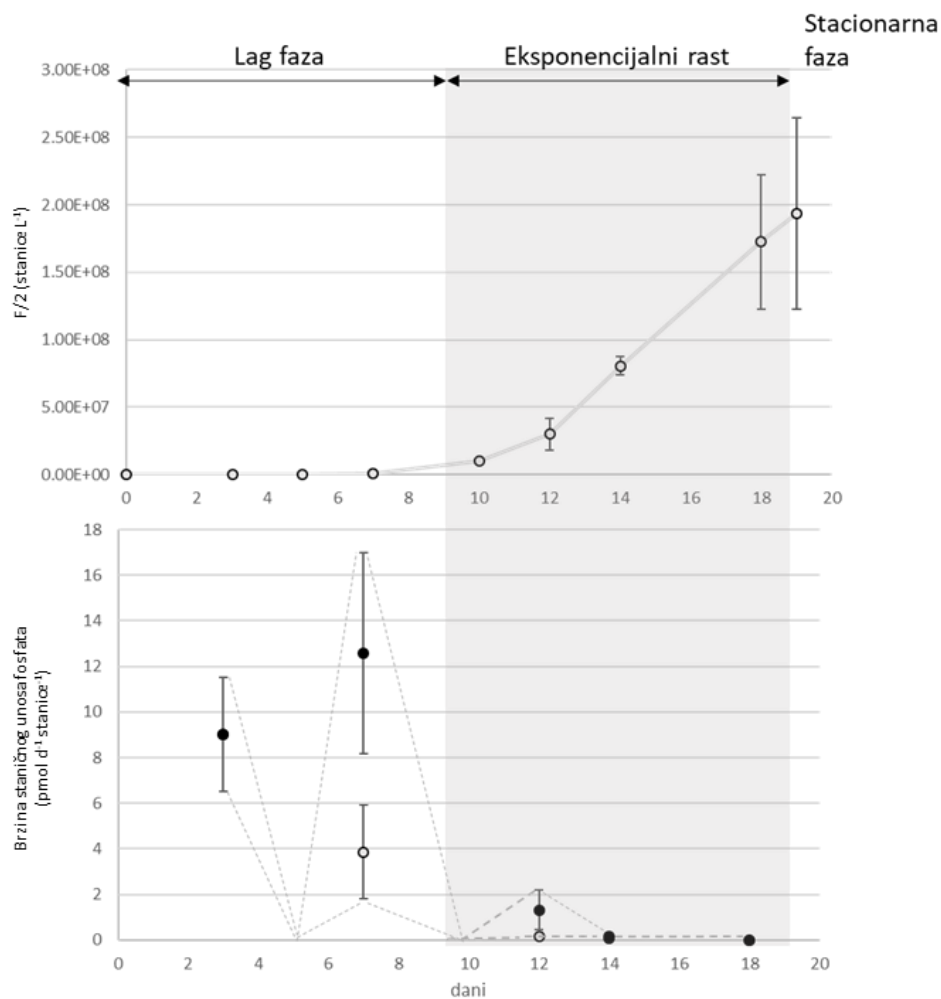
Maksimalna brzina ( $V_{\max}$ ) enzima iznosila je  $6,79 \times 10^{-6} \text{ nmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a stabilizirala se pri koncentracijama supstrata višim od  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Michaelis-mentenova konstanta ( $K_M$ ) od  $2,6 \text{ } \mu\text{M}$  ukazuje na enzim s visokim afinitetom prema supstratu (Slika 66).



**Slika 66.** Michaelis-Mentenova krivulja kinetike APAe kod vrste *S. grevillei* u P limitiranom mediju.

#### *Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata*

Izračunate brzine staničnog unosa otopljenog anorganskog fosfata u F/2 mediju bile su između  $0,24 \times 10^{-5} \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  i  $12,56 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanice}^{-1}$ . Koncentracije otopljenog anorganskog fosfata u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimenta bile su ispod razine detekcije našeg instrumenta ( $0,02 \text{ } \mu\text{M}$ ) te brzine unosa nisu računane. Dinamika brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata pokazala je povećanu brzinu staničnog unosa na početku lag faze rasta stanica, nakon čega je slijedio drastični pad brzine te ponovni drastični porast pri kraju lag faze. Na početku eksponencijalne faze rasta stanica, brzina unosa ponovo se drastično snizila, zatim blago porasla te nakon toga blago opadala do završetka eksperimenta (Slika 67).



**Slika 67.** Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata kod vrste *S. grevillei* u F/2 mediju uspoređena sa krivuljom rasta navedene vrste u F/2 mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

### 5.2.3. Arafidne penatne dijatomeje

#### 5.2.3.1. *Thalassionema frauenfeldii* (Grunow) Tempère i Peragallo 1910

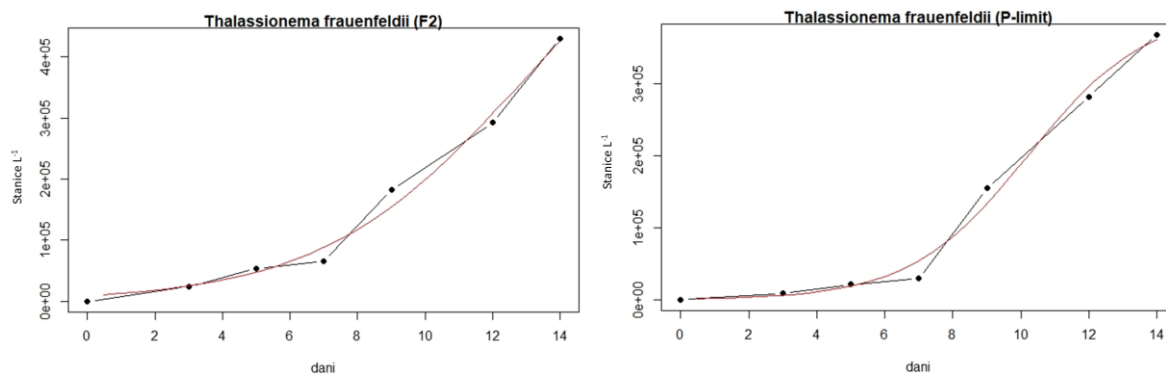
##### *Dinamika rasta*

Kulture u F/2 i P limitiranom mediju na početku eksperimenta imale su brojnost stanica od  $3,4 \times 10^4$  stanica  $L^{-1}$ . Početak eksponencijalne faze ova vrsta je dosegla nakon 7 dana u oba medija. Stacionarna faza u oba medija nije dosegnuta do kraja eksperimenta (Tablica 13). Točku infleksije *T. frauenfeldii*, u F/2 mediju dosegla je nakon 12,8 dana, a u P limitiranom mediju nakon 10,2 dana (Tablica 13). Najkraće generacijsko vrijeme za kulture u F/2 bilo je 2,06 dana, dok je za one u P limitiranom mediju bilo 1,2 dana (Slika 68).



**Tablica 13.** Dinamika rasta vrste *T. frauenfeldii* prikazana kao stanice L<sup>-1</sup>

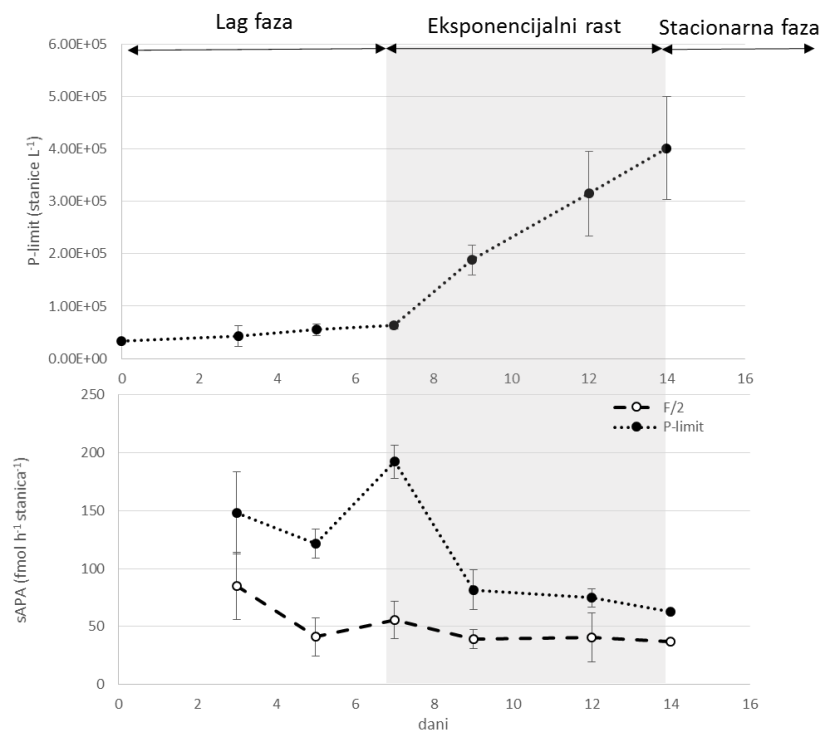
Vrsta	Medij	Početak eksponencijalnog rasta			Točka infleksije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze		
		[dani]	[stanice L <sup>-1</sup> ]	stdev	[dani]	[stanice L <sup>-1</sup> ]	stdev	[dani]	[stanice L <sup>-1</sup> ]	stdev
<i>T. frauenfeldii</i>	F/2	7	9.9E+04	2.9E+04	12,8	3.3E+05	6.0E+04	/	/	/
	P-limit	7	6.3E+04	6.1E+03	10,2	1.9E+05	2.9E+04	/	/	/



**Slika 68.** Krivulje rasta *T. frauenfeldii*: prosječne brojnosti stanica u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

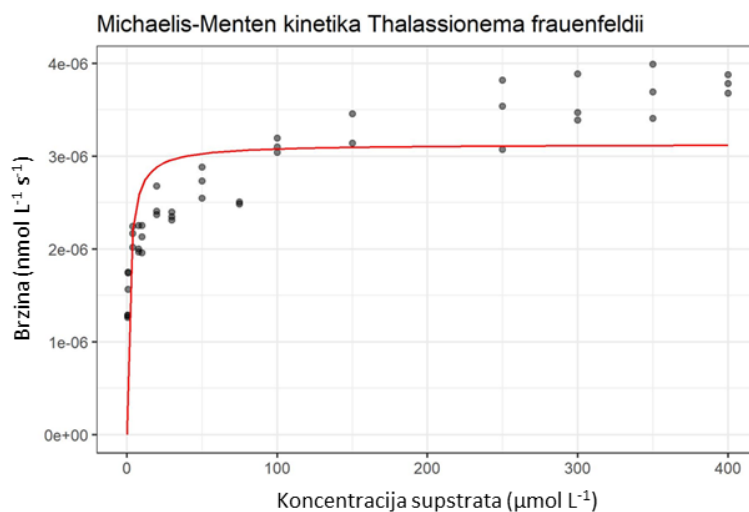
#### *Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze*

U P limitiranom mediju sAPA je na početku eksperimenta imala visoku vrijednost, nakon čega je ta aktivnost blago pala te na početku eksponencijalne faze rasta stanica dosegla maksimalnu vrijednost od 192 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup>. Nakon postizanja maksimalne vrijednosti tijekom eksponencijalne faze rasta stanica aktivnost se naglo smanjila devetog dana te se nastavila kontinuirano smanjivati do kraja eksperimenta s minimalnom vrijednosti od 63 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup>. U F/2 mediju aktivnost je pratila dinamiku u P limitiranom mediju ali sa nižim vrijednostima tijekom cijelog eksperimenta, s razlikom vremena maksimuma i minimuma aktivnosti. U F/2 mediju je maksimalna aktivnost bila izmjerena je treći dan eksperimenta s vrijednosti od 84 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup>, dok je minimum aktivnosti imala također zadnji dan eksperimenta kada je pala na vrijednost od 37 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup> (Slika 69).



**Slika 69.** Dinamika sAPAE vrste *T. frauenfeldii* u F/2 i P limitiranom mediju u usporedbi sa krivuljom rasta navedene vrste u P limitiranom mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

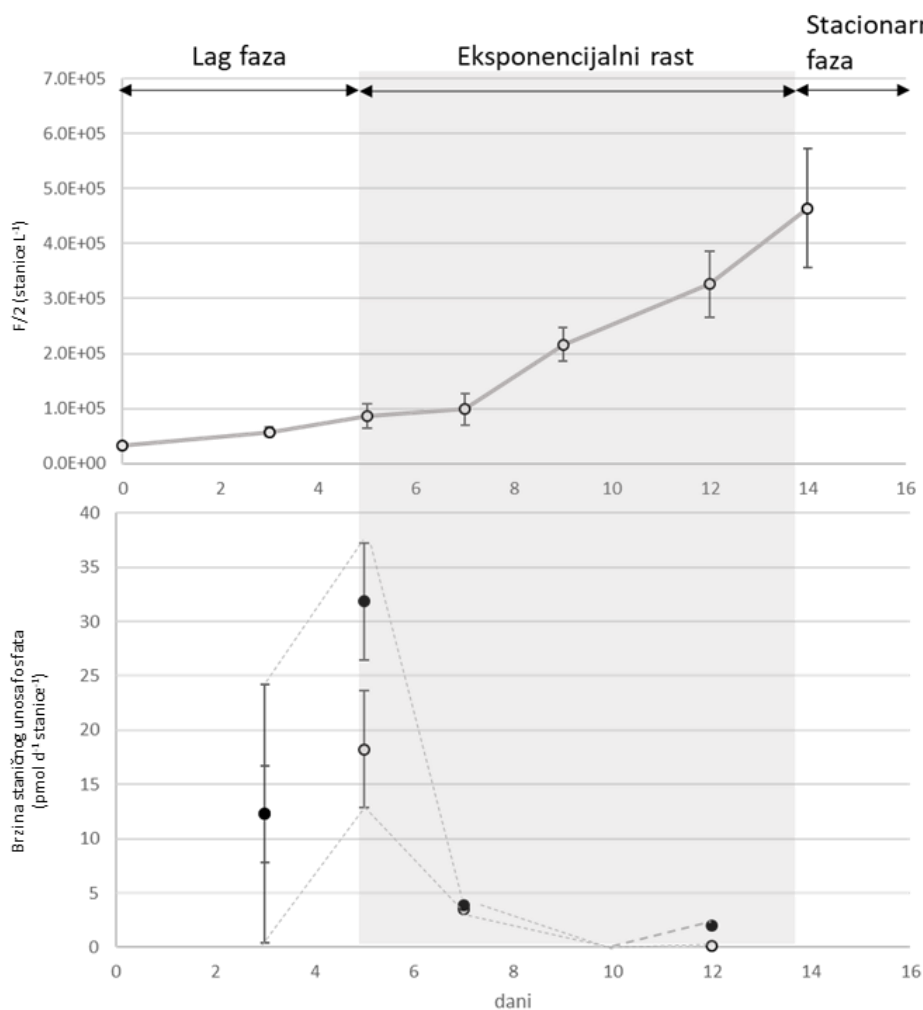
Maksimalna brzina ( $V_{max}$ ) enzima iznosila je iznosila  $3,13 \times 10^{-06} \text{ nmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a stabilizirala se već pri koncentraciji supstrata višom od  $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Niska vrijednost  $K_M$  od  $1,68 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ukazuje na enzim sa izrazito visokim afinitetom prema supstratu (Slika 70). Za ovu vrstu su izračunate najniže vrijednosti od svih prikazanih vrsta što ukazuje da sintetizira enzim s najvećim afinitetom prema supstratu.



**Slika 70.** Michaelis-Mentenova krivulja kinetike APAE kod vrste *T. frauenfeldii* u P limitiranom mediju.

### Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata

Izračunate brzine unosa staničnog otopljenog anorganskog fosfata u F/2 mediju bile su između  $0,12 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  i  $31,86 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanice}^{-1}$ . Koncentracije otopljenog anorganskog fosfata u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimenta bile su ispod razine detekcije našeg instrumenta ( $0,02 \text{ }\mu\text{M}$ ) te brzine unosa nisu računate. Dinamika brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata pokazala je povećanu brzinu staničnog unosa u lag fazi. Na početka eksponencijalne faze rasta brzina se povećala do maksimuma, nakon čega se naglo smanjila do sredine eksponencijalne faze, nakon čega je blago rasla do kraja eksperimenta (Slika 71).



**Slika 71.** Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata kod vrste *T. frauenfeldii* u F/2 mediju uspoređena sa krivuljom rasta navedene vrste u F/2 mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

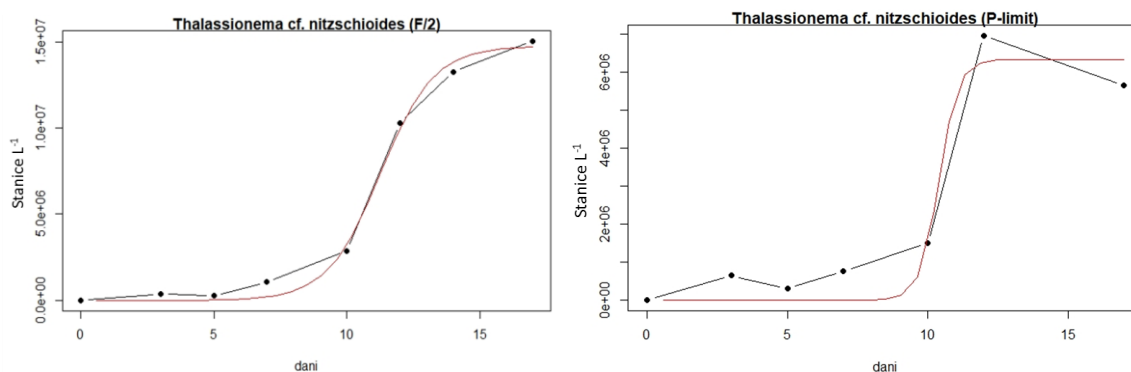
### 5.2.3.2. *Thalassionema cf. nitzschioides* (Grunow) Mereschkowsky 1902

#### Dinamika rasta

Kulture su u oba medija na početku eksperimenta imale brojnost stanica od  $17,74 \times 10^4$  stanica  $L^{-1}$ . Početak ekspanzije ove vrste je dosegla nakon 7 dana u oba medija, a stacionarne nakon 12 dana u oba medija (Tablica 14). Točku infleksije *T. cf. nitzschioides*, u F/2 mediju dosegla je nakon 11,3 dana, a u P limitiranom mediju nakon 10,04 dana (Tablica 14). Najkraće generacijsko vrijeme za kulture u F/2 bilo je 0,696 dana, dok je za one u P limitiranom mediju bilo 0,24 dana (Slika 72).

**Tablica 14.** Dinamika rasta vrste *T. cf. nitzschioides* prikazana kao stanice  $L^{-1}$

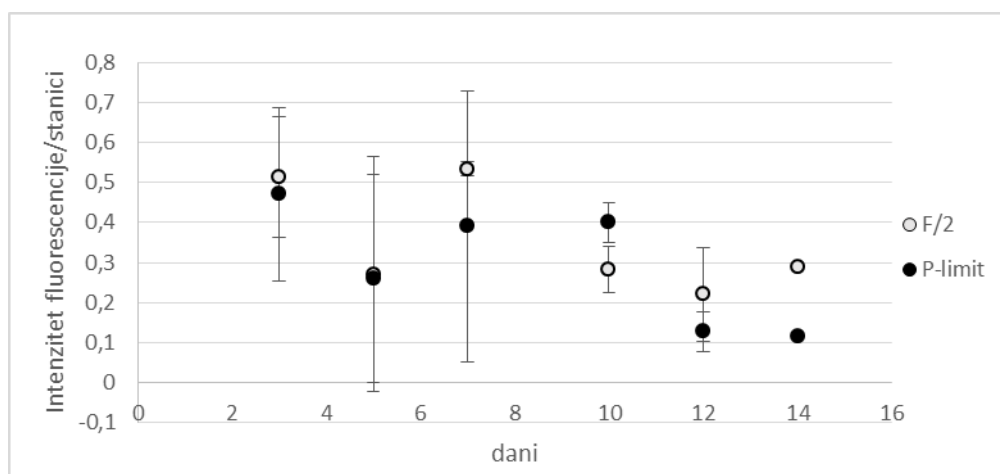
Vrsta	Medij	Početak ekspanzije			Točka infleksije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze		
		[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev
<i>T. cf. nitzschioides</i>	F/2	7	5.10E+05	2.91E+05	11,3	1.04E+07	1.75E+06	12	1.04E+07	1.75E+06
	P-limit	7	7.57E+05	1.48E+05	10,04	1.57E+06	9.18E+05	12	5.86E+06	1.55E+06



**Slika 72.** Krivulje rasta *T. cf. nitzschioides*: prosječne brojnosti stanica u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

### Intenzitet fluorescencije klorofila

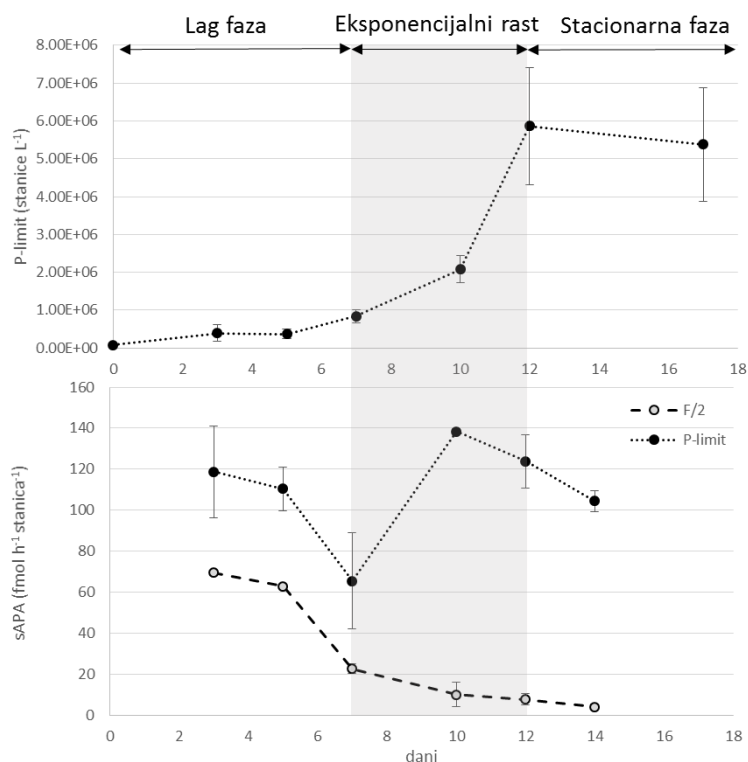
Intenzitet fluorescencije klorofila je tijekom cijelog eksperimenta bio viši kod stanica koje su rasle u F/2 mediju, od onih koje su rasle u P limitiranom mediju. Najveća razlika između medija zabilježena je posljednjeg dana eksperimenta. Tijekom faze usporenog rasta (lag faza), nizak broj stanica rezultirao je relativno velikim standardnim odstupanjima (Slika 73).



