

Sukcesija primarnog biofilma na umjetnoj podlozi u moru

Mejdandžić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:217:620737>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Maja Mejdandžić

Sukcesija primarnog biofilma na
umjetnoj podlozi u moru

Diplomski rad

Zagreb, 2014. godina

Ovaj rad, izrađen na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Zrinke Ljubešić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

Zahvale

Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Zrinki Ljubešić na ukazanom povjerenju, prilici da ostvarim svoje želje pri izradi ovog diplomskog rada, svom dragocjenom vremenu, smijehu, potpori i pomoći te najboljim "brainstorm" idejama...

Također, od srca zahvaljujem dipl. ing. Jeleni Godrijan, dr.sc. Martinu Pfankuchennu i dipl. ing. Paolu Paliagi sa instituta "Ruđer Bošković" na bezuvjetnoj pomoći u terenskom radu, obradi podataka i inovativnim idejama...

Zahvaljujem svom suvoditelju, asistentu dr.sc. Tomislavu Ivankoviću na idejama i pomoći u realizaciji bakteriološkog dijela ovog diplomskog rada, kao i prof. dr. sc. Jasni Hrenović na datom vremenu i podršci...

Također, zahvaljujem djelatnicima Državnog Hidrometeorološkog Zavoda, Odsjeka za obradu podataka brodskih dnevnika i temperature mora u Splitu na hidrografskim podacima koje su mi ustupili za potrebe ovog rada...

Hvala dr.sc. Sunčici Bosak na idejama, potpori, pomoći i prijateljstvu te doc. dr. sc. Mariji Gligori Udovič i dr. sc. Koraljki Kralj Borojević na pomoći u laboratoriju za algologiju...

Hvala Udruzi studenata "BIUS" na najboljim terenima i provodima života, na prilici i učenju pravom znanstvenom radu...

Posebno se zahvaljujem mojim prijateljima i kolegama Nikoli, Sandri, Ani, Matei, Dorotei, Marini, Franki, Petri, Nikoli, Kristini, Dragani, Ivani na strpljenju u svakodnevnom paničarenju, toplim savjetima, tehničkoj potpori i neizmjereno zabavnim druženjima u kantini "Medulić"...

Veliko hvala mojim sestrama Martini i Petri, bratu Danijelu i roditeljima Ljiljanki i Peri koji su uvijek stajali uz mene, bodrili me na sve moguće načine i bili stup optimizma kada je najviše trebalo... Posebno, hvala mojoj sestri Petri na strpljenju i savjetima...

Na kraju, od srca zahvaljujem svojoj boljoj polovici na neizmjernom stpljenju, savjetima, pomoći, optimizmu, ljubavi i podršci... Hvala Antonio!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Sukcesija primarnog biofilma na umjetnoj podlozi u moru

Maja Mejdandžić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Svaka čvrsta podloga uronjena u more podložna je procesu stvaranja biofilma. Razvoj takvog biofilma također poznat kao naseljavanje živih organizama je složen i još uvijek nedovoljno istražen proces. Naseljavanje dijatomeja i bakterija istraživano je u periodu jednog mjeseca na umjetnim pleksiglas pločicama (polimer metil metakrilata) postavljenima u konstrukciju iznad morskog dna na dubinu od pet metara. Za bakteriološku analizu biofilm se odvojio pomoću ultrazvučne sonde, a uzorci su se nacijepili na selektivne agar ploče. Biofilm za algološku analizu sastrugao se sa četkicom i resuspendirao u poduzorke za epifluorescencijsku i elektronsku mikroskopiju kao i za analizu pigmenta HPLC metodom. Sve komponente biofilma su pokazale maksimalnu abundanciju nakon mjesec dana ekspozicije. U bakterijskoj zajednici dominirale su heterotrofne morske bakterije koje su dostigle $1,96 \pm 0,79 \times 10^4$ CFU cm^{-2} . Iako su fekalni koliformi i intestinalni enterokoki opaženi u stupcu vode, fekalni koliformi nisu detektirani u biofilmu, a intestinalni enterokoki su narasli nakon mjesec dana kontakta u zanemarivom broju kolonija 60 ± 10 CFU cm^{-2} . Fotoautotrofna komponenta biofilma dominirala je dijatomejama i dostigla $5,80 \times 10^5$ stanica cm^{-2} , što potvrđuje i analiza pigmenta s fukoksantinom kao dominantnim u koncentraciji do 110 ng cm^{-2} . Dominantna dijatomeja bila je *Cylindrotheca closterium*. Detaljnija taksonomska analiza elektronskim mikroskopom otkrila je 30 različitih svojiti dijatomeja. Istraživanje je potvrdilo da su pleksiglas ploče u morskom okolišu dobar supstrat za razvoj obraštaja u roku od 30 dana ekspozicije. Nadalje, redosljed naseljavanja je potvrdio bakterije i cijanobakterije kao prve, a dijatomeje kao druge kolonizatore, sve skupa čineći primarni biofilm u moru.