**Slika 73.** Intenzitet fluorescencije klorofila *T. cf. nitzschioides* po stanici u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

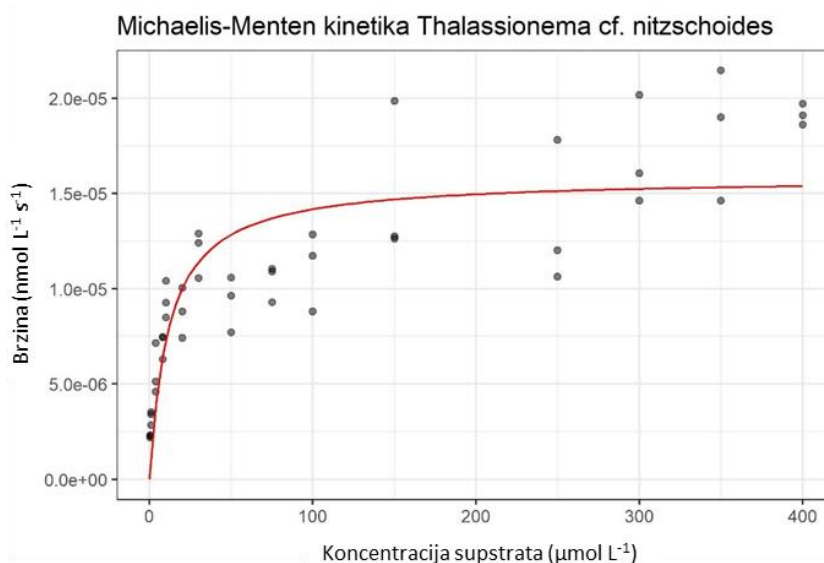
### Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze

U P limitiranom mediju na početku eksperimenta je sAPA bila visoka ali ne i maksimalna. Aktivnost se kontinuirano smanjivala do početka eksponencijalne faze rasta kada je pala na minimalnu vrijednost od  $66 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ , nakon čega se ponovo povećavala do početka stacionarne faze kada dosegula maksimalnu vrijednost od  $138 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ . Tijekom stacionarne faze rasta aktivnost je blago opadala do kraja eksperimenta. Specifična APA je u F/2 mediju maksimalnu vrijednost imala na početku eksperimenta kada je iznosila  $69 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  nakon čega je opadala tijekom trajanja eksperimenta te je minimalna vrijednost izmjerena zadnji dan eksperimenta kada je iznosila  $3 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  (Slika 74).



**Slika 74.** Dinamika sAPAA vrste *T. cf. nitzschioides* u F/2 i P limitiranom mediju u usporedbi sa krivuljom rasta navedene vrste u P limitiranom mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), ekspanencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

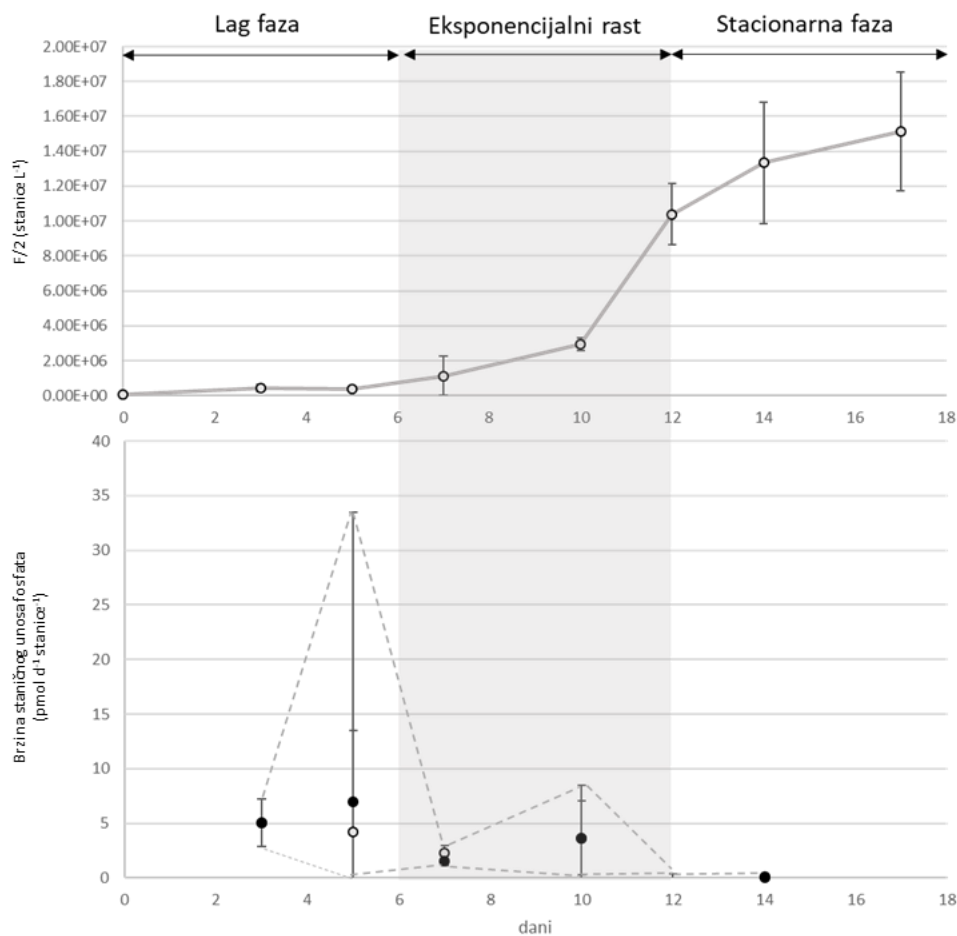
Maksimalna brzina enzima ( $V_{max}$ ) iznosila je  $1,58 \times 10^{-5} \text{ nmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a stabilizirala se pri koncentracijama supstrata višim od  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Niska  $K_M$  vrijednost od  $11,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  ukazuje na enzim sa visokim afinitetom prema supstratu (Slika 75).



**Slika 75.** Michaelis-Mentenova krivulja kinetike APAA kod vrste *T. cf. nitzschioides* u P limitiranom mediju.

### Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata

Izračunate brzine staničnog unosa otopljenog anorganskog fosfata u F/2 mediju bile su između  $0,02 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  i  $6,9 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanice}^{-1}$ . Koncentracije otopljenog anorganskog fosfata u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimenta bile su ispod razine detekcije našeg instrumenta ( $0,02 \text{ }\mu\text{M}$ ) te brzine unosa nisu računane. Dinamika brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata pokazala je povećanje brzine staničnog unosa tijekom stacionarne faze. Brzina se smanjila na početku eksponencijalne faze nakon čega je pri kraju eksponencijalne faze blago porasla. Od kraja eksponencijalne faze i tijekom stacionarne faze je kontinuirano padala do kraja eksperimenta (Slika 76).



**Slika 76.** Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata kod vrste *T. cf. nitzschoides* u F/2 mediju uspoređena sa krivuljom rasta navedene vrste u F/2 mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), ekspanencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

## 5.2.4. Rafidne penatne dijatomeje

### 5.2.4.1. *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden 1928

Izgled vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima* pod svjetlosnim mikroskopom prikazan je na slici 77.



Slika 77. Lanac *P. delicatissima* – svjetlosni mikroskop

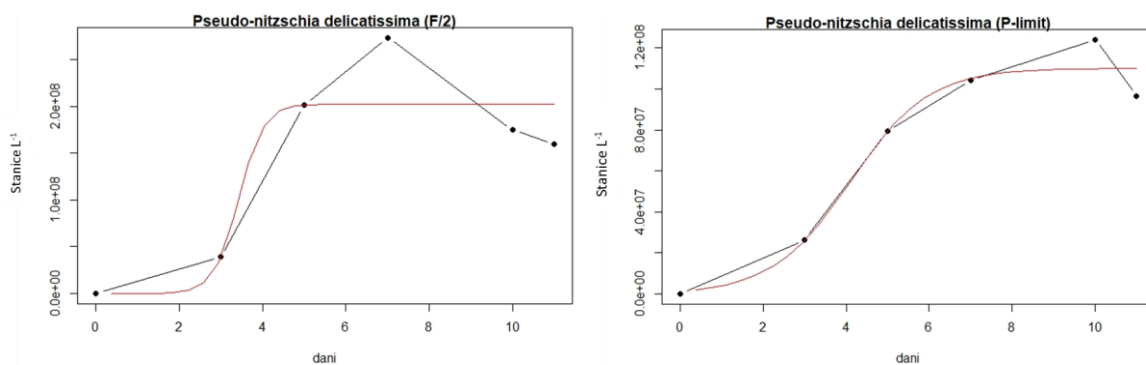
#### *Dinamika rasta*

Kulture u u oba medija na početku eksperimenta imale su brojnost stanica od  $5,78 \times 10^5$  stanica  $L^{-1}$ . Početak eksponencijalne faze ova vrsta je dosegla nakon 3 dana u oba medija, a stacionarne nakon 7 dana u F/2 i 10 dana u P limitiranom mediju (Tablica 15). Točku inflekcije *P. delicatissima* u F/2 mediju postigla je nakon 3,43 dana, a u P limitiranom mediju nakon 4,11 dana (Tablica 15). Najkraće generacijsko vrijeme za kulture u F/2 mediju bilo je 0,27 dana, dok je za one u P limitiranom mediju bilo 0,66 dana (Slika 78).

Tablica 15. Dinamika rasta vrste *P. delicatissima* prikazana kao stanice  $L^{-1}$

Vrsta	Medij	Početak eksponencijalnog rasta			Točka inflekcije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze		
		[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev
<i>P. delicatissima</i>	F/2	3	3.97E+07	1.56E+07	3,43	3.97E+07	1.56E+07	7	2.74E+08	6.54E+07
	P-limit	3	2.70E+07	4.32E+06	4,11	7.99E+07	4.62E+06	10	1.37E+08	2.12E+07

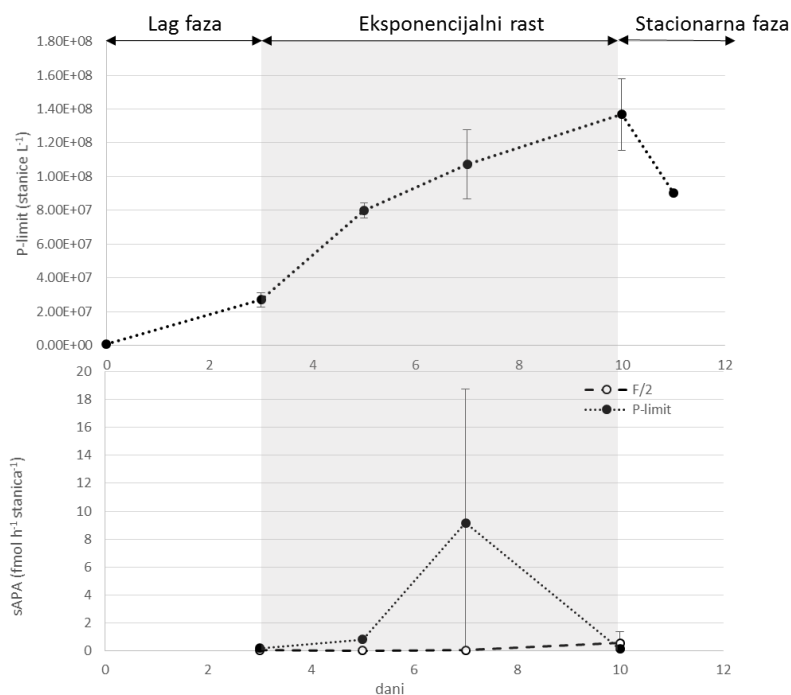




**Slika 78.** Krivulje rasta *P. delicatissima*: prosječne brojnosti stanica u F/2 i P limitiranom mediju tijekom eksperimenta.

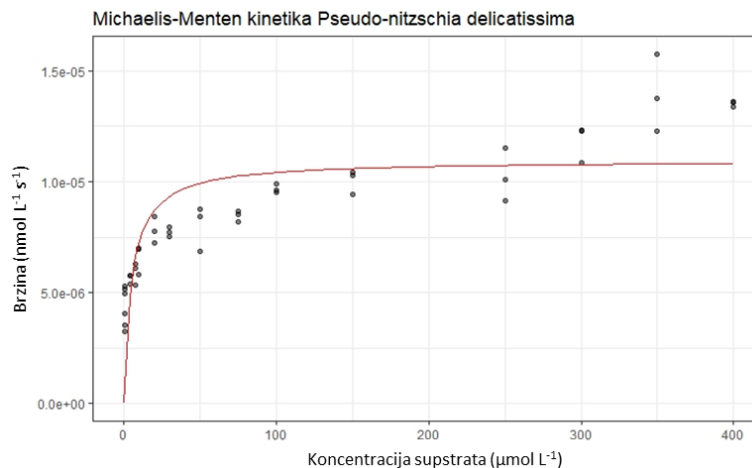
### Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze

U P limitiranom mediju, trećeg dana eksperimenta koji je ujedno bio i prvi dan mjerenja aktivnosti te početak eksponencijalne faze rasta stanica, sAPA je bila niska. Aktivnost je rasla do sredine eksponencijalne faze do maksimalne vrijednosti od 9 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup>, nakon čega je opadala do početka stacionarne faze, kada je pala na minimalnu vrijednost od 0,2 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup>. U F/2 mediju je APA bila ispod granice detekcije pa se sAPA nije mogla računati (Slika 79).



**Slika 79.** Dinamika sAPAE vrste *P. delicatissima* u F/2 i P limitiranom mediju u usporedbi sa krivuljom rasta navedene vrste u P limitiranom mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

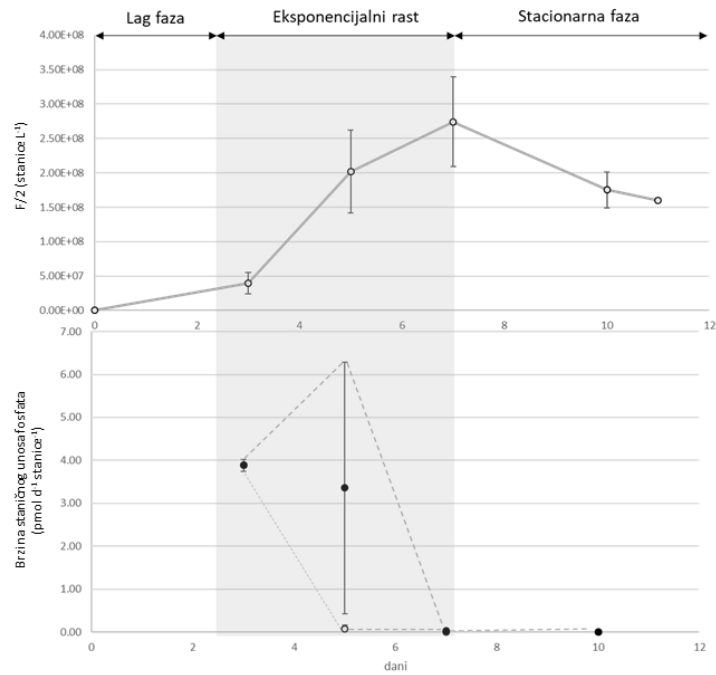
Maksimalna brzina enzima ( $V_{\max}$ ) enzima kod ove vrste iznosila je  $1,1 \times 10^{-5}$   $\text{nmol L}^{-1} \text{s}^{-1}$  pri koncentracijama supstrata višim od  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Niska  $K_M$  od  $5,23 \mu\text{mol L}^{-1}$  ukazuje na enzim sa visokim afinitetom prema supstratu (Slika 80).



**Slika 80.** Michaelis-Mentenova krivulja kinetike APAe kod vrste *P. delicatissima* u P limitiranom mediju.

#### *Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata*

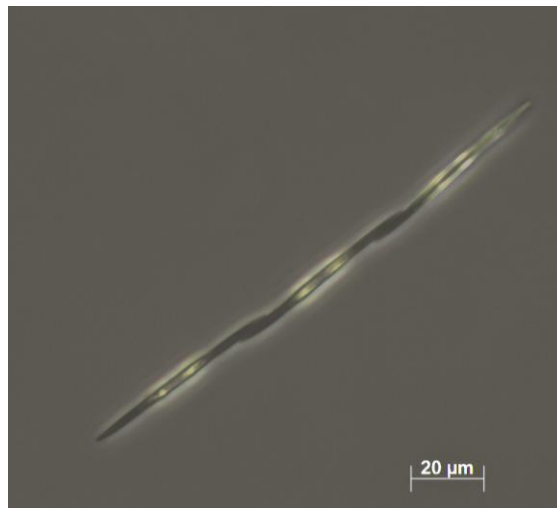
Izračunate brzine staničnog unosa otopljenog anorganskog fosfata u F/2 mediju bile su između  $5,63 \times 10^{-3}$   $\text{pmol d}^{-1} \text{stanica}^{-1}$  i  $3,89 \text{ pmol d}^{-1} \text{stanice}^{-1}$ . Koncentracije otopljenog anorganskog fosfata u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimenta bile su ispod razine detekcije našeg instrumenta ( $0,02 \mu\text{M}$ ) te brzine unosa nisu računane. Dinamika brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata pokazala je povećanu brzinu staničnog unosa na početku eksponencijalne faze rasta stanica, nakon čega se blago povećala te na kraju eksponencijalne faze smanjila. Niska brzina se zadržala do kraja eksperimenta (Slika 81).



**Slika 81.** Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata kod vrste *P. delicatissima* u F/2 mediju uspoređena sa krivuljom rasta navedene vrste u F/2 mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

#### 5.2.4.2. *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup i Hasle 2003

Izgled vrste *Pseudo-nitzschia calliantha* pod svjetlosnim mikroskopom prikazan je na slici 82.



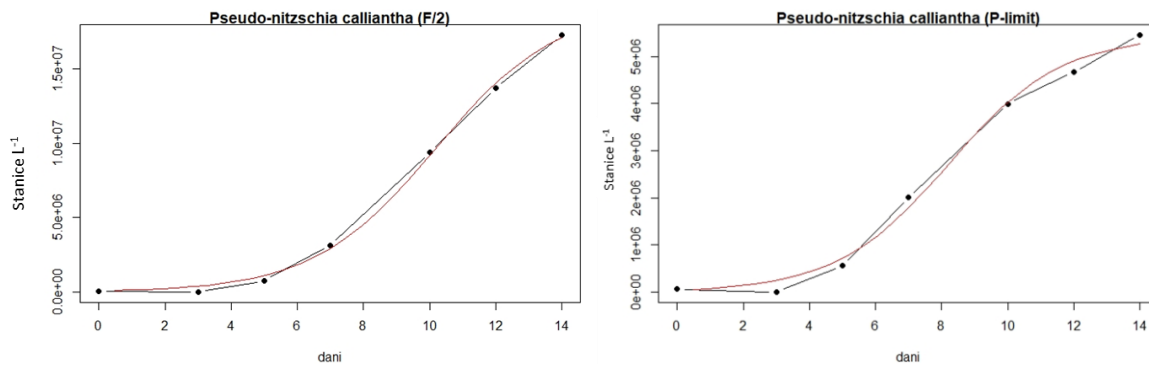
**Slika 82.** Lanac *P. calliantha* – svjetlosni mikroskop

## Dinamika rasta

Kulture su na početku eksperimenta u oba medija imale brojnost stanica od  $3,79 \times 10^5$  stanica  $L^{-1}$ . Početak eksponencijalne faze ova vrsta je dosegla nakon 5 dana u oba medija, a stacionarne nakon 10 dana u P limitiranom mediju dok u F/2 mediju, do kraja eksperimenta, stanice nisu ušle u stacionarnu fazu (Tablica 16). Točku infleksije *P. calliantha* je u F/2 mediju postigla nakon 10,2 dana, a u P limitiranom mediju nakon 8,22 dana (Tablica 16). Najkraće generacijsko vrijeme za kulture u F/2 bilo je 1,28 dana, dok je za one u P limitiranom mediju bilo 1,18 dana (Slika 83).