(68 stranica, 39 slika, 7 tablica, 93 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: bakterije, dijatomeje, biofilm, more, sukcesija

Voditelj: Dr. sc. Zrinka Ljubešić, doc.

Ocjenitelji: 1. Dr. sc. Zrinka Ljubešić, doc.

2. Dr. sc. Jasna Hrenović, red. prof.

3. Dr. sc. Petar Kružić, doc.

Rad je prihvaćen: 6. lipnja 2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Primary biofilm succession on artificial substrate in the sea

Maja Mejdandžić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Every surface that is immersed in seawater is rapidly covered by unavoidable biofilm. Such biofilm formation, also known as fouling, is a complex multistage process and not yet thoroughly investigated. In this study, succession of diatoms and bacteria was investigated during a one month exposition on artificial plexiglass (polymer of methyl methacrylate) substrate mounted above the seafloor at 5 m depth. For the biofilm analyzes the fouling was investigated using selective agar plates, epifluorescence, light and electronic microscopy, as well as for HPLC pigment analysis. During biofilm development, the abundance of all biofilm components increased and reached maximum values after one month exposition. In the bacterial community heterotrophic marine bacteria were dominant and reached $1,96 \pm 0,79 \times 10^4$ CFU cm⁻². Despite the fact that faecal coliforms and intestinal enterococci were detected in the water column, faecal coliforms were not detected in the biofilm and intestinal enterococci appeared after one month of exposition but in a negligible number of 60 ± 10 CFU cm⁻². The phototrophic component of the biofilm was dominated by diatoms and reached $5,80 \times 10^5$ cells cm⁻², which was supported by pigment analysis with fucoxanthin as dominant pigment in concentration up to 110 ng cm⁻². Diatom community was dominated by *Cylindrotheca closterium* and other penate benthic diatoms. A detailed taxonomic analysis by electronic microscopy revealed 30 different taxa of diatoms. The study confirmed that the plexiglass surface in a marine environment is susceptible to biofouling within 30 days of contact. Furthermore, sequence of the colonization process firstly involved bacteria and cyanobacteria, and secondly diatoms, they all together formed a primary biofilm in the sea.

(68 pages, 39 figures, 7 tables, 93 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: bacteria, diatoms, biofilm, sea, succession

Supervisor: Dr. sc. Zrinka Ljubešić, Asst. Prof.

Reviewers: 1. Dr. sc. Zrinka Ljubešić, Asst. Prof.

2. Dr. sc. Jasna Hrenović, Prof.

3. Dr. sc. Petar Kružić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 6th of June 2014.

SADRŽAJ

1.1.	Obraštaj u moru, ekonomska problematika	1
1.2.	Razvoj biofilma	3
1.3.	Opća podjela, građa i rast bakterijskih stanica	5
1.3.1.	Bakterije u biofilmu	7
1.4.	Bacillariophyceae – alge kremenjašice.....	8
1.4.1.	Dijatomeje u biofilmu	12
1.5.	Prethodna istraživanja.....	13
1.5.1.	Jadransko more	13
1.5.2.	Istraživanja u Jadranskom moru	14
1.6.	Cilj istraživanja.....	15
2.	Terenski dio istraživanja	16
2.1.	Područje istraživanja.....	16
2.2.	Hidrografski čimbenici	18
2.3.	Priprema eksperimenta	24
2.4.	Uzorkovanje.....	25
2.4.1.	Bakteriološka analiza	25
2.4.2.	Algoška analiza	26
2.4.3.	Fitoplankton	26
2.4.4.	Morska cvjetnica <i>Cymodocea nodosa</i>	27
2.5.	Obrada uzoraka	27
2.5.1.	Bakteriološka analiza	27