**Tablica 16.** Dinamika rasta vrste *P. calliantha* prikazana kao stanice  $L^{-1}$

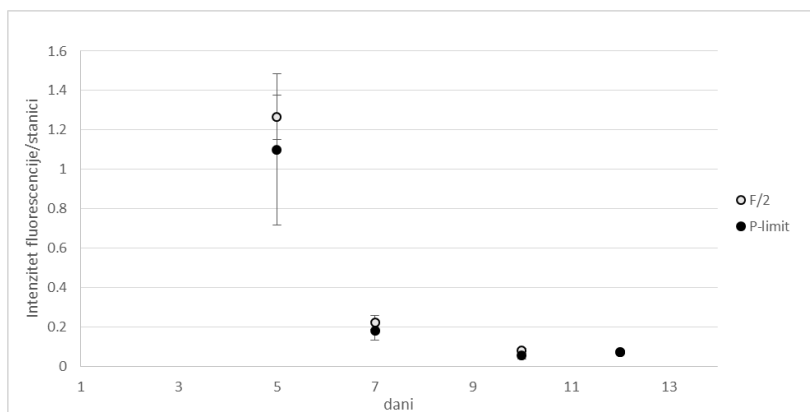
Vrsta	Medij	Početak eksponencijalnog rasta			Točka infleksije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze		
		[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev	[dani]	[stanice $L^{-1}$ ]	stdev
<i>P. calliantha</i>	F/2	5	1.54E+07	2.42E+06	10,2	9.45E+06	0.00E+00	/	/	/
	P-limit	5	1.01E+07	9.66E+05	8,22	2.07E+06	3.58E+05	10	6.92E+07	1.28E+07



**Slika 83.** Krivulje rasta *P. calliantha*: prosječne brojnosti stanica u F/2 i P limitiranom mediju tijekom trajanja eksperimenta.

## Intenzitet fluorescencije klorofila

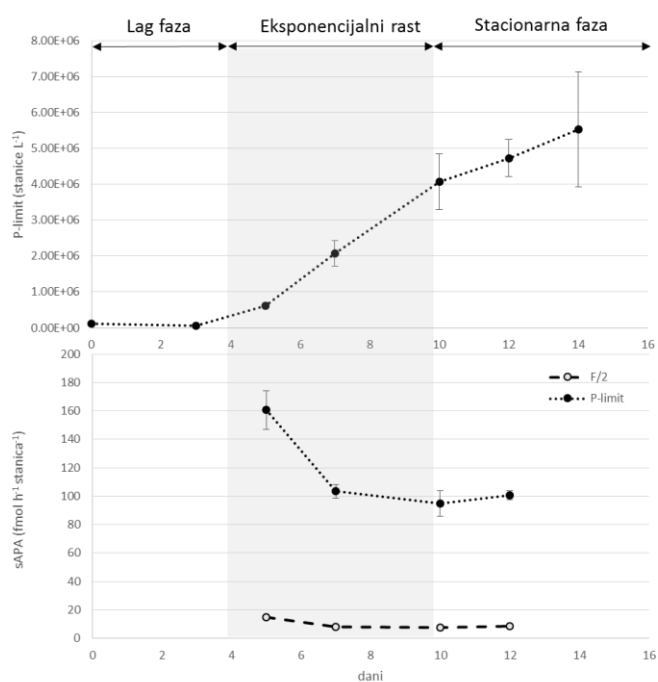
Podaci analize intenziteta fluorescencije klorofila/stanici pokazali su da je intenzitet fluorescencije tijekom cijelog eksperimenta kod stanica koje su rasle u F/2 bio približno isti kao i kod onih koje su rasle u P limitiranom mediju. Razlika je bila najvidljivija na početku eksperimenta te se do kraja eksperimenta razlika kontinuirano smanjivala da bi zadnji dan intenzitet fluorescencije bio gotovo isti u oba medija (Slika 84).



**Slika 84.** Intenzitet fluorescencije klorofila *P. calliantha* po stanici u F/2 i P limitiranom mediju za cijelo vrijeme trajanja eksperimenta.

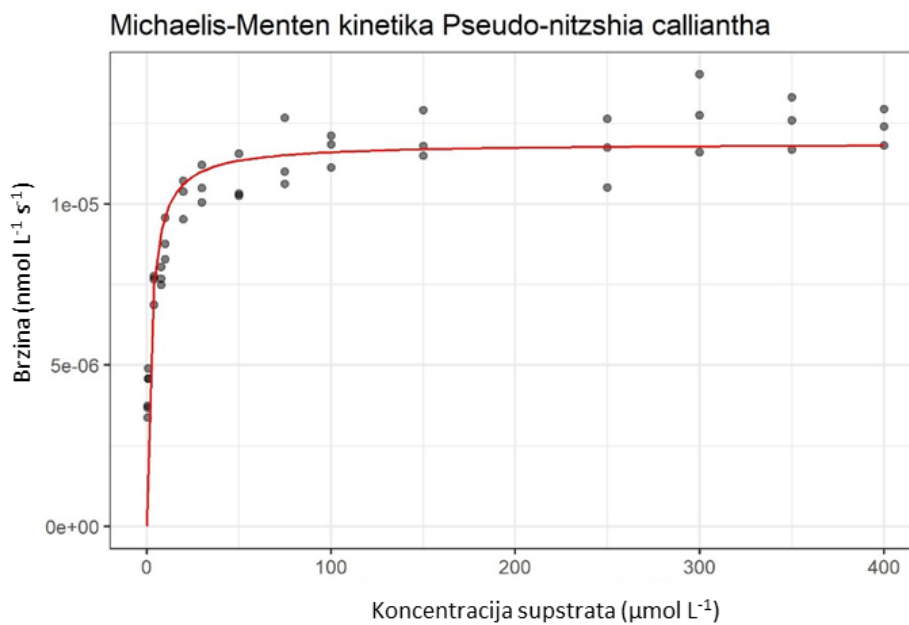
### Aktivnost, kinetika i lokalizacija enzima alkalne fosfataze

U P limitiranom mediju na početku eksperimenta, kada su stanice ušle u eksponencijalnu fazu rasta, izmjerena je maksimalna APA od  $160 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ , ta se aktivnost smanjivala do početka stacionarne faze do minimalne aktivnosti od  $94 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ , nakon čega je ponovo blago porasla ulaskom stanica u stacionarnu fazu rasta. U F/2 mediju izmjerena je konstantno niska aktivnost sa vrijednostima između 7 i 15  $\text{fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  (Slika 85).



**Slika 85.** Dinamika sAPAE vrste *P. calliantha* u F/2 i P limitiranom mediju u usporedbi sa krivuljom rasta navedene vrste u P limitiranom mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

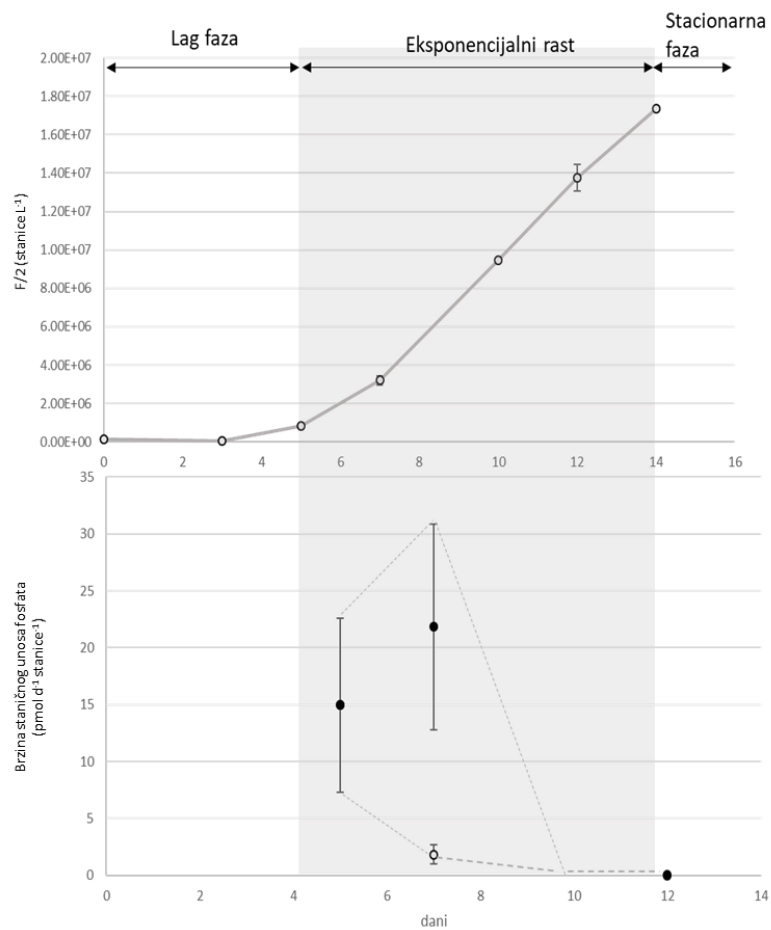
Maksimalna brzina ( $V_{\max}$ ) enzima iznosila je  $1,19 \times 10^{-5} \text{ nmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a stabilizirala se pri koncentracijama supstrata višima od  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Niska  $K_M$  vrijednost od  $2,35 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ukazuje na enzim niskog afiniteta prema supstratu (Slika 86).



**Slika 86.** Michaelis-Mentenova krivulja kinetike APAe kod vrste *P. calliantha* u P limitiranom mediju.

### Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata

Izračunate brzine staničnog unosa otopljenog anorganskog fosfata u F/2 mediju bile su između  $7,29 \times 10^{-3} \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  i  $21,85 \text{ pmol d}^{-1} \text{ stanice}^{-1}$ . Koncentracije otopljenog anorganskog fosfata u P limitiranom mediju tijekom cijelog eksperimenta bile su ispod razine detekcije našeg instrumenta ( $0,02 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) te brzine unosa nisu računane. Dinamika brzine unosa otopljenog anorganskog fosfata pokazala je povećanu brzinu staničnog unosa na početku eksponencijalne faze. Sedmi dan eksperimenta naglo je porasla, a već slijedeći dan mjerenja se smanjila te je do kraja eksperimenta ostala izrazito niska (Slika 87).



**Slika 87.** Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata kod vrste *P. calliantha* u F/2 mediju uspoređena sa krivuljom rasta navedene vrste u F/2 mediju, tijekom faze usporenog rasta (lag faza), eksponencijalne i stacionarne faze rasta stanica.

## 6. DISKUSIJA

U nastavku slijedi diskusija prilagodbi dijatomeja odabranih za izradu ovog doktorata, na promjene koncentracija fosfora, pojedinih strategija koje su ove vrste razvile za svladavanje limitacije fosforom te povezivanje rezultata eksperimentalnih istraživanja sa rezultatima dugoročnih promjena u cilju boljeg razumijevanja dinamike i ekologije svake pojedine vrste.

### 6.1. Prilagodbe odabranih vrsta dijatomeja na promjene koncentracija fosfora

#### 6.1.1. Prilagodbe dinamike rasta ovisno o različitim koncentracijama fosfora

Rezultati eksperimentalnih analiza dinamike rasta pokazali da su neke vrste u P limitiranim uvjetima brže započele eksponencijalni rast ali su veću brojnost postigle u P bogatim uvjetima (*L. aporus* i *S. grevillei*), ovim vrstama pripada i *C. peruvianus* s tim da je kod ove vrsta lag faza samo blago bila skraćena, dok je kod *L. aporus* lag faza bila kraća za čak četiri dana, a kod *S. grevillei* upola kraća kod stanica koje su rasle u P limitiranim uvjetima. Kod *C. peruvianus* su razlike u brojnostima između uvjeta bile minimalne. Veće brojnosti u P bogatim uvjetima postižu i vrste *T. frauenfeldii*, *T. cf. nitzschioides* i *P. calliantha*, s tim da su kod vrste *T. frauenfeldii*, kao i kod *C. peruvianus* razlike između uvjeta bile minimalne. Za razliku od *L. aporus*, *S. grevillei* i *C. peruvianus*, vrste *T. frauenfeldii*, *T. cf. nitzschioides* i *P. calliantha* su eksponencijalnu fazu rasta započele u isto vrijeme u oba uvjeta. Vrste *L. aporus*, *S. grevillei*, *C. peruvianus* i *P. calliantha* su u P limitiranim uvjetima ranije ušle u stacionarnu fazu rasta od onih u P bogatim uvjetima, s tim da je početak ove faze rasta kod *C. peruvianusa* bio puno manje izražen u odnosu na druge tri vrste. *T. frauenfeldii* do kraja eksperimentalnog razdoblja ni u jednom od uvjeta nije ušla u stacionarnu fazu, a stanice vrste *T. cf. nitzschioides* su stacionarnu fazu započele istog dana (Prilog 2). Iz navedenog možemo zaključiti da vrste *L. aporus* i *S. grevillei* na uvjete smanjene dostupnosti anorganskog fosfora reagiraju ranim početkom ubrzane diobe stanica ali i ranijim pokretanjem stacionarne faze rasta pri nižim brojnostima stanica u P limitiranim uvjetima u usporedbi sa P bogatim uvjetima. Malo je vjerojatno da je početak stacionarne faze rasta uvjetovan visokom brojnošću stanica, ako se uspoređi sa brojem stanica u mediju bogatom anorganskim fosforom. Stoga se može pretpostaviti da je u trenutku početka stacionarne faze rasta došlo do limitacije fosforom te da stanice nisu bile u mogućnosti nastaviti daljnji rast i razmnožavanje. Iz ovoga se može zaključiti da ove vrste imaju duže razdoblje prilagodbe ukoliko se u okolišu nađu u uvjetima bogatim anorganskim fosforom ali nakon što se



prilagodbe mogu postići izrazito velike brojnosti, u suprotnom, ukoliko se nađu u uvjetima kada je dostupnost anorganskog fosfora smanjena, reagiraju brzo ali vjerojatno ne postižu veliku brojnost. Za vrste *C. peruvianus* i *T. frauenfeldii* se može zaključiti da rastu jednakom brzinom i postižu približno jednake brojnosti bilo da u okolišu ima malo ili puno anorganskog fosfora te možemo zaključiti da promjene u rastu i brojnosti ovih vrsta u okolišu nisu značajno uvjetovane koncentracijom anorganskog fosfora u moru. Za *T. cf. nitzschioides* i *P. calliantha* možemo zaključiti da mogu postići veću brojnost u uvjetima kada postoji dovoljna količina anorganskog fosfora. Slične reakcije na ograničenje fosforom zabilježene su i za druge vrste dijatomeja poput *Phaeodactylum tricornutum* (Alipanah i sur. 2018).

Za razliku od prethodno spomenutih vrsta, vrste *L. hargravesii* i *C. decipiens* su eksponencijalni rasta započele isti dan u oba uvjeta, međutim stanice *L. hargravesii* su u P limitiranim uvjetima u stacionarnu fazu rasta ušle kasnije od onih u P bogatim uvjetima, dok su kod vrste *C. decipiens* stanice u oba uvjeta istovremeno ušle u stacionarnu fazu. Brojnost stanica je kod obje vrste na kraju eksperimentalnog razdoblja bila viša u P limitiranim uvjetima, s tim da je ta razlika kod *C. decipiens* bila minimalna (Prilog 2). Iz ovoga se može zaključiti da *L. hargravesii* postiže veću brojnost u uvjetima kada anorganskog fosfora nema u visokim koncentracijama. Manja dostignuta maksimalna brojnost stanica u P bogatom mediju u usporedbi s P limitiranim medijem mogla bi biti rezultat inhibicije sekundarnih metabolita koji se akumuliraju kod rasta stanica u P bogatim uvjetima, koji se u uvjetima kada je fosfor manje dostupan ne akumuliraju do te mjere. Za ovu vrstu možemo pretpostaviti da su joj *in situ* potrebni uvjeti sa ograničenom dostupnošću anorganskog fosfora pri čemu nadvlada ostale fitoplanktonske vrste i postiže izrazito visoku brojnost. Za vrstu *C. decipiens* možemo zaključiti da ima slične prilagodbe kao i *C. peruvianus* i *T. frauenfeldii*, i iako postiže blago povišenu brojnost u P limitiranim uvjetima može se zaključiti da ova vrsta raste jednakom brzinom i postiže približno jednaku brojnost bilo da u okolišu ima malo ili puno anorganskog fosfora te da promjene u rastu i brojnosti ove vrste nisu značajno uvjetovane količinom anorganskog fosfora u moru. Pretpostavljamo da ova vrsta smanjenje dostupnosti anorganskog fosfora ne koristi kao “okidač” za ubrzavanje ili usporavanje stope rasta. Slična opažanja zabilježena su i na vrstama *Chaetoceros curvisetus*, *C. socialis*, *Dytilum brightvelli*, *Skeletonema costatum* i *Cerataulina bergonii* (Finenko i Krupatkina-Akinina 1974).

Od svih istraženih vrsta samo su stanice vrste *P. delicatissima* započele eksponencijalni rast istog dana u oba medija i to relativno brzo (već nakon tri dana). U P limitiranim uvjetima faza eksponencijalnog rasta trajala dulje ali su stanice postigle sličnu brojnost u oba medija (Prilog 2). Iz ovoga se može zaključiti da ova vrsta na dostupnost

fosfora vrlo brzo reagira s ubrzanjem rasta. Za ovu vrstu možemo pretpostaviti da može brzo postići visoku brojnost čak i kada je dostupnost anorganskog fosfora ograničena kako bi nadvladala ostale fitoplanktonske vrste.

### **6.1.2. Morfološke razlike kao odgovor na različite uvjete fosfora**

Od svih istraženih vrsta u ovom doktoratu samo su vrste *L. aporus*, *L. hargravesii*, *C. peruvianus* i *S. grevillei* pokazale izražene morfološke razlike između stanica koje su rasle u P bogatim i P limitiranim uvjetima te smo ih iz tog razloga dodatno analizirali.

Kod vrste *S. grevillei* od svih morfoloških karakteristika razlike su videne jedino kod dužine lanaca između dva uvjeta. Kod vrsta *L. aporus*, *L. hargravesii* i *C. peruvianus* glavna morfološka promjena je bila značajno produžena dužina stanica, odnosno perivalvarna os, a kod vrste *C. peruvianus*, obzirom na strukturu stanica, osim razlike u dužini perivalvarne osi, videne su i značajno povećana dužina i širina seta kod stanica koje su rasle u P limitiranim uvjetima (Prilog 3). Morfometrija stanica koje su rasle u P bogatim uvjetima odgovara izvornim opisima stanica u Nanjappa i sur. (Nanjappa i sur. 2013) za *L. aporus* i *L. hargravesii* i u Hustedt (Hustedt 1962) za vrstu *C. peruvianus*, međutim morfometrija stanica koje su rasle u P limitiranim uvjetima izlaze iz granica navedenih u izvornim opisima. Značajno je da morfometrija stanica vrste *C. peruvianus* u P limitiranim uvjetima više odgovara morfološkom opisu *C. peruvianus* var. *robusta* Cleve iz čega možemo zaključiti da ova vrsta može promijeniti svoju morfologiju kao reakciju na dostupnost hranjivih soli do te mjere da nalikuje na drugi varijetet. Ovo sugerira da je *C. peruvianus* var. *robusta* Cleve zapravo sinonim za *Chaetoceros peruvianus* Brightwell, što znači da bi morfometrijska analiza okolišnih uzoraka mogla biti dobar pokazatelj uvjeta u kojima su stanice rasle. Do sada se mnogo nagađalo o funkciji seta. Pretpostavlja se da na taj način stanice povećavaju svoje dimenzije i da na taj način mogu biti opstrukcija za grabežljivce ili mogu promijeniti hidrodinamiku stanica kako bi smanjile stope tonjenja (Pickett-Heaps i sur. 1994). Međutim, ovo istraživanje je pokazalo da je jedna od funkcija seta povećanje površine na kojoj se sintetizira enzim AP, što omogućuje vrsti bolje nadmetanje za organski fosfat kad je malo anorganskog fosfora u okolišu. Dosadašnja istraživanja na drugim fitoplanktonskim vrstama pokazala su da pod utjecajem hranjivih soli često dolazi do smanjenja veličine stanica, kao što je kod nekih dinoflagelata uočeno za dušik (Ransom Hardison i sur. 2012, Sunda i Ransom Hardison 2010, Sunda i sur. 2007) i željezo (Sunda i Huntsman 1995). Pretpostavlja se da do smanjenja stanica dolazi zbog olakšavanja unosa hranjivih soli povećanjem omjera površine stanice i volumena i stope difuznog protoka hranjivih soli kroz površinu stanice (Sunda i sur.