2.5.1.1.	Određivanje ukupnog broja bakterija	27
2.5.1.2.	Određivanje broja bakterija bojanjem sa DAPI	28
2.5.2.	Algološka analiza	29
2.5.3.	Fitoplankton	31
2.5.4.	Morska cvjetnica <i>Cymodocea nodosa</i>	31
2.6.	Mikroskopija	31
2.6.1.	Svjetlosna mikroskopija	31
2.6.2.	Elektronska mikroskopija	33
2.6.2.1.	Čišćenje uzoraka	33
2.7.	Tekuća kromatografija visokog učinka (HPLC).....	35
3.	Bakteriološka analiza	37
3.1.	Algološka analiza	38
3.1.1.	Taksonomska analiza obraštaja svjetlosnom mikroskopijom.....	38
3.1.2.	Taksonomska analiza obraštaja elektronskom mikroskopijom	40
3.2.	Fitoplankton.....	43
3.3.	Morska cvjetnica <i>Cymodocea nodosa</i>	45
3.4.	Kemotaksonomija	48
3.5.	Direktna analiza podloge	49
4.	Rasprava	55
5.	Zaključci.....	59
6.	Literatura	60
7.	Prilozi	68

1.1. Obraštaj u moru, ekonomska problematika

Morski okoliš je specifično stanište različitim vrstama organizama, od prokariotskih organizama poput bakterija do složenih morskih kralježnjaka. Život u moru ovisi o mnogo čimbenika (abiotskih i biotičkih) kao što su temperatura, salinitet, pH, hranjive soli, prozirnost, turbiditet i dostupnost različitih substrata za sesilne organizme. U moru je svaka čvrsta umjetna podloga podložna procesu naseljavanja (engl. fouling) živih organizama. Visoka viskoznost vode kao medija u kombinaciji s relativno niskom specifičnom težinom organizama u moru čini pričvršćivanje vrlo važnim u turbulentnim staništima.

Bentos je zajednica mikroorganizama i makroorganizama koja se razvija na granici krute i tekuće faze u vodenim sustavima, tj. morskom dnu (Margalef 1983, Wetzel 2001). Definicijom perifitona obuhvaćeni su biljni i životinjski organizmi pričvršćeni na različitim tipovima supstrata potopljenih u vodi, a koji pritom ne prodiru u podlogu. Biofilm i mikrofitobentos su dva sinonima koja se prema MacIntyre i sur. (1996) mogu također smatrati perifitonom. Definicija mikrofitobentosa je da su to sve jednostanične eukariotske alge te cijanobakterije koje rastu unutar nekoliko milimetara na osvjetljenom sedimentu (MacIntyre i sur. 1996). Uzimajući u obzir ove definicije, perifiton se smatra osnovom hranidbenog lanca te u nekim vodenim staništima najbrojnijim oblikom primarnih proizvođača (Wetzel 1964, Goldsborough i Robinson 1996). Perifiton se dijeli na: euperifiton (osnovni dio perifitona, čine ga pričvršćeni organizmi prilagođeni sesilnom načinu života – pomoću rizoida, želatinoznih cijevi, stapki, držaka i sl.), pseudoperifiton (pridruženi dio perifitona, zajednica organizama koji se slobodno kreću među pričvršćenim vrstama, oviseći o njima kao izvoru hrane ili zaštiti od predatora, planktonski organizmi uhvaćeni i zadržani u gustoj mreži pričvršćenih makrofita). S obzirom na supstrat kojeg naseljavaju, perifitonske zajednice mogu biti: epiholon (organizmi na različitim supstratima), epizoon (organizmi na životinjama), epidendron (organizmi na drveću), epiliton (organizmi na kamenju), epipelon (organizmi na mulju), epipsamon (organizmi na pijesku) i epifiton (organizmi na biljkama).

Naseljavanje organizama na podloge danas predstavlja svjetski problem, od pučinskih naftnih platformi, preko trgovačkih, putničkih, ratnih brodova, do ribarskih postrojenja i različite

ribarske opreme. Najveći problem obraštaja na brodovima predstavlja mogućnost korozije krme, a zbog toga brodovi povećavaju potrošnju goriva i do 30% (De Rincon i sur. 2001). Naravno, veća potrošnja goriva uzrokuje veću cijenu prijevoza. Posljedično tome, javlja se i povećano otpuštanje stakleničnih plinova što predstavlja veliki ekološki problem današnjice.