2007). Suprotno ovome, također je dokazano da prilikom P limitiranih uvjeta dolazi do povećanja stanica, kao što je navedeno za pojedine dinoflagelate (Zhang i sur. 2014, Hardison i sur. 2013, Lim i sur. 2010, Varkitzi i sur. 2010, John i Flynn 2002, Latasa i Berdalet 1994) i dijatomeje (Smodlaka Tanković i sur. 2018a, Liu i sur. 2011), što je pokazano i u ovom doktorskom radu. Povećanje veličine stanica, u uvjetima limitacije fosforom, evolucijski je nepovoljno, obzirom na to da bi stanice trebale smanjiti stopu unosa fosfora po jedinici volumena stanice. Dakle, za razliku od drugih hranjivih soli (npr. Fe i N) mora postojati neki faktor svojstven fosforu koji uzrokuje povećanje veličine stanica u P limitiranim uvjetima. Neka istraživanja su pokazala da P limitacija rezultira zaustavljanjem replikacije DNA (Vaulot i sur. 1996) koja prethodi diobi stanice na manje stanice kćeri (Sclafani i Holzen 2007). U ovom doktorskom radu pokazano je da je vjerojatno jedan od dodatnih razloga, povećanje površine djelova stanice na kojima se sintetizira enzim AP.

Druga morfološka promjena koja se događa kod vrsta koje rade lance je povećanje ili smanjenje duljine lanaca u P limitiranim uvjetima. Vrste *L. aporus* i *L. hargravesii* su povećali prosječne duljine lanaca tijekom cijelog eksperimentalnog razdoblja, dok je kod vrste *S. grevillei* uočeno smanjenje prosječne duljine lanaca u P limitiranim uvjetima (Prilog 3). Povećanje prosječne dužine lanaca kod dvije vrste roda *Leptocylindrus* moglo bi biti rezultat stvaranja stabilnijih veza između stanica ili supresije aktivnog odvajanja stanica. Stvaranje dužih lanaca najvjerojatnije čine vrste *L. aporus* i *L. hargravesii* otpornijima na konzumaciju od strane vrsta koje se hrane fitoplanktonskim organizmima, kao što je prikazano u ranijem istraživanju kod vrste *Skeletonema marinoi* (Smodlaka Tanković i sur. 2018b), dok bi kod vrste *S. grevillei* smanjenje prosječne duljine lanaca moglo bi biti rezultat slabijih veza između stanica, obzirom na nedostatak fosfora.

Spomenute morfološke promjene izazvane ograničenjem fosfata mogu se smatrati korisnim alatom u ekološkim promatranjima. Opisane morfološke promjene mogu se koristiti za dobivanje uvida u ekološke uvjete morfološkom analizom uzoraka dijatomeja. Ovo bi moglo naći primjenu u sedimentnoj/fosilnoj klimatologiji, kao i u analizi nedavnih i povijesnih uzoraka fitoplanktona u istraživanjima klimatskih promjena.

### 6.1.3. Utjecaj dostupnosti fosfora na fluorescenciju klorofila i broj plastida

Od svih istraženih vrsta u ovom doktoratu samo su vrste *L. aporus*, *L. hargravesii*, *S. grevillei* i *T. cf. nitzschioides* pokazale izražene razlike u fluorescenciji klorofila između stanica koje su rasle u P bogatim i P limitiranim uvjetima te smo ih iz tog razloga dodatno analizirali. U istraživanje je bila uključena i vrsta *P. callianthu*, međutim, analize mjerenja su pokazale da nije bilo značajne razlike.

Kod vrsta *L. aporus*, *L. hargravesii*, *S. grevillei* i *T. cf. nitzschioides* intenzitet fluorescencije klorofila pokazao je značajne razlike između stanica uzgojenih P bogatim uvjetima i P limitiranim uvjetima. Tijekom cijelog eksperimentalnog razdoblja intenzitet fluorescencije klorofila bio je niži u stanicama uzgojenim u P limitiranim uvjetima. Kod vrsta *L. aporus* i *L. hargravesii* rezultati su također pokazali da su stanice u P limitiranim uvjetima imale manji broj plastida te su plastidi bili veličinom manji od onih u P bogatim uvjetima. Smanjenje veličine i broja plastida, kao i smanjenje fluorescencije klorofila može biti indikator štetnog utjecaja nedostatka fosfora na strukturu pigmenta. Vrste *L. aporus*, *L. hargravesii*, *S. grevillei* i *T. cf. nitzschioides* su imale jednak odgovor kao i mnoge druge prethodno opisane vrste dijatomeja poput *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Pan i sur. 1996), *Chaetoceros glacialis* (Lombardi i Wangersky 1991), *Chaetoceros curvisetus*, *Skeletonema costatum* (Finenko i Krupatkina-Akinina 1974), *Phaeodactylum tricornerutum* (Alipanah i sur. 2018) i *Thalassiosira weissflogii* (Liu i sur. 2011). Ovim istraživanjima je pokazano da različiti procesi koji se odvijaju u stanicama pod ograničenjem fosfora također utječu na sintezu pigmenta. Pretpostavlja se da zbog nedostatka fosfora može doći do zaustavljanja sinteze pigmenta jer stanice više nisu u stanju sintetizirati dovoljno RNA, pa se tijekom ograničenja fosforom, koncentracije klorofila *a* po stanici često smanjuju. Ovo se tek treba istražiti za sve vrste uključene u ovo istraživanje.

### 6.1.4. Prilagodavanje nedostatku fosfora indukcijom alkalne fosfataze

Maksimalna sAPA za *L. aporus* postignuta je na početku eksperimenta sa vrijednosti od  $694 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ , što je među većim vrijednostima specifičnih aktivnosti izmjerenih u ovom doktorskom radu. To nam ukazuje na to da *L. aporus* najvjerojatnije može relativno uspješno konkurirati za resurse organskog fosfata. Tijekom faze usporenog rasta (lag faza) i eksponencijalne faze rasta APA se kontinuirano smanjivala sve do početka stacionarne faze, kada se polako počela povećavati i na kraju eksperimenta dosegla  $176 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  (Prilog 4). To nam ukazuje na to da bi ova vrsta mogla koristiti APAu za pokretanje i prolongiranje cvjetanja. Stanice *L. aporus* limitirane fosforom akumulirale su maksimalne

količine AP tijekom faze usporenog rasta, koje su se povećale na kraju eksponencijalne faze rasta. Ovo se opažanje može objasniti smanjenim trajanjem faze staničnog ciklusa u kojoj se replicira DNA (S faze) tijekom eksponencijalnog rasta i smanjenom ekspresijom alkalnih fosfataza tijekom faza ubrzanih stopa rasta. U trenucima kada dođe do ubrzane potrošnje anorganskog fosfora, brzi porast APAe pomaže ovoj vrsti da se natječe za organske izvore fosfata u moru.

Za vrste *C. peruvianus*, *T. frauenfeldii* i *P. callianthu* maksimalna sAPA za postignuta je na početku eksponencijalne faze rasta stanica u P limitiranim uvjetima sa vrijednostima od 65 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup> (*C. peruvianus*), 192 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup> (*T. frauenfeldii*) i 160 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup> (*P. calliantha*). Kod vrste *C. peruvianus* niska stanična APA zabilježena je na početku eksperimentalnog razdoblja za vrijeme faze usporenog rasta stanica što je trajalo do početka eksponencijalne faze rasta kada je dosegla maksimalnu vrijednost. Nakon toga je drastično pala te ostala niska do početka stacionarne faze kad je izmjeren maksimum aktivnosti, dok se kod vrste *P. calliantha*, nakon postizanja maksimuma, sAPA kontinuirano smanjivala sve do kraja stacionarne faze. Za razliku od ove dvije vrste, sAPA je kod *T. frauenfeldii* i tijekom lag faze imala je relativno visoke vrijednosti aktivnosti AP, ali se aktivnost, kao i kod *P. calliantha*, nakon postizanja maksimuma kontinuirano snižavala sve do kraja eksperimentalnog razdoblja (Prilog 4). Slična dinamika sAPAe zabilježena je i kod vrste *T. cf. nitzschoides*, kod koje je sAPA je na početku lag faze također imala je relativno visoku vrijednost koja se blago smanjila do početka eksponencijalne faze. Maksimum od 138 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup> postigla je na sredini eksponencijalne faze rasta (Prilog 4) nakon čega se smanjivala sve do kraja eksperimentalnog razdoblja još uvijek zadržavajući relativno visoke vrijednosti. Iz ovoga se može zaključiti da stanice ovih vrsta prilikom P limitacije akumuliraju maksimalne količine AP tijekom faze usporenog rasta i na samom početku ubrzane diobe stanica. Ovo se opažanje može objasniti smanjenim trajanjem faze staničnog ciklusa u kojoj se replicira DNA (S faze) tijekom eksponencijalnog rasta i smanjenom ekspresijom alkalnih fosfataza tijekom faza ubrzanih stopa rasta. U trenutku kada u moru dođe do ubrzane potrošnje anorganskog fosfora, brzi porast sAPAe pomaže vrstama da se natječu za organske izvore fosfata. Porast aktivnosti na početku eksponencijalne faze rasta im pomaže pri nadmetanju za organski fosfat prije nego započnu eksponencijalni rast i eventualno postizanje velikih brojnosti.

Kod vrsta *L. hargravesii* i *C. decipiens* sAPA povećavala se tijekom cijelog eksperimenta, a maksimum je postigla zadnji dan kada je iznosila 904 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup> kod vrste *L. hargravesii*, odnosno 899 fmol h<sup>-1</sup> stanica<sup>-1</sup> kod vrste *C. decipiens* (Prilog 4). Ovakva

dinamika nam pokazuje da su, unatoč povećanim stopama diobe stanica ove vrste uspjele povećati sAPAU tijekom eksponencijalne faze rasta. To nam govori da ove vrste imaju mogućnost korištenja resursa organskog fosfata povećavajući svoju učinkovitost tijekom cijelog razdoblja povećavanja svoje brojnosti u okolišu. Ove vrste, dakle, mogu ne samo inicirati, već i formirati cvat na temelju organskog fosfata *in situ*.

Kod vrste *S. grevillei* minimalna sAPA izmjerena je za vrijeme lag faze rasta stanica i iznosila je  $17 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ , nakon čega je blago porasla. Na početku eksponencijalne faze aktivnost se ponovo smanjila i ostala relativno niska uz kontinuirano povećanje do maksimuma na početku stacionarne faze rasta koji je iznosio  $37 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$  (Prilog 4). Ovakva dinamika nam pokazuje da ova vrsta povećava sAPAU u razdoblju kad su stanice u mirovanju ili se ne dijele, dok se aktivnost smanjuje u razdoblju kada se stanice eksponencijalno dijele. Također možemo vidjeti da ova vrsta u odnosu na sve ostale istraživane vrste ima relativno niske vrijednosti sAPAE (Prilog 4), što nam govori da ova vrsta *in situ* može koristiti resurse organskog fosfata tijekom svih faza rasta ali to može bolje kada su stanice u fazi mirovanja.

Kod vrste *P. delicatissima* tijekom cijele eksponencijalne faze rasta ove vrste zabilježena je niska stanična APA s maksimumom od  $9 \text{ fmol h}^{-1} \text{ stanica}^{-1}$ , u sredini eksponencijalne faze rasta (Prilog 4). Nakon postignutog maksimuma vrijednosti su ponovo pale i ostale niske tijekom cijelog eksperimentalnog razdoblja. To nam govori da se ova vrsta prilagodila na način da postiže visoke vrijednosti u situacijama kad nema niti organskog niti anorganskog fosfora i nema potrebu sintetizirati veliku količinu enzima AP po stanici, niti joj je to energetski isplativo.

Kinetika APAE vrste *T. frauenfeldii* pokazala je najnižu  $K_M$  vrijednost od  $1,68 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  u usporedbi sa drugim prikazanim vrstama (Prilog 4). Niska  $K_M$  vrijednost zabilježena je i kod vrsta *L. aporus* ( $2,51 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), *S. grevillei* ( $2,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), *P. delicatissima* ( $5,23 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) i *P. calliantha* ( $2,35 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Niske  $K_M$  vrijednosti ukazuju na visoki afinitet za supstrat. Iz navedenoga možemo zaključiti da ove vrste imaju visoku sposobnost nadmetanja za organski fosfat kada su koncentracije supstrata niske. Iz ovoga se može zaključiti da ove vrste imaju mogućnost postizanja visokih brojnosti u uvjetima kada su koncentracije organskog fosfata niske. Za razliku od njih, kinetika APAE kod ostalih prikazanih vrsta pokazala je relativno visoku  $K_M$  vrijednost od  $13,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  kod *L. hargravesii*,  $11,14 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  kod *C. decipiens* i  $11,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  kod *T. cf. nitzschoides*, dok je najviša  $K_M$  vrijednost zabilježena kod vrste *C. peruvianus* ( $64,59 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Prilog 4), što ukazuje na niski afinitet za supstrat i smanjenu mogućnost konkuriranja za organski fosfat kada su njegove koncentracije niske, odnosno prilagodbu na više koncentracije organskog fosfata. Iz ovoga možemo zaključiti da

se cvjetanje ovih vrsta može očekivati u uvjetima kada je otopljeni anorganski fosfor potrošen, a organski fosfat dostupan u visokim koncentracijama. Obzirom na izrazito visoku  $K_M$  vrijednost kod vrste *C. peruvianus* odnosno izrazito niski afinitet za supstrat i izrazito smanjenu mogućnost konkuriranja za organski fosfat kada su mu koncentracije niske, to može biti razlog zašto ova vrsta gotovo nikada ne postiže visoke brojnosti i značajan doprinos u mikrofitoplanktonskoj zajednici gdje dominiraju vrste sa višim afinitetom za organski fosfat.

Za lokalizaciju APAe kod vrsta *L. aporus*, *L. Hargravesii* i *C. peruvianus* koristili smo ELF\_97 komplet za otkrivanje endogene fosfataze. Netopivi fluorescentni produkt nakupio se na površini stanica te smo na taj način mogli vidjeti gdje je na stanici koncentrirana aktivnost AP. Kod *L. aporus* i *L. hargravesii* smo vidjeli da se aktivnost pojavljuje na površini stanica, dok se kod vrste *C. peruvianus* pojavljuje na površini seta. Aktivnost je viđena samo kod stanica koje su rasle u P limitiranim uvjetima što je još jedan pokazatelj da ove vrste sintetiziraju AP samo u uvjetima kada je dostupnost anorganskog fosfora ograničena.

#### **6.1.5. Dinamika unosa otopljenog anorganskog fosfata**

Fitoplanktonski organizmi koji se nalaze u sjevernom Jadranu, izloženi su brzo mijenjajućim uvjetima koncentracija hranjivih soli (Egge 1998, Justic i sur. 1995). Sposobnost brzog internaliziranja i iskorištavanja pikova hranjivih soli koji nastaju zbog lokaliziranog donosa hranjivih soli s kopna, iznimno je važan čimbenik za uspješno natjecanje s ostalim fitoplanktonskim organizmima za hranjive soli, poglavito fosfor (Ivančić i sur. 2012, Litchman i Klausmeier 2008). Sve istražene vrste su imale sličnu dinamiku unosa otopljenog anorganskog fosfata. U razdoblju lag faze do sredine eksponencijane faze rasta imale su vrlo visoke stope unosa otopljenog anorganskog fosfata (Prilog 5), nakon čega je kod svih vrsta uslijedio nagli pad te su niske stope unosa zabilježene do kraja eksperimentalnog razdoblja. Iz ovoga se može zaključiti da sve vrste istražene u ovom doktoratu imaju strategiju stvaranja zaliha fosfata neposredno prije nego dođe do značajnijeg sniženja koncentracije anorganskog fosfora u okolišu te svoju brojnost povećavaju koristeći te zalihe. Eksperimentalno je dokazano da je ovo slučaj i za neke druge vrste, poput vrste *Thalassiosira pseudonana* koja stvara zalihe polifosfata kada se nađe u P stresnim uvjetima (Dyhrman i sur. 2012) i kod vrste *Thalassiosira weissflogii* (Liu i sur. 2011) koja može rasti i dijeliti se i do četiri dana u uvjetima potpunog nedostatka fosfora.

## 6.2. Prikaz strategija odabranih vrsta dijatomeja za svladavanje limitacije fosforom i usporedba sa rezultatima statističkih analiza dugoročnog niza podataka prostorne i vremenske rasprostranjenosti odabranih vrsta dijatomeja

Iz prethodno prikazanih rezultata i diskusije dolazimo do slijedećih pretpostavki.

*L. aporus* i *L. hargravesii* reagiraju na sniženje koncentracija anorganskog fosfora pokretanjem eksponencijalnog rasta (već u prvih tri dana) i vrlo visokom sAPAom ukoliko je koncentracija anorganskog fosfora snižena.  $K_M$  APAe kod *L. aporus* je relativno nizak i pokazuje prilagodbu na niske koncentracije organskog fosfata, dok je kod *L. hargravesii*  $K_M$  APAe je relativno visok i pokazuje prilagodbu za visoke koncentracije organskog fosfata. Kod obje vrste se volumen i dužina stanica, kao i dužina lanaca se povećava kada raste u uvjetima snižene koncentracije anorganskog fosfora što povećava staničnu površinu dostupnu za APAu i unos hranjivih soli i čini stanice otpornijima na konzumaciju od strane vrsta koje se hrane fitoplanktonskim organizmima. Koncentracija klorofila u stanicima se smanjuje u takvim uvjetima i upućuje na smanjeni potencijal za fotosintezu kod nestanka anorganskog fosfora. Zamjećeno je da vrste roda *Leptocylindrus* postižu veću brojnost u eutrofnijem području uz zapadnu obalu sjevernog Jadrana ali je također zamjećeno da se pojavljuju u većim brojnostima i s većim udjelom u fitoplanktonskoj zajednici u rano proljeće i rano ljeto, iz toga se može zaključiti da uspješno rastu u uvjetima kada je dovoljno anorganskog fosfora ali također mogu uspješno konkurirati kada je anorganski fosfor već snižen u okolišu, a koncentracije organskog fosfata još nisu jako narasle. Takvi uvjeti su opaženi *in situ* u razdoblju ranog proljeća i ranog ljeta kada raste dostupnost hranjivih soli što dovodi do generalnog rasta fitoplanktonske zajednice, a još nije došlo do raspada velikih cvjetanja. Koncentracije organskog fosfata rastu donosom rijeka kao i tijekom raspada velikih fitoplanktonskih cvjetanja. *L. aporus* je dostignuo nakraće generacijsko vrijeme (0.26 d) od svih istraženih vrsta u ovom doktorskom radu, što upućuje na mogućnost da ova vrsta može u povoljnim uvjetima rasti brže od drugih vrsta i postići visoki udio u fitoplanktonskoj zajednici. *L. hargravesii* je do sada jedna od dvije vrste vrsta koje su tijekom eksponencijalnog rasta povećavale staničnu aktivnost AP. To čini *L. hargravesii* jednom od vrsta koje mogu značajno iskorištavati organske izvore fosfata za vrijeme formiranja cvata odnosno eksponencijalnog rasta. Ovo upućuje na prilagodbu ove vrste na uvjete kada se veliki cvat bliži kraju ili čak nakon njega ili na uvjete kada postoji donos visokih koncentracija organskog fosfata iz rijeka. Vremenska i prostorna rasprostranjenost *Leptocylindrus* spp. odgovara rezultatima eksperimenata i podudara se sa ovom hipotezom.