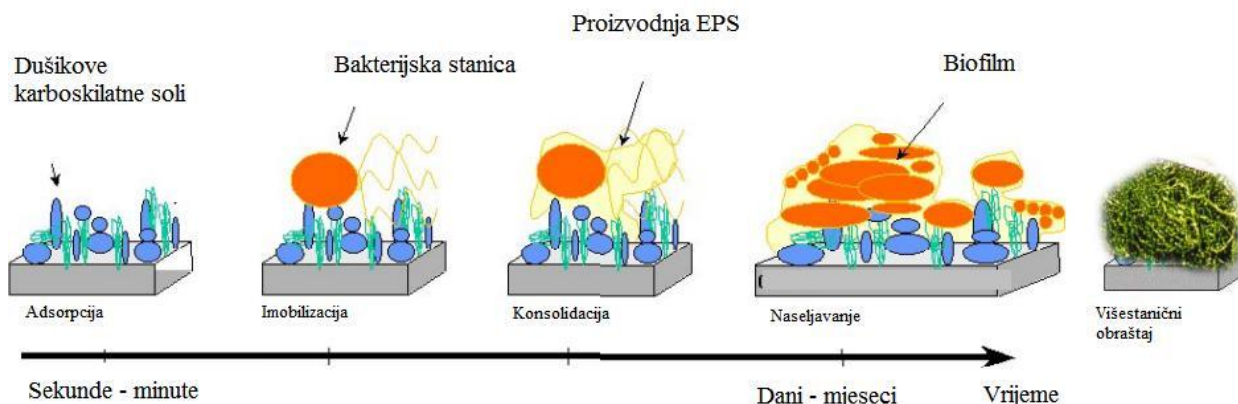
Ribarska oprema i marikultura također imaju velikih problema sa obraštajem. Zbog obraštaja na uzgojnim instalacijama za ribe, školjkaše i druge uzgojne organizme javljaju se ekološki problemi poput anoksije, eutrofikacije, povećanog turbiditeta, a takvi problemi mogu dovesti do pomora organizama i velikih ekonomskih gubitaka (Lewis i sur. 1997).

Kroz povijest su se koristile različite metode uklanjanja obraštaja sa brodova i drugih instalacija u morima: od jednostavnog periodičnog skidanja obraštaja i čišćenja krmi brodova, preko korištenja različitih premaza do odabira materijala koji su otporni na naseljavanje. Velike probleme u prošlosti stvarao je premaz tri-butil-kositar (TBT) koji je toksičan za obraštaj, ali nije selektivan toksin. Njegova toksičnost šteti i drugim morskim organizmima, a taloži se i u sedimentu iz kojega se može procesom remineralizacije ponovno naći u vodenom stupcu (Stein i sur. 2001). TBT je zbog svojih utjecaja danas zabranjen u većini zemalja svijeta.

Današnje metode prevencije naseljavanja mikro i makroorganizama je odabir pravog materijala, koji se u većini slučajeva pokazao titanij (Greenberg T., Itzhak D. 2002) koji je pokazao malu ili nikakvu toksičnost za morske organizme. Također, titanij se pokazao i otpornim na mikrobiološki utjecanu koroziju (engl. microbiologically influenced corrosion (MIC)).

1.2. Razvoj biofilma

Biofilm je kompleksna zajednica pričvršćenih stanica i njihovih metabolita koja se sastoji od organizama poput bakterija, praživotinja, algi i drugih beskralježnjaka. (O'Toole i sur., 2000, Stoodley i sur., 2002). Općenito prihvaćeno razvijanje biofilma može se objasniti u nekoliko faza: (1) Adsorpcija, (2) Imobilizacija, (3) Konsolidacija, (4) Naseljavanje (Slika 1).



Slika 1. Četiri faze pri razvijanju biofilma (preuzeto i prilagođeno iz: Lehaitre M., Compère, C. (2007): Biofouling and underwater measurements. In: Babin et al. (eds), op. cit., Backscatter, 10: 22-25.)