*P. delicatissima* kao i *L. aporus* i *L. hargravesii* raste relativno brzo. Takozvana lag faza ova vrste također je kratka (tri dana) što upućuje na to da ova vrsta reagira jako brzo na dostupnost hranjivih soli. *P. delicatissima* eksprimira sAPAU isključivo pod uvjetima snižene koncentracije anorganskog fosfora. U uvjetima smanjene dostupnosti anorganskog fosfora ova vrsta pokazuje nisku sAPAU (u usporedbi s drugim vrstama).  $K_M$  vrijednost APAe je relativno niska što ukazuje na prilagodbu na relativno niske koncentracije organskog fosfata. Maksimum sAPA ova vrsta je pokazala tijekom faze eksponencijalnog rasta, što upućuje na to da koristi organski izvor fosfata i za formiranje cvata. Unos anorganskog fosfora je bio maksimalan i relativno visok tijekom eksponencijalne faze rasta. Ova vrsta, dakle, reagira brzo na dostupnost fosfora ubrzavanjem rasta i inicijalizacijom cvata tijekom kojeg može koristiti i organski i anorganski izvora fosfora za relativno brzi rast. Druga vrsta ovog roda, *P. calliantha*, raste relativno sporo ako se usporedi sa vrstama *L. aporus*, *L. hargravesii* i *P. delicatissima*, započinjanjem eksponencijalnog rasta tek nakon pet dana (relativno kasno). *P. calliantha* eksprimira sAPAU pod uvjetima snižene koncentracije anorganskog fosfora ali i pod uvjetima visokih koncentracija anorganskog fosfora, međutim tada ima smanjenu aktivnost. U uvjetima smanjene dostupnosti anorganskog fosfora ova vrsta pokazuje relativno visoku sAPAU (u usporedbi s drugim vrstama).  $K_M$  vrijednost alkalne fosfataze je relativno niska što ukazuje na prilagodbu na relativno niske koncentracije organskog fosfata. Maksimum APAe ova vrsta je pokazala tijekom faze eksponencijalnog rasta, što upućuje na to da koristi organski izvor fosfata i za formiranje cvata. Unos anorganskog fosfora bio je maksimalan i ostao relativno visok tijekom eksponencijalne faze rasta. Ova vrsta, dakle, reagira brzo na dostupnost hranjivih soli ubrzavanjem rasta i inicijalizacijom cvata tijekom kojeg može koristiti i organski i anorganski izvor fosfora za relativno brzi rast. Za vrste roda *Pseudo-nitzschia* su zabilježene velike brojnosti i visok doprinos u fitoplanktonskoj zajednici u svim godišnjim dobima, a najviše tijekom ljetnih mjeseci. Visoke brojnosti i doprinos fitoplanktonskoj zajednici opaženi su u cijelom sjevernom dijelu sjevernog Jadrana i u blizini luke Rijeka. To su regije gdje često dolazi do visoke dostupnosti hranjivih soli kada brzi rast vrste *Pseudo-nitzschia* spp. može rezultirati velikim brojnostima i doprinosima fitoplanktonskoj zajednici.

Vrste *C. decipiens* i *S. grevillei* kao i vrsta *P. calliantha* na smanjenu dostupnost anorganskog fosfora reagiraju pokretanjem eksponencijalnog rasta tek nakon pet dana (relativno kasno). Kod vrste *C. decipiens* sAPA se može detektirati samo u mediju s smanjenom koncentracijom anorganskog fosfora što upućuje na to da ova vrsta ne pokazuje konstantnu ekspresiju AP, dok se kod vrste *S. grevillei* sAPA može detektirati u oba medija

što upućuje na konstantnu ekspresiju AP, barem u malim količinama i neovisno o dostupnosti organskog fosfata. U uvjetima smanjene dostupnosti anorganskog fosfora *C. decipiens* pokazuje vrlo visoku (među najvećom izmjerenom u ovom radu) sAPAU (u usporedbu s drugim vrstama). Međutim maksimum sAPA ova vrsta je pokazala na početku stacionarne faze rasta što upućuje na to da *C. decipiens* koristi organski izvor fosfata pretežno za produženje cvata, a kako je  $K_M$  vrijednost APAe relativno visoka pretpostavljamo da je *C. decipiens* prilagođen na relativno visoke koncentracije organskog fosfata što *in situ* možemo očekivati nakon raspada fitoplanktonskog cvata ili u razdoblju kasne zime kada se unos hranjivih soli rijekama povećava. Za razliku od *C. decipiens*, *S. grevillei* u uvjetima smanjene dostupnosti anorganskog fosfora pokazuje umjerenu sAPAU (u usporedbi s drugim istraženim vrstama).  $K_M$  vrijednost APAe je relativno niska što ukazuje na prilagodbu na relativno male koncentracije organskog fosfata. Maksimum APAe ova vrsta je pokazala na početku faze eksponencijalnog rasta te je uspjela održati relativno visoku staničnu aktivnost ne samo na početku već i tijekom faze eksponencijalnog rasta što upućuje na to da *S. grevillei* koristi organski izvor fosfata i za inicijalizaciju cvata i za formiranje i prolongiranje cvata. I *C. decipiens* i *S. grevillei* su pokazale relativno dugu lag fazu u kulturama što upućuje na to da ova vrsta ne reagira brzo na dostupnost hranjivih soli, već joj je potrebna njihova dugotrajna dostupnost te da ubrzani rast započinje kasnije od ostalih vrsta. Brzina unosa anorganskog fosfata bila je maksimalna tek nakon pet (*C. decipiens*) odnosno sedam (*S. grevillei*) dana rasta u kulturi. Obje vrste su pokazale visoku mjerenu brzinu unosa fosfata, što upućuje na to da relativno uspješno mogu konkurirati za anorganski fosfor ako je dostupan. Visoke koncentracije fosfata *in situ* su očekivane u kasnim fazama degradacije cvata ili pod utjecajem donosa vodenih masa bogatih hranjivim solima. Takvi uvjeti su u sjevernom Jadranu opaženi u zimskom razdoblju kada je vodeni stupac izmješšan i kada su dugoročno dostupne relativno velike koncentracije fosfora i u razdoblju kasnog proljeća, nakon proljetnog cvjetanja fitoplanktona, kada raspad cvata oslobađa velike koncentracije organskog fosfata. Ni *C. decipiens* ni *S. grevillei* nikad ne dostižu veliki doprinos u fitoplanktonskoj zajednici i nikad dostižu ekstremno velike brojnosti što odgovara rezultatima iz eksperimenata.

Vrste *C. peruvianus*, *T. frauenfeldii* i *T. cf. nitzschiioides* na smanjenu dostupnost anorganskog fosfora reagiraju započinjanjem eksponencijalnog rasta tek nakon sedam dana (relativno kasno). Kod sve tri vrste sAPA se mogla detektirati u oba uvjeta (F/2 i P limit), što upućuje na konstantnu ekspresiju AP, barem u malim količinama i neovisno o dostupnosti organskog fosfata. U uvjetima smanjene dostupnosti anorganskog fosfora ove vrste pokazuju umjerenu sAPAU (u usporedbu s drugim istraženim vrstama). Maksimum sAPAe ove vrste su

pokazale početkom faze eksponencijalnog rasta što upućuje na to da koriste organski izvor fosfata pretežno za inicijalizaciju cvata.  $K_M$  vrijednost APAe kod vrste *T. frauenfeldii* je jako niska što ukazuje na prilagodbu na niske koncentracije organskog fosfata, kod vrste *T. cf. nitzschioides* je relativno visoka što ukazuje na prilagodbu na relativno visoke koncentracije organskog fosfata, dok je kod vrste *C. peruvianus* najviša od svih istraživanih vrsta, što ukazuje na prilagodbu na visoke koncentracije i dugotrajnu dostupnost organskog fosfata. Kod vrsta roda *Thalassionema*, nakon postizanja maksimalne vrijednosti, tijekom eksponencijalne faze rasta, sAPA je pala što upućuje na to da ove dvije vrste koriste organski izvor fosfata i za inicijalizaciju i za formiranje cvjetanja. Kod sve tri vrste unos anorganskog fosfata je bilo maksimalan tek nakon pet dana rasta kultura, prije početka eksponencijalne faze rasta kultura. Dugotrajne visoke koncentracije hranjivih soli uključujući organski i anorganski fosfor *in situ* su uobičajene u ranim zimskim mjesecima u sjevernom Jadranu kada vodeni stupac je izmiješan i kada su dugoročno dostupne relativno visoke koncentracije hranjivih soli te u kasno proljeće, nakon proljetnog cvjetanja, kada raspad istog oslobodi visoke koncentracije organskog fosfata. Rezultati upućuju na prilagodbu *C. peruvianus* na uvjete nakon velikih fitoplanktonskih cvjetanja ili na uvjete dugotrajne dostupnosti svih hranjivih soli. *C. peruvianus* nikad ne dostiže veliki doprinos u mikrofitolanktonskoj zajednici i nikad ne dostigne ekstremno velike brojnosti što odgovara rezultatima dobivenima eksperimentalnim analizama. Za razliku od *C. peruvianus*, dvije vrste roda *Thalassionema* upućuju također na prilagodbu ovih vrsta na dugotrajnu dostupnost hranjivih soli, s razlikom da obzirom na uspješnost enzima uspjevaju postići značajnije više vrijednosti u odnosu na *C. peruvianus*.

## 7. ZAKLJUČCI

Iz rezultata prikazanih u ovom doktorskom radu dolazimo do nekoliko bitnih zaključaka:

1. U *in vitro* uvjetima snižena koncentracija anorganskog fosfora kod osam od devet vrsta utjecala je na promjenu dinamike rasta, na način da je pet vrsta raslo brže, odnosno imale su kraće generacijsko vrijeme, što ukazuje na način prilagodbe da naglo povećaju brojnost kada se nađu u nepovoljnim uvjetima, dok su tri vrste rasle sporije, odnosno imale duže generacijsko vrijeme u odnosu na kulture koje su rasle u P bogatim uvjetima, što znači da imaju neki drugi način prilagodbe na nedostatak anorganskog fosfora.
2. Kod četiri vrste intenzitet fluorescencije klorofila bio manji te je kod dvije vrste viđeno da su plastidi općenito bili manji te ih je brojčano bilo manje što odgovara dosadašnjim istraživanjima koja navode nemogućnost sintetiziranja pigmenta u nedostatku anorganskog fosfora.
3. Sve prikazane vrste pokazale su da posjeduju mogućnost sinteze enzima alkalne fosfataze kako bi se u situacijama nedostatka anorganskog fosfora mogle natjecati za druge izvore fosfora. Michaelis-mentenova kinetika pokazala je da je kod nekih vrsta ovaj enzim ima visoki afinitet i djelotvoran je već pri niskim koncentracijama organskog fosfata, dok je kod drugih ovaj enzim prilagođen na više koncentracije organskog fosfata.
4. Sve prikazane vrste pokazale su mogućnost stvaranja zaliha fosfata prije početka eksponencijalnog rasta te svoju brojnost povećavaju koristeći te zalihe.
5. Kod tri vrste je u P limitiranim uvjetima došlo je do značajnih promjena u morfologiji stanica, zbog čega potencijalno može doći do krivih zaključaka prilikom taksonomske analize, ukoliko nemamo saznanja o tome kako se koja vrsta ponaša u kojim uvjetima. Te promjene su izašle iz okvira opisa vrste. Sve tri vrste su reagirale na način da su povećale površinu dijela stanice na kojem dolazi do sinteze enzima AP. Kod vrsta koje tvore lance došlo je do produživanja tih lanaca zbog stvaranja stabilnijih veza između stanica što pomaže vrstama da budu otpornije na konzumaciju od strane organizama na višoj razini.
6. Svaka od devet prikazanih dijatomeja je različitim prilagodbama na uvjete limitacije fosforom zauzela određenu ekološku nišu u fitoplanktonskoj zajednici sjevernog Jadrana. Tako je iz dugoročnih podataka bilo vidljivo da:

- a. tri vrste veću brojnost postižu u eutrofnijem području, što znači da preferiraju područja sa višom koncentracijom svih hranjivih soli ali bez obzira na to također mogu konkurirati za organski fosfat i preživjeti nepovoljne uvjete i na oligotrofnijem području.
  - b. tri vrste veću brojnost postižu na oligotrofnijem području, što znači da preferiraju područja sa sniženom koncentracijom hranjivih soli
  - c. tri vrste postižu podjednako velike brojnosti i na eutrofnom i na oligotrofnom području iz čega se može zaključiti da im odgovaraju oba područja te ovisno na kojem se dijelu nađu mogu ili ne moraju koristiti gore navedene prilagodbe na nedostatak anorganskog fosfora.
7. Svaka od vrsta se pojavljuje tijekom cijele godine s većim ili manjim doprinosom mikrofitoplanktonskoj zajednici i svaka od vrsta u određenim mjesecima više doprinosi mikrofitoplanktonskoj zajednici.
  8. Sjeverni Jadran, kao plitki, poluzatvoreni sustav kojeg karakteriziraju različiti uvjeti koncentracija fosfora, u različitim godišnjim dobima, koji ovise o riječnom utjecaju, sezonskoj hidrodinamici te njihovom iskorištavanju od strane fitoplanktonskih organizama, idealan je primjer modelnog ekosustava u kojem nalazimo različite ekološke uvjete na relativno malom geografskom području. To ga čini iznimno dobrim okolišem za tip istraživanja napravljenog u ovom doktorskom radu.
  9. Za kraj možemo zaključiti da je povezivanje *in vitro* rezultata sa dugoročnim promjenama ključno u razumijevanju dinamike i ekologije određene vrste te njene prilagodbe na klimatske promjene u sjevernom Jadranu. I od iznimne je važnosti provesti brojna dodatna istraživanja na dijatomejama ali i ostalim fitoplanktonskim organizmima, kako bi se prema trenutnim uvjetima u okolištu mogao predvidjeti eventualni negativni utjecaj na okoliš, druge organizme ili pak čovjeka ali i da bi bolje razumjeli kako nepovoljni uvjeti u okolišu utječu na organizme koji se u tom trenutku nađu u tom okolišu.

## 8. LITERATURA

1. Abida, H., Dolch, L.-J., Meï, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M. A., Finazzi, G., Bastien, O., Tirichine, L. and Bowler, C. (2015) Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant physiology*, 167, 118-136.
2. Alipanah, L., Winge, P., Rohloff, J., Najafi, J., Brembu, T. and Bones, A. M. (2018) Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PloS one*, 13, e0193335.
3. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25, 3389-3402.
4. Alverson, A. J. (2008) Molecular systematics and the diatom species. *Protist*, 159, 339.
5. Anonymous, X. (1975) Proposals for a standardization of diatom terminology and diagnoses. *Nova Hedwigia, Beiheft*, 53, 323-354.
6. Artegiani, A., Paschini, E., Russo, A., Bregant, D., Raicich, F. and Pinardi, N. (1997) The Adriatic Sea general circulation. Part II: baroclinic circulation structure. *Journal of physical oceanography*, 27, 1515-1532.
7. Barcelos e Ramos, J., Schulz, K. G., Voss, M., Narciso, Á., Müller, M. N., Reis, F. V., Cachão, M. and Azevedo, E. B. (2017) Nutrient-specific responses of a phytoplankton community: a case study of the North Atlantic Gyre, Azores. *Journal of Plankton Research*, 39, 744-761.
8. Benitez-Nelson, C. R. (2000) The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth-Science Reviews*, 51, 109-135.
9. Bérard-Therriault, L., Poulin, M. and Bossé, L. 1999. Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent. pp 387. Ottawa, Canada: CNRC.
10. Bernardi Aubry, F., Berton, A., Bastianini, M., Socal, G. and Acri, F. (2004) Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990-1999). *Continental Shelf Research*, 24, 97-115.
11. Beszteri, S., Yang, I., Jaeckisch, N., Tillmann, U., Frickenhaus, S., Glöckner, G., Cembella, A. and John, U. (2012) Transcriptomic response of the toxic

- prymnesiophyte *Prymnesium parvum* (N. Carter) to phosphorus and nitrogen starvation. *Harmful Algae*, 18, 1-15.
12. Bignami, F., Mattiotti, G., Rotundi, A. and Salusti, E. (1990a) On a Sugimoto-Whitehead effect in the Mediterranean Sea: sinking and mixing of a bottom current in the Bari Canyon, southern Adriatic Sea. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 37, 657-665.
  13. Bignami, F., Salusti, E. and Schiarini, S. (1990b) Observations on a bottom vein of dense water in the southern Adriatic and Ionian seas. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 95, 7249-7259.
  14. Bignami, F., Sciarra, R., Carniel, S. and Santoleri, R. (2007) Variability of Adriatic Sea coastal turbid waters from SeaWiFS imagery. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 112.
  15. Broecker, W. S. and Henderson, G. M. (1998) The sequence of events surrounding Termination II and their implications for the cause of glacial-interglacial CO<sub>2</sub> changes. *Paleoceanography*, 13, 352-364.
  16. Brussaard, C. P., Noordeloos, A. A. and Riegman, R. (1997) Autolysis kinetics of the marine diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae) under nitrogen and phosphorus limitation and starvation 1. *Journal of Phycology*, 33, 980-987.
  17. Brussaard, C. P. and Riegman, R. (1998) Influence of bacteria on phytoplankton cell mortality with phosphorus or nitrogen as the algal-growth-limiting nutrient. *Aquatic Microbial Ecology*, 14, 271-280.
  18. Cembella, A. D., Antia, N. J., Harrison, P. J. and Rhee, G.-Y. (1984) The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 2. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 11, 13-81.
  19. Chinain, M., Darius, H. T., Ung, A., Cruchet, P., Wang, Z., Ponton, D., Laurent, D. and Pauillac, S. (2010) Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon*, 56, 739-750.
  20. Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. and Sayers, E. W. (2016) GenBank. *Nucleic acids research*, 44, D67-D72.
  21. Coppola, E., Verdecchia, M., Giorgi, F., Colaiuda, V., Tomassetti, B. and Lombardi, A. (2014) Changing hydrological conditions in the Po basin under global warming. *Science of the total environment*, 493, 1183-1196.

22. Cozzi, S. and Giani, M. (2011) River water and nutrient discharges in the Northern Adriatic Sea: Current importance and long term changes. *Continental Shelf Research*, 31, 1881-1893.
23. Cushman-Roisin, B., Gacic, M., Poulain, P.-M. and Artegiani, A. 2013. *Physical oceanography of the Adriatic Sea: past, present and future*. Springer Science & Business Media.
24. Davis, C. O., Hollibaugh, J. T., Seibert, D. L., Thomas, W. H. and Harrison, P. J. (1980) Formation of resting spores by *Leptocylindrus danicus* (Bacillariophyceae) in a controlled experimental ecosystem 1. *Journal of Phycology*, 16, 296-302.
25. Degobbis, D. and Gilmartin, M. (1990) Nitrogen, phosphorus, and biogenic silicon budgets for the northern Adriatic Sea. *Oceanologica Acta*, 13, 31-45.
26. Degobbis, D., Precali, R., Ivancic, I., Smodlaka, N., Fuks, D. and Kveder, S. (2000) Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *International Journal of Environment and Pollution*, 13, 495-533.
27. Djakovac, T., Degobbis, D., Supić, N. and Precali, R. (2012) Marked reduction of eutrophication pressure in the northeastern Adriatic in the period 2000–2009. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 25-32.
28. Donald, K. M., Scanlan, D. J., Carr, N. G., Mann, N. H. and Joint, I. (1997) Comparative phosphorus nutrition of the marine cyanobacterium *Synechococcus* WH7803 and the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of plankton research*, 19, 1793-1813.
29. Drebes, G. (1966) On the life history of the marine plankton diatom *Stephanopyxis palmeriana*. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 13, 101.
30. Dyrman, S. T., Jenkins, B. D., Rynearson, T. A., Saito, M. A., Mercier, M. L., Alexander, H., Whitney, L. P., Drzewianowski, A., Bulygin, V. V. and Bertrand, E. M. (2012) The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response. *PLoS one*, 7, e33768.
31. Edler, L. and Elbrächter, M. (2010) The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*, 110, 13-20.
32. Egge, J. K. (1998) Are diatoms poor competitors at low phosphate concentrations? *Journal of Marine Systems*, 16, 191-198.



33. Evensen, D. and Hasle, G. (1975) Morphology of some *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) species as seen in the electron microscopes. *Nova hedwigia. Beihefte*.
34. Falkowski, P. G. (1997) Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO<sub>2</sub> in the ocean. *Nature*, 387, 272-275.
35. Fields, M. W., Hise, A., Lohman, E. J., Bell, T., Gardner, R. D., Corredor, L., Moll, K., Peyton, B. M., Characklis, G. W. and Gerlach, R. (2014) Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 4805-4816.
36. Finenko, Z. and Krupatkina-Akinina, D. (1974) Effect of inorganic phosphorus on the growth rate of diatoms. *Marine Biology*, 26, 193-201. Flynn, K., Öpik, H. and Syrett, P. (1986) Localization of the alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase activities of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbiology*, 132, 289-298.
37. Fonda Umani, S., Milani, L., Borme, D., De Olazabal, A., Parlato, S., Precali, R., Kraus, R., Lučić, D., Njire, J. and Totti, C. (2005) Inter-annual variations of planktonic food webs in the northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353, 218-231.
38. Franco, P. and Michelato, A. (1992) Northern Adriatic Sea: oceanography of the basin proper and of the western coastal zone. *Science of the total environment*, 35-62.
39. French III, F. W. and Hargraves, P. E. (1985) Spore formation in the life cycles of the diatoms *Chaetoceros diadema* and *Leptocylindrus danicus*. *Journal of Phycology*, 21, 477-483.
40. Fu, F.-X., Place, A. R., Garcia, N. S. and Hutchins, D. A. (2010) CO<sub>2</sub> and phosphate availability control the toxicity of the harmful bloom dinoflagellate *Karlodinium veneficum*. *Aquatic Microbial Ecology*, 59, 55-65.
41. Fu, F. X., Zhang, Y., Leblanc, K., Sañudo-Wilhelmy, S. A. and Hutchins, D. A. (2005) The biological and biogeochemical consequences of phosphate scavenging onto phytoplankton cell surfaces. *Limnology and oceanography*, 50, 1459-1472.
42. Garrison, D. (1981) Monterey Bay phytoplankton. II. Resting spore cycles in coastal diatom populations. *Journal of Plankton Research*, 3, 137-156.
43. Gašparović, B., Frka, S., Koch, B. P., Zhu, Z. Y., Bracher, A., Lechtenfeld, O. J., Neogi, S. B., Lara, R. J. and Kattner, G. (2014) Factors influencing particulate lipid production in the East Atlantic Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 89, 56-67.

44. Gašparović, B., Godrijan, J., Frka, S., Tomažić, I., Penezić, A., Marić, D., Djakovac, T., Ivančić, I., Paliaga, P. and Lyons, D. (2013) Adaptation of marine plankton to environmental stress by glycolipid accumulation. *Marine environmental research*, 92, 120-132.
45. Geider, R. J. and La Roche, J. (2002) Redfield revisited: variability of C [ratio] N [ratio] P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37, 1-17.
46. Giani, M., Djakovac, T., Degobbis, D., Cozzi, S., Solidoro, C. and Umani, S. F. (2012) Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 1-13.
47. Godrijan, J., Marić, D., Tomažić, I., Precali, R. and Pfannkuchen, M. (2013) Seasonal phytoplankton dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea. *Journal of Sea Research*, 77, 32-44.
48. Grilli, F., Accoroni, S., Acri, F., Bernardi Aubry, F., Bergami, C., Cabrini, M., Campanelli, A., Giani, M., Guicciardi, S. and Marini, M. (2020) Seasonal and Interannual Trends of Oceanographic Parameters over 40 Years in the Northern Adriatic Sea in Relation to Nutrient Loadings Using the EMODnet Chemistry Data Portal. *Water*, 12, 2280.
49. Guillard, R. R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals*, 29-60. Springer.
50. Hardison, D. R., Sunda, W. G., Shea, D. and Litaker, R. W. (2013) Increased toxicity of *Karenia brevis* during phosphate limited growth: ecological and evolutionary implications. *PLoS One*, 8, e58545.
51. Hargraves, P. (1983) Diatom resting spores: significance and strategies. *Survival strategies of the algae*, 49-68.
52. Hargraves, P. E. (1976) Studies on marine plankton diatoms. II. resting spore morphology. *Journal of Phycology*, 12, 118-128.
53. Harrison, P., Hu, M., Yang, Y. and Lu, X. (1990) Phosphate limitation in estuarine and coastal waters of China. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 140, 79-87.
54. Hasle, G. R. (1974) The mucilage pore of pennate diatoms. *Nova Hedwigia*, 45, 167-186. Hasle, G. R. and Syversten, E. E. 1995. Marine diatoms. Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. In *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*, ed. T. C. R. (ed), 5-387. London: Academic Press.

55. Herth, W. (1979) The site of  $\beta$ -chitin fibril formation in centric diatoms. II. The chitin-forming cytoplasmic structures. *Journal of Ultrastructure Research*, 68, 16-27.
56. Herth, W. and Barthlott, W. (1979) The site of  $\beta$ -chitin fibril formation in centric diatoms. I. Pores and fibril formation. *Journal of ultrastructure research*, 68, 6-15.
57. Holtermann, K., Bates, S., Trainer, V., Odell, A. and Armbrust, E. (2010) Mass sexual reproduction in the toxigenic diatoms *Pseudo-nitzschia australis* and *P. pungens* (Bacillariophyceae) on the Washington Coast, USA. *Journal of Phycology*, 46, 41-52.
58. Hoppe, H.-G. (2003) Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia*, 493.
59. Hoppe, H. G. (1983) Significance of Exoenzymatic Activities in the Ecology of Brackish Water - Measurements by Means of Methylumbelliferyl-Substrates. *Marine Ecology Progress Series*, 11, 299-308.
60. Horner, R. A. 2002. A Taxonomic Guide To Some Common Marine Phytoplankton, 195. Bristol: Biopress Limited, England.
61. Hustedt, F. 1930. Die Kieselalgen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. In *Rabenhorst's Kryptogamenflora Deutschlands Oesterreichs und der Schweiz.*, ed. H. F. (ed), pp 920. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H.
62. Hustedt, F. 1962. Die Kieselalgen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz unter Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. In *Kryptogamen Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz VI*, ed. L. e. Rabenhorsts, pp 920 New York: Cramer, Weinheim
63. Ikari, J. (1926) On some *Chaetoceras* of Japan. I. *Shokubutsugaku Zasshi*, 40, 517-534.
64. Ivančić, I., Godrijan, J., Pfannkuchen, M., Marić, D., Gašparović, B., Djakovac, T. and Najdek, M. (2012) Survival mechanisms of phytoplankton in conditions of stratification-induced deprivation of orthophosphate: Northern Adriatic case study. *Limnology & Oceanography*, 57.
65. Ivančić, I., Kraus, R., Najdek, M. and Cozzi, S. (2021) Ecological importance of alkaline phosphatase activity in changing marine environmental conditions. *Water*, 13, 2750.
66. Ivančić, I., Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Djakovac, T., Marić Pfannkuchen, D., Korlević, M., Gašparović, B. and Najdek, M. (2016) Alkaline phosphatase activity related to phosphorus stress of microphytoplankton in different trophic conditions. *Progress in Oceanography*, 146, 175-186.

67. John, E. H. and Flynn, K. J. (2002) Modelling changes in paralytic shellfish toxin content of dinoflagellates in response to nitrogen and phosphorus supply. *Marine Ecology Progress Series*, 225, 147-160.
68. Justic, D., Rabalais, N. N., Turner, R. E. and Dortch, Q. (1995) Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: stoichiometric nutrient balance and its consequences. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 40, 339-356.
69. Karl, D. M. (2000) Aquatic ecology: Phosphorus, the staff of life. *Nature*, 406, 31.
70. Kears, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. and Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647-9.
71. Keller, M. D., Bellows, W. K. and Guillard, R. R. (1988) Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 117, 279-283.
72. Ketchum, B. H. (1939) The development and restoration of deficiencies in the phosphorus and nitrogen composition of unicellular plants. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 13, 373-381.
73. Koch, P. and Rivera, P. (1984) Contribución al conocimiento de las diatomeas chilenas. III. El género *Chaetoceros* EHR (subgénero *Phaeoceros* Gran). *Gayana-botánica (Chile)*. (41, 61-84.
74. Kooistra, W. H., De Stefano, M., Mann, D. G. and Medlin, K. (2003) The phylogeny of the diatoms. *Silicon Biomineralization*, 59-97.
75. Kooistra, W. H. C. F., Gersonde, R., Medlin, L. K. and Mann, D. G. 2007. The origin and evolution of the diatoms: their adaptation to a planktonic existence. In *Evolution of primary producers in the sea*, 207-249. Elsevier.
76. Krajcar, V. (2003) Climatology of geostrophic currents in the Northern Adriatic. *Geofizika*, 20, 105-114.
77. Kulakovskaya, T. (2014) Phosphorus storage in Microorganisms: diversity and evolutionary insight. *Biochem. Physiol*, 4, 1-4.
78. Latasa, M. and Berdalet, E. (1994) Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. *Journal of Plankton Research*, 16, 83-94.

79. Lenton, T. M. and Watson, A. J. (2000) Redfield revisited: 1. Regulation of nitrate, phosphate, and oxygen in the ocean. *Global biogeochemical cycles*, 14, 225-248.
80. Lim, P.-T., Leaw, C.-P., Kobiyama, A. and Ogata, T. (2010) Growth and toxin production of tropical *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) under various nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Applied Phycology*, 22, 203-210.
81. Litchman, E. and Klausmeier, C. A. (2008) Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 39, 615-639.
82. Liu, S., Guo, Z., Li, T., Huang, H. and Lin, S. (2011) Photosynthetic efficiency, cell volume, and elemental stoichiometric ratios in *Thalassiosira weissflogii* under phosphorus limitation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29, 1048.
83. Lomas, M. W., Swain, A., Shelton, R. and Ammerman, J. W. (2004) Taxonomic variability of phosphorus stress in Sargasso Sea phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 49, 2303-2310.
84. Lombardi, A. and Wangersky, P. (1991) Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 77, 39-47.
85. Lundholm, N., Moestrup, Ø., Hasle, G. R. and Hoef-Emden, K. (2003) A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*? *Journal of Phycology*, 39, 797-813.
86. MacGillivray, M. L. and Kaczmarska, I. (2011) Survey of the efficacy of a short fragment of the rbc L gene as a supplemental DNA barcode for diatoms. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58, 529-536.
87. Mackereth, F. (1953) Phosphorus utilization by *Asterionella formosa* Hass. *Journal of Experimental Botany*, 4, 296-313.
88. Mackey, K. R. M., Labiosa, R. G., Calhoun, M., Street, J. H., Post, A. F. and Paytan, A. (2007) Phosphorus availability, phytoplankton community dynamics, and taxon-specific phosphorus status in the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Limnology and Oceanography*, 52, 873-885.
89. Mann, D. G. and Droop, S. 1996. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. In *Biogeography of freshwater algae*, 19-32. Springer.
90. Marchetti, R., Pacchetti, G. and Provini, A. (1985) Tendenze evolutive della qualità delle acque del Po. *Nova Thalassia*, 7, 311-340.

91. Marić, D., Kraus, R., Godrijan, J., Supić, N., Djakovac, T. and Precali, R. (2012) Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 115, 98-112.
92. Marić Pfannkuchen, D., Godrijan, J., Smodlaka Tanković, M., Baričević, A., Kužat, N., Djakovac, T., Pustijanac, E., Jahn, R. and Pfannkuchen, M. (2018) The ecology of one cosmopolitan, one newly introduced and one occasionally advected species from the genus *Skeletonema* in a highly structured ecosystem, the northern Adriatic. *Microbial ecology*, 75, 674-687.
93. Martin, P., Van Mooy, B. A., Heithoff, A. and Dyhrman, S. T. (2011) Phosphorus supply drives rapid turnover of membrane phospholipids in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *The ISME journal*, 5, 1057.
94. Medlin, L., Crawford, R. and Andersen, R. (1986) Histochemical and ultrastructural evidence for the function of the labiate process in the movement of centric diatoms. *British Phycological Journal*, 21, 297-301.
95. Michaelis, L. and Menten, M. L. (1913) Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. z.*, 49, 352.
96. Milan, C., Trentini, P., Ascanelli, M., Bignami, S., Barbieri, C., Libono, L. and Malfato, M. (2003) Valutazione dei carichi dei nutrienti del Po a Pontelagoscuro. *Rapporto finale (Adriatico) Processi di formazione delle mucillagini nell'Adriatico e in Tirreno (MAT). Roma7 Istituto Centrale per la Ricerca Scientifica e Tecnologica Applicata al Mare*, 727-49.
97. Miyata, K., Hattori, A. and Ohtsuki, A. (1986) Variation of cellular phosphorus composition of *Skeletonema costatum* and *Heterosigma akashiwo* grown in chemostats. *Marine Biology*, 93, 291-297.
98. Montresor, M., Vitale, L., D'Alelio, D. and Ferrante, M. I. (2016) Sex in marine planktonic diatoms: insights and challenges. *Perspect. Phycol*, 3, 61-75.
99. Moore, C., Mills, M., Arrigo, K., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P., Galbraith, E., Geider, R., Guieu, C. and Jaccard, S. (2013) Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature geoscience*, 6, 701-710.
100. Moore, E. R., Bullington, B. S., Weisberg, A. J., Jiang, Y., Chang, J. and Halsey, K. H. (2017) Morphological and transcriptomic evidence for ammonium induction of sexual reproduction in *Thalassiosira pseudonana* and other centric diatoms. *PLoS One*, 12, e0181098.

101. Mouget, J.-L., Gastineau, R., Davidovich, O., Gaudin, P. and Davidovich, N. A. (2009) Light is a key factor in triggering sexual reproduction in the pennate diatom *Haslea ostrearia*. *FEMS Microbiology Ecology*, 69, 194-201.
102. Mozetič, P., Francé, J., Kogovšek, T., Talaber, I. and Malej, A. (2012) Plankton trends and community changes in a coastal sea (northern Adriatic): Bottom-up vs. top-down control in relation to environmental drivers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 138-148.
103. Mozetič, P., Solidoro, C., Cossarini, G., Socal, G., Precali, R., Francé, J., Bianchi, F., De Vittor, C., Smodlaka, N. and Umani, S. F. (2010) Recent trends towards oligotrophication of the northern Adriatic: evidence from chlorophyll a time series. *Estuaries and coasts*, 33, 362-375.
104. Nanjappa, D., Kooistra, W. H. and Zingone, A. (2013) A reappraisal of the genus *Leptocylindrus* (Bacillariophyta), with the addition of three species and the erection of *Tenuicylindrus* gen. nov. *Journal of phycology*, 49, 917-936.
105. Nicholson, D., Dyhrman, S., Chavez, F. and Paytan, A. (2006) Alkaline phosphatase activity in the phytoplankton communities of Monterey Bay and San Francisco Bay. *Limnology and Oceanography*, 51, 874-883.
106. Oku, O. and Kamatani, A. (1995) Resting spore formation and phosphorus composition of the marine diatom *Chaetoceros pseudocurvisetus* under various nutrient conditions. *Marine Biology*, 123, 393-399.
107. Orlić, M., Gačić, M. and Laviolette, P. E. (1992) The currents and circulation of the Adriatic Sea. *Oceanologica Acta*, 15, 109-124.
108. Oró, J., Miller, S. L. and Lazcano, A. (1990) The origin and early evolution of life on Earth. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 18, 317-356.
109. Pan, Y. (1994) Production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries* Hasle under phosphate and silicate limitation.
110. Pan, Y., Subba Rao, D. V. and Mann, K. H. (1996) Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* under phosphate limitation. *Journal of Phycology*, 32, 371-381.
111. Paytan, A. and McLaughlin, K. (2007) The oceanic phosphorus cycle. *Chemical reviews*, 107, 563-576.
112. Pedro-Monzonis, M., del Longo, M., Solera, A., Pecora, S. and Andreu, J. (2016) Water accounting in the Po River Basin applied to climate change scenarios. *Procedia engineering*, 162, 246-253.

113. Pickett-Heaps, J., Carpenete, J. and Koutoulis, A. 1994. Valve and seta (spine) morphogenesis in the centric diatom *Chaetoceros peruvianus* Brightwell. In *The Protistan Cell Surface*, 269-282. Springer.
114. Pickett-Heaps, J. D., Hill, D. R. and Wetherbee, R. (1986) Cellular movement in the centric diatom *Odontella sinensis*. *Journal of phycology*, 22, 334-339.
115. Pitcher, G. (1990) Phytoplankton seed populations of the Cape Peninsula upwelling plume, with particular reference to resting spores of *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) and their role in seeding upwelling waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 31, 283-301.
116. Powley, H. R., Krom, M. D. and Van Cappellen, P. (2017) Understanding the unique biogeochemistry of the Mediterranean Sea: Insights from a coupled phosphorus and nitrogen model. *Global Biogeochemical Cycles*, 31, 1010-1031.
117. Price, N. M. and Morel, F. M. (1990) Role of extracellular enzymatic reactions in natural waters.
118. Ransom Hardison, D., Sunda, W. G., Wayne Litaker, R., Shea, D. and Tester, P. A. (2012) Nitrogen limitation increases brevetoxins in *Karenia brevis* (Dinophyceae): implications for bloom toxicity *Journal of phycology*, 48, 844-858.
119. Redfield, A. C., Ketchum, B. H. and Richards, F. A. 1963. The influence of organisms on the composition of seawater. In *The Sea*, ed. M. N. Hill, 27-77. New York: Interscience.
120. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. and Gerhard, D. (2015) Dose-response analysis using R. *PloS one*, 10, e0146021.
121. Röder, K., Hantzsche, F. M., Gebühr, C., Miene, C., Helbig, T., Krock, B., Hoppenrath, M., Luckas, B. and Gerdts, G. (2012) Effects of salinity, temperature and nutrients on growth, cellular characteristics and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, 15, 59-70.
122. Ross, R., Cox, E. J., Karayeva, N., Mann, D., Paddock, T., Simonsen, R. and Sims, P. (1979) An amended terminology for the siliceous components of the diatom cell.
123. Round, F. E., Crawford, R. M. and Mann, D. G., 1990. 1990. The diatoms. Biology and morphology of the genera. . pp 747. Cambridge: Cambridge University Press.
124. Sañudo-Wilhelmy, S. A., Tovar-Sanchez, A., Fu, F.-X., Capone, D. G., Carpenter, E. J. and Hutchins, D. A. (2004) The impact of surface-adsorbed phosphorus on phytoplankton Redfield stoichiometry. *Nature*, 432, 897-901.



125. Sclafani, R. and Holzen, T. (2007) Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu. Rev. Genet.*, 41, 237-280.
126. Siron, R., Giusti, G. and Berland, B. (1989) Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Marine Ecology Progress Series*, 95-100.
127. Smodlaka, N. (1986) Primary production of the organic matter as an indicator of the eutrophication in the northern Adriatic sea. *Science of The Total Environment*, 56, 211-220.
128. Smodlaka Tanković, M., Baričević, A., Ivančić, I., Kužat, N., Medić, N., Pustijanac, E., Novak, T., Gašparović, B., Pfannkuchen, D. M. and Pfannkuchen, M. (2018a) Insights into the life strategy of the common marine diatom *Chaetoceros peruvianus* Brightwell. *PloS one*, 13.
129. Smodlaka Tanković, M., Baričević, A., Stinga Perusco, V., Melzer, R. R., Lopez, A. I., Dömel, J. S., Heß, M., Kužat, N., Marić Pfannkuchen, D. and Pfannkuchen, M. (2018b) Experimental evidence for shaping and bloom inducing effects of decapod larvae of *Xantho poressa* (Olivi, 1792) on marine phytoplankton. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98, 1881-1887.
130. Socal, G., Acri, F., Bastianini, M., Aubry, F. B., Bianchi, F., Cassin, D., Coppola, J., De Lazzari, A., Bandelj, V., Cossarini, G. and Solidoro, C. (2008) Hydrological and biogeochemical features of the Northern Adriatic Sea in the period 2003-2006. *Marine Ecology-an Evolutionary Perspective*, 29, 449-468.
131. Socal, G., Pugnetti, A., Alberighi, L. and Acri, F. (2002) Observations on phytoplankton productivity in relation to hydrography in the Northern Adriatic. *Chemistry and Ecology*, 18, 61-73.
132. Solidoro, C., Bastianini, M., Bandelj, V., Codermatz, R., Cossarini, G., Canu, D. M., Ravagnan, E., Salon, S. and Trevisani, S. (2009) Current state, scales of variability, and trends of biogeochemical properties in the northern Adriatic Sea. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 114.
133. Sprouffske, K. and Wagner, A. (2016) Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC bioinformatics*, 17, 1-4.
134. Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Resrach Board of Canada.

135. Sunda, W. and Ransom Hardison, D. (2010) Evolutionary tradeoffs among nutrient acquisition, cell size, and grazing defense in marine phytoplankton promote ecosystem stability. *Marine Ecology Progress Series*, 401, 63-76.
136. Sunda, W. G., Hardison, R., Kiene, R. P., Bucciarelli, E. and Harada, H. (2007) The effect of nitrogen limitation on cellular DMSP and DMS release in marine phytoplankton: climate feedback implications. *Aquatic Sciences*, 69, 341-351.
137. Sunda, W. G. and Huntsman, S. A. (1995) Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Marine chemistry*, 50, 189-206.
138. Sundareshwar, P., Morris, J., Koepfler, E. and Fornwalt, B. (2003) Phosphorus limitation of coastal ecosystem processes. *Science*, 299, 563-565.
139. Supić, N., Orlić, M. and Degobbi, D. (2000) Istrian Coastal Countercurrent and its year-to-year variability. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51, 385-397.
140. Takabayashi, M., Wilkerson, F. P. and Robertson, D. (2005) Response of glutamine synthetase gene transcription and enzyme activity to external nitrogen sources in the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) *Journal of Phycology*, 41, 84-94.
141. Tartari, G., Milan, C. and Elli, M. 1991. Idrochimica dei nutrienti. In *the proceedings of the national conference: "La qualità delle acque del fiume Po negli anni, 6.1-6.29.*
142. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
143. Throndsen, J. 1993. The planktonic marine flagellates. In *Marine Phytoplankton: A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids.*, ed. T. C. (ed), 7-147. London Academic Press.
144. Tomas, C. R. 1995. Identifying marine diatoms and dinoflagellates. . ed. e. C. R. Tomas., 598 pp. San Diego, CA: Academic Press.
145. Tomac, C. R. 1997. *Identifying marine phytoplankton.* San Diego: Academic Press.
146. Tyrrell, T. (1999) The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature*, 400, 525-531.
147. Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen des Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 9, 1–38.
148. Van Mooy, B. A., Fredricks, H. F., Pedler, B. E., Dyhrman, S. T., Karl, D. M., Koblížek, M., Lomas, M. W., Mincer, T. J., Moore, L. R. and Moutin, T. (2009) Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature*, 458, 69.