Četiri faze razvoja biofilma:

1. Adsorpcija – vezivanje otopljenih kemijskih spojeva, većinom makromolekula poput glikoproteina, proteoglikana i polisaharida, u prvim trenucima doticaja bilo koje podloge sa morskom vodom. Obično traje nekoliko minuta, a anorganske i organske tvari su slobodno prisutne i otopljene u vodi ili su produkt metabolita drugih mikroorganizama (Baier et al. 1972, Compère et al 2001).
2. Imobilizacija – reverzibilno vezivanje bakterijskih stanica slabim vezama i interakcijama na površinu substrata.
3. Konsolidacija – ireverzibilno vezivanje bakterijskih stanica na površinu substrata. U ovoj fazi bakterijske stanice počinju izlučivati EPS (engl. Extracellular polymeric substances) pomoću kojih se stvara trajna veza između stanice i površine. EPS se sastoji od

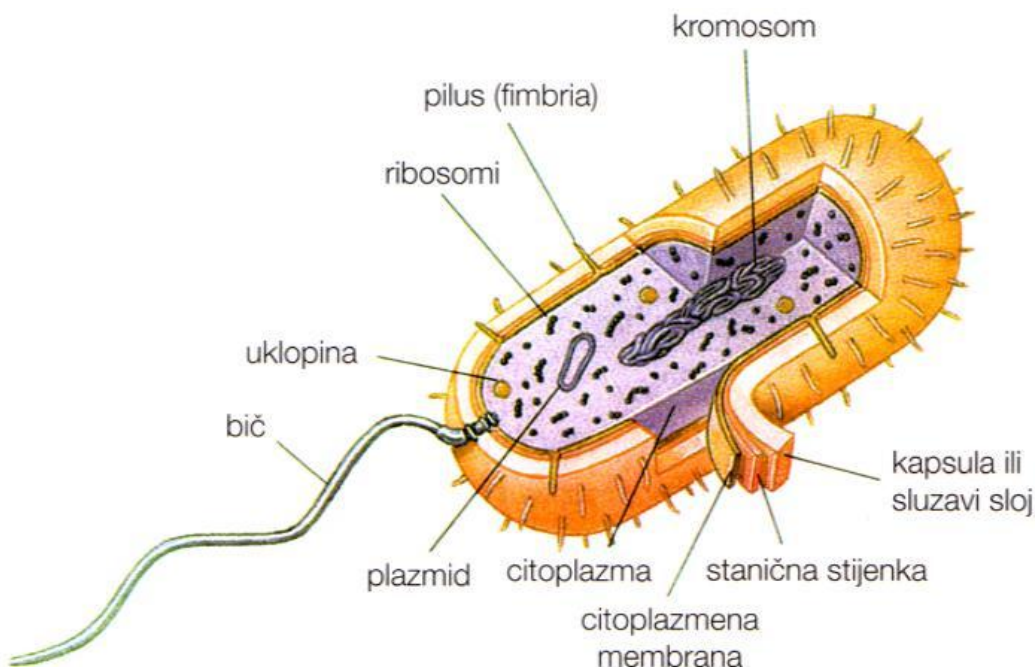
polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i lipida te uključuju različite funkcionalne grupe poput karboksilnih, amino i fosfatnih skupina. Upravo im raznolikost funkcionalnih grupa omogućuje bolje vezanje na površinu visoko energetske veze poput dipol-dipol, ion-dipol, vodikovim vezama te Debyeovim interakcijama.

4. Naseljavanje – završna faza u razvoju biofilma. Nakon svega nekoliko dana, drugi mikroorganizmi poput jednostaničnih algi naseljavaju bakterijske kolonije. Biofilm poprima trodimenzionalnu strukturu te tako dopušta naseljavanje i višestaničnih organizama poput ličinki beskralježnjaka, višestaničnih nitastih algi te ostalog makrozoobentosa.

Tijekom razvijanja biofilma neki dijelovi površine mogu ostati nenaseljeni, dok se na drugima razvija kako je opisano u četiri faze. Debljina biofilma varira od svega nekoliko mikrometara do par centimetara ovisno o sastavu medija. Također, debljina biofilma nije homogena na svim djelovima substrata. Posljedično tome, koncentracija otopljenog kisika varira kroz površinu i visinu biofilma. Neki dijelovi mogu biti aerobni, a drugi anaerobni, čak u tolikoj mjeri da ne zadovoljavaju metaboličke potrebe anaerobnih bakterija, pa se razvijaju sulfat-reducirajuće bakterije. Fotosintetske mikroalge proizvode kisik u površinskim dijelovima biofilma, a bakterije svojim metabolizmom mijenjaju pH. Na taj način uvjeti unutar biofilma (konc. otopljenog kisika, metalnih kationa i otopljenih iona te pH) mogu znatno varirati od okolnog medija.