149. Varkitzi, I., Pagou, K., Graneli, E., Hatzianestis, I., Pyrgaki, C., Pavlidou, A., Montesanto, B. and Economou-Amilli, A. (2010) Unbalanced N: P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. *Harmful Algae*, 9, 304-311.
150. Vaultot, D., LeBot, N., Marie, D. and Fukai, E. (1996) Effect of phosphorus on the *Synechococcus* cell cycle in surface Mediterranean waters during summer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2527-2533.
151. Viličić, D. 2002. Fitoplankton Jadranskoga Mora: biologija i taksonomija. *Školska knjiga*.
152. Viličić, D., Djakovac, T., Burić, Z. and Bosak, S. (2009) Composition and annual cycle of phytoplankton assemblages in the northeastern Adriatic Sea. *Botanica Marina*, 52.
153. Viličić, D., Marasović, I. and Mioković, D. (2002) Checklist of phytoplankton in the eastern Adriatic Sea. *Acta Botanica Croatica*, 61, 57-91.
154. Villareal, T. A., Altabet, M. A. and Culver-Rymsza, K. (1993) Nitrogen transport by vertically migrating diatom mats in the North Pacific Ocean. *Nature*, 363, 709.
155. Wang, H., Chen, F., Mi, T., Liu, Q., Yu, Z. and Zhen, Y. (2020) Responses of marine diatom *Skeletonema marinoi* to nutrient deficiency: programmed cell death. *Applied and environmental microbiology*, 86, e02460-19.
156. Yamaguchi, H., Yamaguchi, M. and Adachi, M. (2006) Specific-detection of alkaline phosphatase activity in individual species of marine phytoplankton. *Plankton & Benthos Research*, 1, 2014-217.
157. Yang, Z. K., Zheng, J. W., Niu, Y. F., Yang, W. D., Liu, J. S. and Li, H. Y. (2014) Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress. *Environmental microbiology*, 16, 1793-1807.
158. Zavatarelli, M., Raicich, F., Bregant, D., Russo, A. and Artegiani, A. (1998) Climatological biogeochemical characteristics of the Adriatic Sea. *Journal of Marine Systems*, 18, 227-263.
159. Zhang, C., Lin, S., Huang, L., Lu, W., Li, M. and Liu, S. (2014) Suppression subtraction hybridization analysis revealed regulation of some cell cycle and toxin genes in *Alexandrium catenella* by phosphate limitation. *Harmful Algae*, 39, 26-39.
160. Zhou, L., Tan, Y., Huang, L. and Wang, W.-X. (2016) Enhanced utilization of organic phosphorus in a marine diatom *Thalassiosira weissflogii*: A possible mechanism for

- aluminum effect under P limitation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 478, 77-85.
161. Zimmermann, J., Jahn, R. and Gemeinholzer, B. (2011) Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11, 173-192.
162. Zingone, A., Percopo, I., Sims, P. A. and Sarno, D. (2005) Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). I. A re-examination of the type material of *Skeletonema costatum*, with the description of *S. grevillei* sp. nov. *Journal of Phycology*, 41, 140-150.
163. Zoccolotti, L. and Salusti, E. (1987) Observations of a vein of very dense marine water in the southern Adriatic Sea. *Continental Shelf Research*, 7, 535-551.
164. Zore-Armanda, M. (1963) Les masses d'eau de la mer Adriatique. *Acta adriatica*, 10, 5-88.

## 9. PRILOZI

**Prilog 1.** Prikaz udaljenosti (postotak identičnosti) *rbcL* sekvenci roda *Thalassionema* korištenih u filogenetskoj rekonstrukciji

	<b>Thalassionema nitzschoides_CIM965</b>	Thalassionema sp._MN809601.1	Thalassionema frauenfeldii_KF701601.1	Thalassionema nitzschoides_CIM939	Thalassionema frauenfeldii_JX401251.1	Thalassionema frauenfeldii_FJ002113.1	<b>Thalassionema sp._CIM856</b>	Thalassionema frauenfeldii_AY604698.1	Thalassionema sp._FJ002114.1	Thalassionema nitzschoides_KJ671820.1	Thalassionema sp._JX401252.1
Thalassionema nitzschoides_CIM965		99.80	97.59	98.19	97.38	97.38	97.38	97.18	93.56	93.56	91.15
<b>Thalassionema sp._MN809601.1</b>	<b>99.80</b>		97.79	98.39	97.59	97.59	97.59	97.38	93.36	93.36	90.95
Thalassionema frauenfeldii_KF701601.1	97.59	97.79		99.40	98.99	98.59	98.59	97.99	94.37	94.37	90.74
Thalassionema nitzschoides_CIM939	98.19	98.39	99.40		99.20	99.20	99.20	98.59	94.57	94.57	90.95
Thalassionema frauenfeldii_JX401251.1	97.38	97.59	98.99	99.20		99.20	99.20	98.59	94.97	94.97	91.55
<b>Thalassionema frauenfeldii_FJ002113.1</b>	97.38	97.59	98.59	99.20	99.20		<b>100.00</b>	99.40	94.16	94.16	91.15
Thalassionema sp._CIM856	97.38	97.59	98.59	99.20	99.20	100.00		99.40	94.16	94.16	91.15
Thalassionema frauenfeldii_AY604698.1	97.18	97.38	97.99	98.59	98.59	99.40	99.40		93.96	93.56	91.15
Thalassionema sp._FJ002114.1	93.56	93.36	94.37	94.57	94.97	94.16	94.16	93.96		97.79	92.96
Thalassionema nitzschoides_KJ671820.1	93.56	93.36	94.37	94.57	94.97	94.16	94.16	93.56	97.79		92.15
Thalassionema sp._JX401252.1	91.15	90.95	90.74	90.95	91.55	91.15	91.15	91.15	92.96	92.15	

**Prilog 2.** Prikaz dinamike rasta svih vrsta korištene pri izradi ovog doktorata

	Vrsta	Medij	Početak eksponencijalnog rasta			Dan kada je postignuta točka inflekcije (najkraće generacijsko vrijeme)			Početak stacionarne faze			Najkraće generacijsko vrijeme
			[dani]	[stanice/L]	stdev	[dani]	[stanice/L]	stdev	[dani]	[stanice/L]	stdev	[dani]
<b>Radijalne centrice</b>	<i>Leptocylindrus aporus</i>	F/2	7	1.07E+06	8.22E+05	10.01	6.23E+06	4.72E+06	12	1.38E+07	8.98E+06	0,26
		P - limit	3	1.48E+05	5.43E+04	9.72	1.65E+06	7.68E+05	Do kraja eksperimenta kultura nije ušla u stacionarnu fazu rasta			1,72
	<i>Leptocylindrus hargravesii</i>	F/2	3	8.63E+04	2.81E+04	6.16	1.69E+06	7.78E+04	10	2.34E+06	2.41E+05	0,66
		P - limit	3	1.08E+05	1.61E+04	9.77	8.09E+06	1.56E+06	14	1.34E+07	6.18E+05	1,53
<b>Multipolarne centrice</b>	<i>Chaetoceros decipiens</i>	F/2	5	5.6E+06	3.9E+05	7.05	1.7E+07	2.0E+06	9	2.9E+07	2.0E+06	0,88
		P - limit	5	4.8E+06	7.1E+05	7.18	1.7E+07	1.6E+06	9	3.4E+07	7.7E+06	0,68
	<i>Chaetoceros peruvianus</i>	F/2	7	1.54E+06	2.34E+05	10.9	7.31E+06	6.00E+05	18	1.97E+07	4.71E+06	0,81
		P - limit	7	2.79E+06	1.83E+05	9.15	1.02E+07	1.03E+06	18	1.33E+07	2.29E+06	0,85
	<i>Skeletonema grevillei</i>	F/2	10	9.97E+06	4.16E+05	14,9	7.89E+07	6.71E+06	Do kraja eksperimenta kultura nije ušla u stacionarnu fazu rasta			1,18
		P - limit	5	3.47E+06	1.07E+06	9,32	1.07E+06	7.74E+05	12	5.00E+06	1.08E+06	0,87
<b>Arafidne penatne dijatomeje</b>	<i>Thalassionema frauenfeldii</i>	F/2	7	9.9E+04	2.9E+04	12,8	3.3E+05	6.0E+04	Do kraja eksperimenta kulture nisu ušla u stacionarnu fazu rasta			2,06
		P - limit	7	6.3E+04	6.1E+03	10,2	1.9E+05	2.9E+04				1,2
	<i>Thalassionema cf. nitzschioides</i>	F/2	7	5.10E+05	2.91E+05	11,3	1.04E+07	1.75E+06	12	1.04E+07	1.75E+06	0,696
		P - limit	7	7.57E+05	1.48E+05	10,04	1.57E+06	9.18E+05	12	5.86E+06	1.55E+06	0,24
<b>Rafidne penatne dijatomeje</b>	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	F/2	3	3.97E+07	1.56E+07	3,43	3.97E+07	1.56E+07	7	2.74E+08	6.54E+07	0,27
		P - limit	3	2.70E+07	4.32E+06	4,11	7.99E+07	4.62E+06	10	1.37E+08	2.12E+07	0,66
	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	F/2	5	1.54E+07	2.42E+06	10,2	9.45E+06	0.00E+00	Do kraja eksperimenta kultura nije ušla u stacionarnu fazu rasta			1,28
		P - limit	5	1.01E+07	9.66E+05	8,22	2.07E+06	3.58E+05	10	6.92E+07	1.28E+07	1,18

**Prilog 3.** Prikaz mjerenih morfometrijskih parametara svih vrsta korištenih pri izradi ovog doktorata

	Vrsta	Medij	Dužina stanica			Širina stanica			Ukupna dužina seta			Širina seta			Duljina lanaca	
			[µm]	stdev	p	[µm]	stdev	p	[µm]	stdev	p	[µm]	stdev	p	Max	Min
			[µm]	stdev	p	[µm]	stdev	p	[µm]	stdev	p	[µm]	stdev	p	[stanice/ lancu]	[stanice/ lancu]
<b>Radijalne centrice</b>	<i>Leptocylindrus aporus</i>	F/2	53.05	18.53	3.13E-04	9.40	1.05	6.80E-02	U svojoj strukturi nema sete						3	1
		P - limit	69.86	18.92		9.80	0.66								4	2
	<i>Leptocylindrus hargravesii</i>	F/2	54.92	15.99	4.42E-14	8.25	0.65	1.10E-01	U svojoj strukturi nema sete						8	1
		P - limit	104.82	31.18		8.59	1.18								13	1
<b>Multipolarne centrice</b>	<i>Chaetoceros decipiens</i>	F/2	Nisu uočene morfološke razlike													
		P - limit														
	<i>Chaetoceros peruvianus</i>	F/2	16,47	4,10	3,89E-03	7,2	1,46	4.11E-01	4,18E+02	1.01E+02	4,73E-9	1,65	2.63E-01	1.27E-02	Ne stvara lance	
		P - limit	19,28	7,37		7,0	9,26		6,72E+02	1.63E+02		1,83	2.23E-01			
<i>Skeletonema grevillei</i>	F/2	Nisu uočene morfološke razlike														
	P - limit															
<b>Arafidne penatne dijatomeje</b>	<i>Thalassionema frauenfeldii</i>	F/2	Nisu uočene morfološke razlike													
		P - limit														
	<i>Thalassionema cf. nitzschoides</i>	F/2	Nisu uočene morfološke razlike													
		P - limit														
<b>Rafidne penatne dijatomeje</b>	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	F/2	Nisu uočene morfološke razlike													
		P - limit														
	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	F/2	Nisu uočene morfološke razlike													
		P - limit														

**Prilog 4.** Prikaz izmjerenih maksimalnih vrijednosti sktivnosti enzima alkalne fosfataze (AP) po danima, maksimalne brzine enzimski kataliziranih reakcija ( $V_{max}$ ) i Michaelis-Menten-ove konstante ( $K_M$ ) izračunate Michaelis-Menten-ovim modelom za sve vrste korištene pri izradi ovog doktorata

	Vrsta	Medij	APA		KINETIKA ENZIMA AP	
			Max		$V_{max}$	$K_M$
			[dani]	[fmol/h/stanica]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]
Radijalne centrice	<i>Leptocylindrus aporus</i>	F/2	3	3	2.75E-05	2,51
		P - limit	3	694		
	<i>Leptocylindrus hargravesii</i>	F/2	6	16	1.31E-04	13,9
		P - limit	14	904		
Multipolarne centrice	<i>Chaetoceros decipiens</i>	F/2	Nije uočena aktivnost		7.95E-05	11,14
		P - limit	14	899		
	<i>Chaetoceros peruvianus</i>	F/2	5	8	4.24E-06	64,59
		P - limit	5	65		
	<i>Skeletonema grevillei</i>	F/2	5	11	6.79E-06	2,6
		P - limit	14	37		
Arafidne penatne dijatomeje	<i>Thalassionema frauenfeldii</i>	F/2	3	84	3.13E-06	1,68
		P - limit	7	192		
	<i>Thalassionema cf. nitzschoides</i>	F/2	3	69	1.58E-05	11,6
		P - limit	10	138		
Rafidne penatne dijatomeje	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	F/2	Nije uočena aktivnost		1.1E-05	5,23
		P - limit	7	9		
	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	F/2	5	15	1.19E-05	2,35
		P - limit	5	160		



**Prilog 5.** Prikaz unosa otopljenog anorganskog fosfata za sve istražene vrste na dan kada su postignute maksimalne vrijednosti. Za izračun brzina unosa fosfora je korištena brojnost stanica na dan mjerenja kao minimalna brzina i brojnost stanica na prijašnjem mjerenju kao maksimalna brzina. Obzirom da ni broj stanica niti koncentracija supstrata ne ostaju konstantni između mjerenja stvarna brzina unosa mora biti između navedenih granicama.

	Vrsta	Brzina unosa otopljenog anorganskog fosfata		
		[dan]	[pmol/dan/stanica]	stdev
Radijalne centrice	<i>Leptocylindrus aporus</i>	3	3.32E+00	1,55E+00
			3.32E+00	1,55E+00
	<i>Leptocylindrus hargravesii</i>	5	1.12E+01	5.38E+00
			5.68E+01	3.28E+01
Multipolarne centrice	<i>Chaetoceros decipiens</i>	5	5.47E-01	2.71E-01
			1.21E+01	4.56E+00
	<i>Chaetoceros peruvianus</i>	5	3.47E+00	1.28E+00
			5.05E+00	1.92E+00
	<i>Skeletonema grevillei</i>	7	3.85E+00	2.06E+00
			1.26E+01	4.41E+00
Arafidne penatne dijatomeje	<i>Thalassionema frauenfeldii</i>	5	1.82E+01	4.47E+00
			3.19E+01	1.19E+01
	<i>Thalassionema cf. nitzschioides</i>	5	4.22E+00	9.62E+00
			6.96E+00	2.65E+01
Rafidne penatne dijatomeje	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	3	3.89E+00	1.42E-01
			3.89E+00	1.42E-01
	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	7	1.84E+00	8.42E-01
			2.18E+01	9.04E+00

## 10. ŽIVOTOPIS

Nataša Kužat rođena je 19.01.1988. u Zadru. Osnovnu i srednju školu završila je u Zadru, nakon čega svoje obrazovanje nastavlja na Sveučilištu u Splitu. Godine 2010. stiče zvanje „Sveučilišna prvostupnica Biologije i ekologije mora“, na Sveučilišnom odjelu za studije mora, a 2012. zvanje „Magistra Forenzike“ na Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti. Nakon završenog diplomskog studija, 2014. godine, zapošljava se na Institutu Ruđer Bošković (IRB), u Centru za istraživanje mora, kao suradnica na projektu „BALMAS“ (Sustav upravljanja balastnim vodama za zaštitu Jadrana) u Laboratoriju za procese u ekosustavu mora. Za vrijeme trajanja projekta sudjelovala je na tri radionice. Nakon završetka projekta je radila kao suradnica na monitoring projektu „Sustavno ispitivanje kakvoće prijelaznih i priobalnih voda u 2016. i 2017. godini“. U prosincu 2016. godine zapošljava se kao asistentica u Laboratoriju za evolucijsku ekologiju, na projektu „Životne strategije fitoplanktona u sjevernom Jadranu“, Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2014-09-6563) na kojem je bila zadužena za terenski rad, obradu uzoraka, uzgoj kultura fitoplanktona te sudjeluje u provođenju eksperimenata na uzgojenim kulturama i obradi podataka. Iste godine nastavlja svoje školovanje na Interdisciplinarnom doktorskom studiju iz Oceanologije, Geološki odjel, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. rer. nat. Martina Pfannkuchena. Za vrijeme dokorskog studija sudjelovala je na tri domaće i dvije međunarodne radionice na temu fitoplanktona i molekularnih metoda te je sudjelovala na ljetnoj školi u Trstu. Također je sudjelovala i na 10 međunarodnih i dva domaća znanstvena skupa. Sa usmenim priopćenjima kao prvi autor sudjelovala je na četiri međunarodna i jednom domaćem znanstvenom skupu te na Simpoziju doktorskih studija PMF-a. Sa posterom kao prvi autor je sudjelovala na jednom međunarodnom znanstvenom skupu. Sa usmenim priopćenjima i/ili posterima kao koautor sudjelovala je na osam međunarodnih i jednom domaćem znanstvenom skupu. Prvi je autor na jednoj, a koautor na šest znanstvenih publikacija objavljenih za vrijeme trajanja dokorskog studija. Članica je Hrvatskog botaničkog društva i Međunarodnog fikološkog društva (International Phycological Society).

## 11. ZNANSTVENA AKTIVNOST I PUBLIKACIJE

CROSBI PROFIL: Nataša Kužat (CROSBI profil: 33997, MBZ: 360390)

### RADOVI U ČASOPISIMA

**Kužat, Nataša**; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Marić Pfannkuchen, Daniela; Ivančić, Ingrid; Pfannkuchen, Martin. A study on *Ostreopsis* cf. *ovata* along the eastern Adriatic coast. // *Regional Studies in Marine Science*, 45 (2021), 101808, 7 doi:10.1016/j.rsma.2021.101808

Ciglencečki, Irena; Paliaga, Paolo; Budiša, Andrea; Čanković, Milan; Dautović, Jelena; Dutour-Sikirić, Mathieu; Kraus, Romina; **Kužat, Nataša**; Lučić, Davor; Marić Pfannkuchen, Daniela et al. Dissolved organic carbon accumulation during a bloom of invasive gelatinous zooplankton *Mnemiopsis leidyi* in the northern Adriatic Sea; case of the anomalous summer in 2017. // *Journal of marine systems*, 222 (2021), 1-19 doi:10.1016/j.jmarsys.2021.103599

Mozetič, Patricija; Cangini, Monica; Francé, Janja; Bastianini, Mauro; Bernardi Aubry, Fabrizio; Bužančić, Mia; Cabrini, Marina; Cerino, Federica; Čalić, Marijeta; D'Adamo, Raffaele; Drakulović, Dragana; Finotto, Stefania; Fornasaro, Daniela; Grilli, Federica; Kraus, Romina; **Kužat, Nataša**; Marić Pfannkuchen, Daniela; Ninčević Gladan, Živana; Pompei, Marinella; Rotter, Ana; Servadei, Irene; Skejić, Sanda. Phytoplankton diversity in Adriatic ports: Lessons from the port baseline survey for the management of harmful algal species. // *Marine pollution bulletin*, 147 (2019), 117-132 doi:10.1016/j.marpolbul.2017.12.029

Di Poi, Elena; Kraus, Romina; Cabrini, Marina; Finotto, Stefania; Flander-Putrlé, Vesna; Grego, Mateja; **Kužat, Nataša**; Ninčević Gladan, Živana; Pezolesi, Laura; Riccardi, Elena et al. Dinoflagellate resting cysts from surface sediments of the Adriatic Ports: distribution and potential spreading patterns. // *Marine pollution bulletin*, 147 (2019), 185-208 doi:10.1016/j.marpolbul.2019.01.014

Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Ivančić, Ingrid; **Kužat, Nataša**; Medić, Nikola; Pustijanac, Emina; Novak, Tihana; Gašparović, Blaženka; Marić Pfannkuchen,

Daniela; Pfannkuchen, Martin. Insights into the life strategy of the common marine diatom *Chaetoceros peruvianus* Brightwell. // *PLoS One*, 1 (2018), e0203634, 21 doi:10.1371/journal.pone.0203634

Marić Pfannkuchen, Daniela; Godrijan, Jelena; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; **Kužat, Nataša**; Djakovac, Tamara; Pustijanac, Emina; Jahn, Regine; Pfannkuchen, Martin. The ecology of one cosmopolitan, one newly introduced and one occasionally advected species from the genus *Skeletonema* in a highly structured ecosystem, the northern Adriatic. // *Microbial ecology*, 75 (2018), 3; 674-687 doi:10.1007/s00248-017-1069-9

Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Stinga Perusco, Victor; Melzer, Roland R. Lopez, alejandro izquierdo; domel, jana sophie, heß; martin; **Kužat Nataša**; Marić Pfannkuchen, Daniela; Pfannkuchen, Martin. Experimental evidence for shaping and bloom inducing effects of decapod larvae of *Xantho poressa* (Olivi, 1792) on marine phytoplankton. // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1 (2018), 1-7 doi:10.1017/S0025315418000449

## **RADOVI U ZBORNICIMA SKUPOVA**

Brajković, Alin; **Kužat, Nataša**; Bastianini, Mauro; Supić, Nastjenjka; Kraus, Romina. Dinoflagellate resting cysts from surface sediments of the North-Eastern Adriatic and their potential spreading patterns. // *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* / Briand, Frédéric (ur.). Cascais, Portugal, 2019. str. 161-161. (<https://www.bib.irb.hr/1041052>)

## **SAŽECI SA SKUPOVA**

**Kužat, Nataša**; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Ivančić, Ingrid; Pustijanac, Emina; Medić, Nikola; Marić Pfannkuchen, Daniela; Pfannkuchen, Martin. Morfo-fiziološke reakcije rodova *Chaetoceros* i *Leptocylindrus* na limitaciju hranjivim solima. // Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a / Primožič, Ines; Kumerički, Krešimir; Lukić, Aleksandar; Bucković, Damir; Drmač, Zlatko; Pikelj, Kristina (ur.). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2019. str. 20-21 (predavanje)

**Kužat, Nataša**; Baričević, Ana; Ivančić, Ingrid; Levak Zorinc, Maja; Marić Pfannkuchen, Daniela; Medić, Nikola; Smodlaka Tanković, Mirta; Pfannkuchen, Martin. Centric diatoms response to nutrient limitation in Northern Adriatic. // *Seventh European*

Phycological Congress, European Journal of Phycology / Bosak, Sunčica; Ljubešić, Zrinka (ur.). Zagreb: International Phycological Society, 2019. str. 97-97 doi:10.1080/09670262.2019.1626627 (predavanje)

**Kužat, Nataša;** Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Ivančić, Ingrid; Pustijanac, Emina; Kušpilić, Grozdan; Novak, Tihana; Gašparović, Blaženka; Medić, Nikola; Marić Pfannkuchen, Daniela; Pfannkuchen, Martin. Morpho-physiological reactions to phosphate limitation and resulting implications for diatom life strategies. // Abstracts of the 25th International Diatom Symposium / Kusber, W.-H.; Abarca, N.; Van, A. L.; Jahn, R. (ur.). Berlin, Njemačka: BGBM Press Botanic Garden and Botanical Museum Berlin Freie Universität Berlin, 2018. str. 95-95 doi:<https://doi.org/10.3372/ids2018> (predavanje)

**Kužat, Nataša;** Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Ivančić, Ingrid; Pustijanac, Emina; Kušpilić, Grozdan; Novak, Tihana; Gašparović, Blaženka; Medić, Nikola; Marić Pfannkuchen, Daniela; Pfannkuchen, Martin. Fiziološke i morfološke prilagodbe dva roda dijatomeja na limitaciju hranjivim solima. // Zbornik sažetaka 13. Hrvatskog biološkog kongresa / Kružić Petar, Caput Mihalić Katarina, Gottstein Sanja, Pavoković Dubravko, Kučinić Mladen (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo, 2018. str. 109-110 (predavanje)

**Kužat, Nataša;** Marić Pfannkuchen, Daniela; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Pustijanac, Emina; Gašparović, Blaženka; Novak, Tihana; Ivančić, Ingrid; Pfannkuchen, Martin. Physiological adaptation within the Chaetocerotaceae to the ecological challenges in the northern Adriatic. // Società Botanica Italiana Gruppo di Algologia Riunione Scientifica Annuale, Book of Abstracts / Cabrini, Marina; Cataletto, Bruno; Falace, Annalisa; Honsell, Giorgio; Petrera, Francesca; Spoto, Maurizio (ur.). Trst: Università degli Studi di Trieste, 2017. str. 28-28 (predavanje)

**Kužat, Nataša;** Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Ivančić, Ingrid; Pustijanac, Emina; Kušpilić, Grozdan; Novak, Tihana; Gašparović, Blaženka; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela. Interspecific variation in metabolic response to P limitation helps explaining sympatric congeneric species diversity (in the northern Adriatic). // Phycologia / Bak, M.; Dabek, P.; Witkovski, A. (ur.). Szczecin, Poland: International Phycological Society, 2017. str. 111-111 (predavanje)

**Kužat, Nataša;** Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Marić Pfannkuchen, Daniela; Pfannkuchen, Martin. *Ostreopsis ovata* Fukuyo 1981 along the eastern Adriatic coast. // Phycologia / Bak, M.; Dabek, P.; Witkovski, A. (ur.). Szczecin, Poland: International Phycological Society, 2017. str. 110-111 (poster)

Pfannkuchen, Martin; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; **Kužat, Nataša;** Marić Pfannkuchen, Daniela. CIM: A Northern Adriatic Marine Phytoplankton Cell Culture Collection At The Center For Marine Research In Rovinj, Croatia. // Seventh European Phycological Congress, European Journal of Phycology / Bosak, Sunčica; Ljubešić, Zrinka (ur.). Zagreb: International Phycological Society, 2019. str. 227-227 doi:10.1080/09670262.2019.1626628 (poster)

Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Stinga Perusco, Victor; **Kužat, Nataša;** Marić Pfannkuchen, Daniela; Pfannkuchen, Martin. "Plastic biome"—primary colonization of different plastic foils in the marine environment. // Abstract book of Seventh European Phycological Congress, European Journal of Phycology / Bosak, Sunčica; Ljubešić, Zrinka (ur.). Zagreb: International Phycological Society, 2019. str. 156-156 doi:10.1080/09670262.2019.1626628 (poster)

Pfannkuchen, Martin; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; **Kužat, Nataša;** Ivančić, Ingrid; Pustijanac, Emina; Gašparović, Blaženka; Novak, Tihana; Kuspilić, Grozdan; Marić Pfannkuchen, Daniela. Physiological diversification of diatoms in a highly structured marine phytoplankton ecosystem shows no phylogenetic constraint. // Abstract book of seventh European Phycological Congress, European Journal of Phycology / Bosak, Sunčica; Ljubešić, Zrinka (ur.). Zagreb: International Phycological Society, 2019. str. 151-151 doi:10.1080/09670262.2019.1626628 (poster)

(COST DNA aquanet) Baričević, Ana; Chardon, Cécile; Marić Pfannkuchen, Daniela; **Kužat, Nataša;** Vasselon, Valentin; Smodlaka Tanković, Mirta; Levak Zorinc, Maja; Rimet, Frédéric; Bouchez, Agnès; Pfannkuchen, Martin. Hidden diatom diversity of the Northern Adriatic through metabarcoding. // European Journal of Phycology, Volume 54, supl 1 / Bosak, Sunčica; Ljubešić, Zrinka (ur.). Zagreb: International Phycological Society, 2019. str. 96-97 doi:10.1080/09670262.2019.1626627 (predavanje)

Marić Pfannkuchen, Daniela; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; **Kužat, Nataša**; Gašparović, Blaženka; Pustijanac, Emina; Pfannkuchen, Martin. *Pseudo-nitzschia*: the physiology of success in a highly structured and dynamic phytoplankton ecosystem. // Seventh European Phycological Congress, European Journal of Phycology / Bosak, Sunčica; Ljubešić, Zrinka (ur.). Zagreb: International Phycological Society, 2019. str. 93-94 doi:10.1080/09670262.2019.1626627 (predavanje)

Baričević, Ana; Chardon, Cécile; Marić Pfannkuchen, Daniela; **Kužat, Nataša**; Vasselon, Valentin; Smodlaka Tanković, Mirta; Rimet, Frédéric; Bouchez, Agnès; Pfannkuchen, Martin. HAB species of the northern Adriatic (Mediterranean Sea) recorded using metabarcoding. // ICHA 2018 Abstract book / Hess, Philip (ur.). Nantes: The International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2018. str. 453-453 (poster)

(BGBM) Marić Pfannkuchen, Daniela; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; **Kužat, Nataša**; Pustijanac, Emina; Zimmermann, Jonas; Jahn, Regine; Pfannkuchen, Martin. The species composition and ecology of the genus *Leptocylindrus* Cleve in the Northern Adriatic Sea. // Abstracts of the 25th International Diatom Symposium / Kusber, W.-H.; Abarca, N.; Van, A. L.; Jahn, R.; (ur.). Berlin: BGBM Press Botanic Garden and Botanical Museum Berlin Freie Universität Berlin, 2018. str. 111-111 doi:10.3372/ids2018 (predavanje)

(COST) Baričević, Ana; Chardon, Cécile; Marić Pfannkuchen, Daniela; **Kužat, Nataša**; Vasselon, Valentin; Smodlaka Tanković, Mirta; Rimet, Frédéric; Bouchez, Agnès; Pfannkuchen, Martin. Two-way insight into diatom diversity of the Northern Adriatic. HighThroughput Sequencing in marine phytoplankton research. // Abstracts of the 25th International Diatom Symposium / Kusber, W.-H.; Abarca, N.; Van, A. L.; Jahn, R.; (ur.). Berlin, Njemačka: BGBM Press Botanic Garden and Botanical Museum Berlin Freie Universität Berlin, 2018. str. 14-14 doi:10.3372/ids2018 (poster)

Pfannkuchen, Martin; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; **Kužat, Nataša**; Ivančić, Ingrid; Pustijanac, Emina; Gašparović, Blaženka; Novak, Tihana; Kuspilić, Grozdan; Marić Pfannkuchen, Daniela. How diatoms win: Life strategies of diatoms in the Northern Adriatic. // Abstracts of the 25th International Diatom Symposium // Kusber, W.-H.; Abarca,

N.; Van, A. L.; Jahn, R. (ur.). Berlin, Njemačka: BGBM Press Botanic Garden and Botanical Museum Berlin Freie Universität Berlin, 2018. str. 137-137 (predavanje)

Pfannkuchen, Martin; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; **Kužat, Nataša**; Ivančić, Ingrid; Pustijanac, Emina; Gašparović, Blaženka; Novak, Tihana; Kušpilić, Grozdan; Marić Pfannkuchen, Daniela. Razumjeti kako nadmetanje za ograničavajuće hranjive soli oblikuje fitoplanktonsku zajednicu u moru. // Zbornik sažetaka 13. Hrvatskog biološkog kongresa / Kružić Petar, Caput Mihalić Katarina, Gottstein Sanja, Pavoković Dubravko, Kučinić Mladen (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo, 2018. str. 90-91 (predavanje)

Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Chardon, Cecile; Marić Pfannkuchen, Daniela; **Kužat, Nataša**; Paliaga, Paolo; Budiša, Andrea; Vasselon, Valentin; Rimet, Frederic; Bouchez, Agnes; Pfannkuchen, Martin. Uvid u bioraznolikost rebraša sjevernog Jadrana metodom metabarkodiranja // Zbornik sažetaka 13. Hrvatskog biološkog kongresa / Kružić Petar, Caput Mihalić Katarina, Gottstein Sanja, Pavoković Dubravko, Kučinić Mladen (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo, 2018. str. 239-240 (poster)

Pfannkuchen, Martin; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Ivančić, Ingrid; **Kužat, Nataša**; Gašparović, Blaženka; Novak, Tihana; Kušpilić, Grozdan; Marić Pfannkuchen, Daniela. How harmful algae compete for limited nutrient resources. Lessons from the northern Adriatic Sea.. // ICHA 2018 Abstract book / Hess, Philip (ur.). Nantes: The International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2018. str. 52-52 (predavanje)

Marić Pfannkuchen, Daniela; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; **Kužat, Nataša**; Pfannkuchen, Martin. Diversity of the potentially toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* in the northern Adriatic Sea. // ICHA 2018 Abstract book / Hess, Philip (ur.). Nantes: The International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2018. str. 335-335 (poster)

Marić Pfannkuchen, Daniela; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; **Kužat, Nataša**; Pfannkuchen, Martin. A 40 year dataset on the species composition and ecology of the genus *Dinophysis* in the open waters of the northern Adriatic. // ICHA 2018 Abstract book / Hess, Philip (ur.). Nantes: The International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2018. str. 361-361 (poster)



Marić Pfannkuchen, Daniela; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Ivančić, Ingrid; **Kužat, Nataša**; Pustijanac, Emina; Kušpilić, Grozdan; Novak, Tihana; Gašparović, Blaženka; Pfannkuchen, Martin. Exploring the structure of a planktonic ecosystem. // Phycologia / Bak, M.; Dabek, P.; Witkovski, A. (ur.). Szczecin, Poland: International Phycological Society, 2017. str. 126-126 (predavanje)

Pustijanac, Emina; Marić Pfannkuchen, Daniela; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Ivančić, Ingrid; **Kužat, Nataša**; Medić, Nikola; Kušpilić, Grozdan; Novak, Tihana; Gašparović, Blaženka et al. *Chaetoceros peruvianus* Brightwell, 1856: A generalistic/opportunistic approach to success in the northern Adriatic plankton. // Abstract book 52nd European marine biology symposium / Ramšak, Andreja; Francé, Janja; Orlando-Bonaca, Martina; ... Malej Alenka (ur.). Piran: National Institute of Biology, Marine Biology Station Piran, 2017. str. 83-83 (poster)

Marić Pfannkuchen, Daniela; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; **Kužat, Nataša**; Pustijanac, Emina; Jahn, Regine; Martin Pfannkuchen. *Skeletonema grevillei*, a regular and bloom forming diatom in the coastal waters of the adriatic sea. // Phycologia / Bak, M.; Dabek, P.; Witkovski, A. (ur.). Szczecin, Poland: International Phycological Society, 2017. str. 126-127 (poster)

Mozetič, Patricija; Cangini, Monica; Francé, Janja; Bastianini, Mauro; Bernardi Aubry, Fabrizio; Bužančić, Mia; Cabrini, Marina; Cerino, Federica; Čalić, Marijeta; D'Adamo, Raffaele; Drakulović, Dragana; Finotto, Stefania; Fornasaro, Daniela; Grilli, Federica; Kraus, Romina; **Kužat, Nataša**; Marić Pfannkuchen, Daniela; Ninčević Gladan, Živana; Pompei, Marinella; Rotter, Ana; Servadei, Irene; Skejčić, Sanda. Phytoplankton diversity in Adriatic ports. // Società Botanica Italiana Gruppo di Algologia, Riunione Scientifica Annuale, Book of Abstracts / Cabrini, Marina; Cataletto, Bruno; Falace, Annalisa; Honsell, Giorgio; Petrera, Francesca; Spoto, Maurizio (ur.). Trst, Italija: Istituto Nazionale di Oceanografia e di Geofisica Sperimentale - OGS; Università degli Studi di Udine; Università degli Studi di Trieste (Dipartimento di Scienze della Vita) e WWF Area Marina Protetta di Miramare; Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia e del Comune di Trieste, 2017. str. 34-34 (predavanje)

Baričević, Ana; **Kužat, Nataša**; Smolaka Tanković, Mirta; Marić Pfannkuchen, Daniela; Pfannkuchen Martin. *Ostreopsis ovata* Fukuyo 1981 along the eastern Adriatic coast. // Società Botanica Italiana Gruppo di Algologia Riunione Scientifica Annuale, Book of Abstracts / Cabrini, Marina; Cataletto, Bruno; Falace, Annalisa; Honsell, Giorgio; Petrera, Francesca; Spoto, Maurizio (ur.). Trst: Università degli Studi di Trieste, 2017. str. 10-10 (predavanje)

Smolaka Tanković, Mirta; Marić Pfannkuchen, Daniela; Godrijan, Jelena; Baričević, Ana; **Kužat, Nataša**; Djakovac, Tamara; Pustijanac, Emina; Jahn, Regine; Pfannkuchen, Martin. The Ecology of One Cosmopolitan, One Newly Introduced and One Occasionally Advected Species from the Genus *Skeletonema* in a Highly Structured Ecosystem, the Northern Adriatic. // Società Botanica Italiana, Gruppo di Algologia, Riunione Scientifica Annuale, Book of abstracts / Cabrini, Marina; Cataletto, Bruno; Falace, Annalisa; Honsell, Giorgio; Petrera, Francesca; Spoto, Maurizio (ur.). Trst: Università degli Studi di Trieste, 2017. str. 48-48 (predavanje)

(BGBM) Marić Pfannkuchen, Daniela; **Kužat, Nataša**; Godrijan, Jelena; Smolaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Pustijanac, Emina; Jahn, Regine; Ivančić, Ingrid; Pfannkuchen, Martin. The ecology of the genus *Leptocylindrus* in a highly structured ecosystem, the northern Adriatic. // Società Botanica Italiana, Gruppo di Algologia, Riunione Scientifica Annuale, Book of abstracts / Cabrini, Marina; Cataletto, Bruno; Falace, Annalisa; Honsell, Giorgio; Petrera, Francesca; Spoto, Maurizio (ur.). Trst: Università degli Studi di Trieste, 2017. str. 38-38 (predavanje)

Supić, Nastjenjka; Budiša, Andrea; Ciglencečki, Irena; Čanković, Milan; Dautović, Jelena; Djakovac, Tamara; Dunić, Natalija; Dutour- Sikirić, Mathieu; Ivančić, Ingrid; Kalac, Matea; Kraus, Romina; **Kužat, Nataša**; Lučić, Davor; Marić Pfannkuchen, Daniela; Mihanović, Hrvoje; Njire, Jakica; Paliaga, Paolo; Pasarić, Miroslava; Pasarić, Zoran; Simonović, Niki; Vilibić, Ivica. Hypothesis on impact of winter conditions on annual organic production in the northern Adriatic. // EGU General Assembly 2021 Online, 2021. str. 1-1 (poster)

Smolaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Načinović, Iva; **Kužat, Nataša**; Marić Pfannkuchen, Daniela; Pfannkuchen, Martin. Microplastic load in the northern Adriatic. //

International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea -  $\mu$ Med. Capri, Italija, 2019. str. 96-96 (predavanje)

Supić, Nastjenjka; Ciglonečki-Jušić, Irena; Dautović, Jelena; Djakovac, Tamara; Dutour- Sikirić, Mathieu; Ivančić, Ingrid; Janeković, Ivica; Kraus, Romina; **Kužat, Nataša**; Lučić, Davor et al. Preliminary analysis of the 2017 winter cruise data in the northern Adriatic within the frame of the EcoRENA project. // Themes 2017. Venecija, Italija, 2017. (predavanje)

## **MENTORSTVO**

Neposredni voditelj studenta: Stinga Perusco, Victor; Značajke početnog obraštaja na odabranim vrstama plastičnog materijala u moru., 2019., diplomski rad, Odjel za akvakulturu, Dubrovnik

## **PROJEKTI NA KOJIMA SAM SUDJELOVALA**

1. Referentni centar za more (Kordinator projekta u Centru za istraživanje mora: dr. rer. nat. Martin Pfannkuchen), 2019. - 2024.
2. HRZZ projekt: Molekularne životne strategije fitoplanktona u Jadranu Adri LIFE (UIP2020-02-6878, Voditelj projekta: dr. sc. Daniela Marić Pfannkuchen), 2021. - 2026.
3. Interreg Italija – Hrvatska: CASCADE Projekt (Voditelj projekta: dr. sc. Daniela Marić Pfannkuchen, voditeljica WP2 paketa), 2020. – 2022.
4. Interreg Italija – Hrvatska: ADRICLIM Projekt (Voditelj projekta: dr. sc. Ana Baričević), 2020. – 2022.
5. Interreg Italija – Hrvatska: MARLES Project (Voditelj projekta: dr. sc. Mirta Smodlaka Taknović), 2020. – 2022.
6. Horizon 2020 projekt: JERICO S3 (Voditelj projekta: dr. rer. nat. Martin Pfannkuchen), 2020. – 2024.
7. Hrvatske vode, Sustavno ispitivanje kakvoće prijelaznih i priobalnih voda u 2020 i 2021 godini na području sjevernog Jadrana (Voditelj projekta: dr. sc. Tamara Đakovac), 2020. – 2021.
8. HRZZ projekt: Ekološki odziv sjevernog Jadrana na klimatske promjene i antropogeni učinak EcoRENA (IP-2016-06-4764, Voditelj projekta: dr. sc. Nastjenjka Supić), 2017. - 2021.

9. Adris foundation project: Microplastic load and impact in coastal waters of the Northern Adriatic (Voditelj projekta: dr. sc. Mirta Smodlaka Tanković), 2016. - 2018.

## **RADIONICE I ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE**

1. IOC E-learning Course on Harmful Algal Blooms, 2020-2021
2. Summer School on Sustainable Blue Economy in the Euro-Mediterranean Region, Trst, Italija
3. Završna radionica projekta Climate of the Adriatic region in its global context (CARE), Zagreb, Hrvatska
4. COST WG2 radionica, Berlin, Njemačka
5. International Diatom Symposium (IDS) 2018 radionica: Diatom Shape Analyses, Berlin, Njemačka
6. Radionica projekta Životne strategije fitoplanktona u sjevernom Jadranu, Ruđer Bošković institut, Centar za istraživanje mora, Rovinj
7. Radionica: Molekularne metode u algologiji, Hrvatsko botaničko društvo, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska
8. ALFF: the ALgal microbiome, Friends and Foes, 11 th International Phycological Congress, Szczecin, Poljska
9. Zooplankton Counting Workshop, Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split, Hrvatska
10. Dinoflagellate cyst purification and identification radionica, National Research Council, Institute of Marine Sciences, Venecija, Italija
11. Theoretical and Practical Training on Ballast Water Sampling and Analysis for Compliance Monitoring and Enforcement of the BWM Convention and for Scientific Purposes, Institute for Water of the Republic of Slovenia, National Institute of Biology, Morska biološka postaja Piran, Slovenia