1.3. Opća podjela, građa i rast bakterijskih stanica

Bakterije su jednostanični mikroorganizmi koji spadaju u nadcarstvo prokariota. Karakterizira ih nedostatak jezgrine membrane i membrana oko organela (Slika 2). Općenito, bakterije se dijele na dva razreda: Archaeobacteria i Eubacteria. Bile su jedini oblik života prije 2 mlrd. godina, a prvi ih je opazio Antony van Leeuwenhoek u 17. stoljeću. Bakteriologija kao znanstvena disciplina se počinje razvijati u 19. stoljeću prvenstveno zahvaljujući Louisu Pasteuru i Robertu Koch-u.



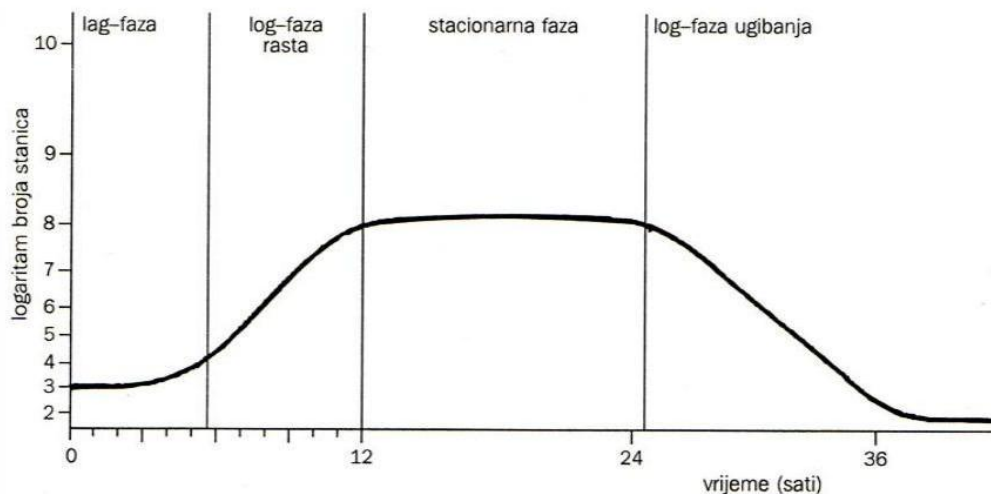
Struktura tipične prokariotske (bakterijske) stanice. Na ovoj slici stanica je uzdužno prerezana radi prikaza njene unutarnje strukture.

Slika 2. Građa bakterijske stanice. Preuzeto i prilagođeno sa: <http://www.svet-biologije.com/>

Bakterije su izvanredno prilagodljivi mikroorganizmi. Nalazimo ih u svakom živom organizmu te u svim dijelovima svijeta (od hidrotermalnih izvora na dnu oceana do vrhova planinskih masiva). Dijelev se na više načina, no najznačajnija podjela je prema morfologiji

njihove stanice: koki (okruglaste stanice), bacili (izdužene stanice), spirili (zavijene stanice), vibrioni (stanice poput zareza), koko-bacili (izduženi koko oblik) te spirohete (više zavijene stanice nego spirili). Veličina bakterijskih stanica varira od veličine mikoplazmi (0,3 do 0,8 μm) do veličine cijanobakterija (promjer 10 μm). Bakterijske stanice su ograničene veličinom jer razmjenjuju vodu, plinove i hranjive soli uglavnom difuzijom (nemaju kompleksne membranske transportne mehanizme kao eukariotske stanice). Što je stanica veća, ima veći volumen u odnosu na površinu. Kod određene granice površina stanice nije dovoljna da bi dopustila ulaz nutrijenata potreban za održavanje velikog volumena. Ekstremni primjer veličine bakterijske stanice je vrsta *Thiomargarita namibiensis* pronađena u oceanskom sedimentu dimenzije stanice 750 μm (0,75 mm) što je 600 puta veća stanica od tipične bakterije kao što je *Escherichia coli*.

Sljedeća važna podjela bakterija je po građi citoplazmatske membrane, pa tako razlikujemo Gram pozitivne i Gram negativne bakterije. Kod Gram pozitivnih bakterija stanična stjenka osim mureina sadrži teihonsku kiselinu (polimer glicerolfosfatne i ribitolfosfatne kiseline), a ona je vezana na debele slojeve peptidoglikana. Kod Gram negativnih bakterija peptidoglikan je u maloj količini, bez teihonske kiseline. Peptidoglikan u periplazmatskom prostoru vezan je za lipoproteine u vanjskoj membrani koja sadrži lipopolisaharide, lipoproteine i fosfolipide. Što se tiče pokretljivosti bakterijskih stanica, razlikujemo ih po smještaju i broju bičeva: monotrih (jedan bič na jednom kraju), lofotrih (dva ili više bičeva na jednom ili oba kraja stanice), amfitrih (po jedan bič na oba kraja stanice) i peritrih (bičevi okolo čitave stanice). Uz bičeve, bakterijska stanica sadrži i fimbrije (pile) koji su tanji od bičeva i u većem broju. Najznačajnija uloga pila je tijekom spajanja dviju stanica i razmjene DNA, pa ih stoga nazivamo i seks-pili (F-pili). Bakterije se razmnožavaju binarnom diobom kojoj prethodi mitoza DNA te kariokineza, a završava citokinezom tako da od jedne roditeljske stanice nastaju dvije stanice kćeri. Dinamika rasta bakterijske populacije se može podijeliti u više faza (Slika 3).



Prikaz sveopće bakterijske krivulje rasta. Vidi se ovisnost broja živih stanica o vremenu u pojedinim fazama rasta.

Slika 3. Prikaz dinamike rasta bakterijske populacije. Preuzeto i prilagođeno sa: <http://www.svetbiologije.com/>

1.3.1. Bakterije u biofilmu

Bakterije, kao prvi kolonizatori na različitim substratima u morskom okolišu, pružaju inicijalno mjesto za pričvršćivanje ostalih organizama kao što su npr. dijatomeje. Svojim izlučivanjem EPS tvari oblikuju primarni biofilm prepun hranjivih soli i drugih organskih metabolita koje služe kao izvor hrane i prekursora za odvijanje metabolizma drugih organizama u biofilmu. Glavna pokretačka sila za razvoj bakterijskih zajednica je samoorganizacija i suradnja između stanica, a ne klasična kompeticija individualnih mikroorganizama (Daniels i sur. 2004, Davies i sur. 1998, Fuqua i Greenberg 2002, Parsek i Greenberg 2005). Bakterije su kolonijalni organizmi po prirodi i samim time mogu mijenjati i sebi prilagođavati uvjete unutar biofilma jer imaju sposobnost koordiniranog moduliranja genske ekspresije obzirom na okolišne uvjete (Daniels i sur. 2004). Kemijski spojevi koje proizvode bakterije i dijatomeje, kao i živi mikroorganizmi koji žive unutar biofilma mogu dovesti do poremećaja u formiranju i/ili spriječiti samo naseljavanje te prema tome mogu biti korisni za biotehnoške razvoje ekoloških zaštita protiv morskog obraštaja (Clare i sur. 1992, Holmstrøm i Kjelleberg 1999, Armstrong i sur. 2000a).

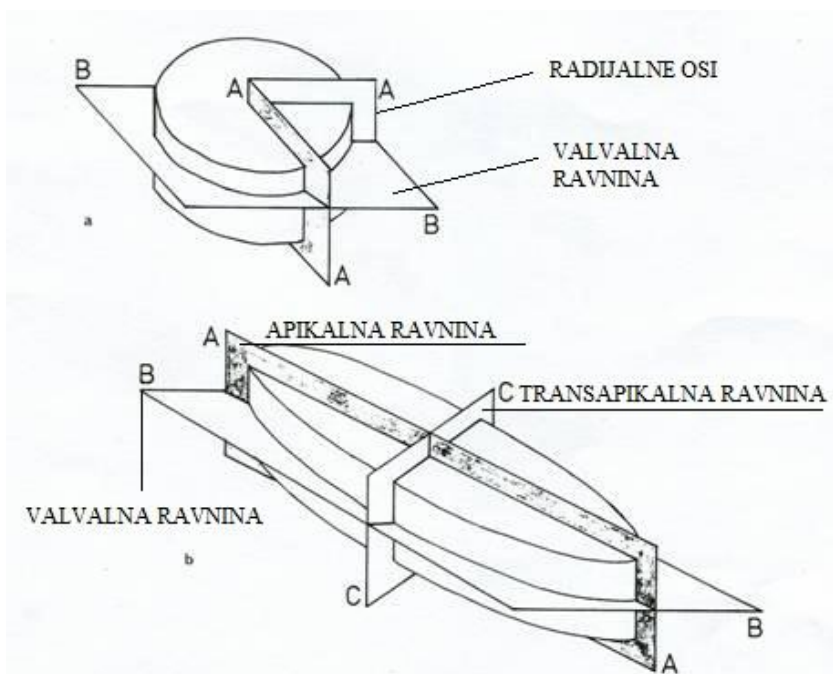
1.4. Bacillariophyceae – alge kremenjašice

Dijatomeje ili alge kremenjašice (red Heterokontophyta, carstvo Eukaryota) su jednostanični autotrofni organizmi koji žive pojedinačno ili u kolonijama. Nalazimo ih u moru, boćatoj i slatkoj vodi te u vlažnoj zemlji. Postoje planktonski oblici i oni koji žive na supstratu ili su za njega pričvršćeni. Diyatomeje nemaju bičeve, lebde u vodi i u potpunosti ovise o horizontalnom i vertikalnom gibanju vodenih masa.

Stanica diyatomeja nema staničnu stijenku već je nakon stanične diobe obavijena periplastom. Ispod plazmaleme nalaze se vezikule u kojima se sintetizira amorfn i netopljivi opal ($\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) iz netopljivog silicija, koji je u moru prisutan u obliku ortosilicijeve kiseline (H_2SiO_4) i njezinih topljivih polimera. Ljušturica (frustula) se sastoji od 2 polovice, od kojih veća, kao poklopac kutije, pokriva manju. Vanjska, veća ljuštura se zove epiteka (*epithaecae*), a unutarnja, manja, hipoteka (*hypothaecae*). Svaka teka sastoji se od valve (*epivalva* i *hyposalva*). Valve mogu biti različitih oblika (okrugle, eliptične, stožaste ili valovite), a bočno su spojene sa pojasom. Pleure gornjeg i donjeg dijela ljušturice stvaraju pojas, a dva vezujuća pojasa, po jedan pričvršćen za svaku valvu, zovu se "girdle" (engl. *girdle bands*) (von Stosch 1975) i oni drže valve spojene preko njihovih rubova pektinoznim filmom. Nekada postoji jedan ili više dodatnih pojaseva koji se zovu interkalarni pojasevi. Svaka stanica diyatomeje ima valvalni i pleuralni položaj. U taksonomskoj identifikaciji diyatomeja važno je sagledati oba položaja stanice jer se sve morfološke karakteristike ne mogu vidjeti samo iz jedne perspektive. Imaju velike vakuole koje zapremaju 90% staničnog prostora.

S obzirom na simetriju razlikujemo diyatomeje s radijalnom simetrijom – centrice (Centrales, po novom Biddulphiales) i one s bilateralnom simetrijom – pentane diyatomeje (Pennales, po novom Bacillares). Kod centrica se može povući bezbroj ravnina simetrije koje prolaze kroz pervalvalnu os. Kod pentatnih diyatomeja se može povući tri osi simetrije (apikalna, transapikalna i pervalvalna) te tri ravnine simetrije (valvalna, apikalna i transapikalna) (Slika 4). Stanice nekih vrsta diyatomeja simetrične su samo s obzirom na jednu ili dvije ravnine simetrije. Valvalna (dijeli stanicu na gornju i donju polovicu) i apikalna (dijeli stanicu na lijevu i desnu polovicu) ravnina prolaze kroz apikalnu os simetrije. Kroz transapikalnu i pervalvalnu od prolazi

transapikalna ravnina simetrije koja dijeli stanicu na prednji i stražnji dio. Ako se prednji i stražnji dio stanice ne razlikuju, transapikalna ravnina ne postoji. Međusobni odnos dimenzija ravnina simetrije određuju oblik valve (Kelly 2000).

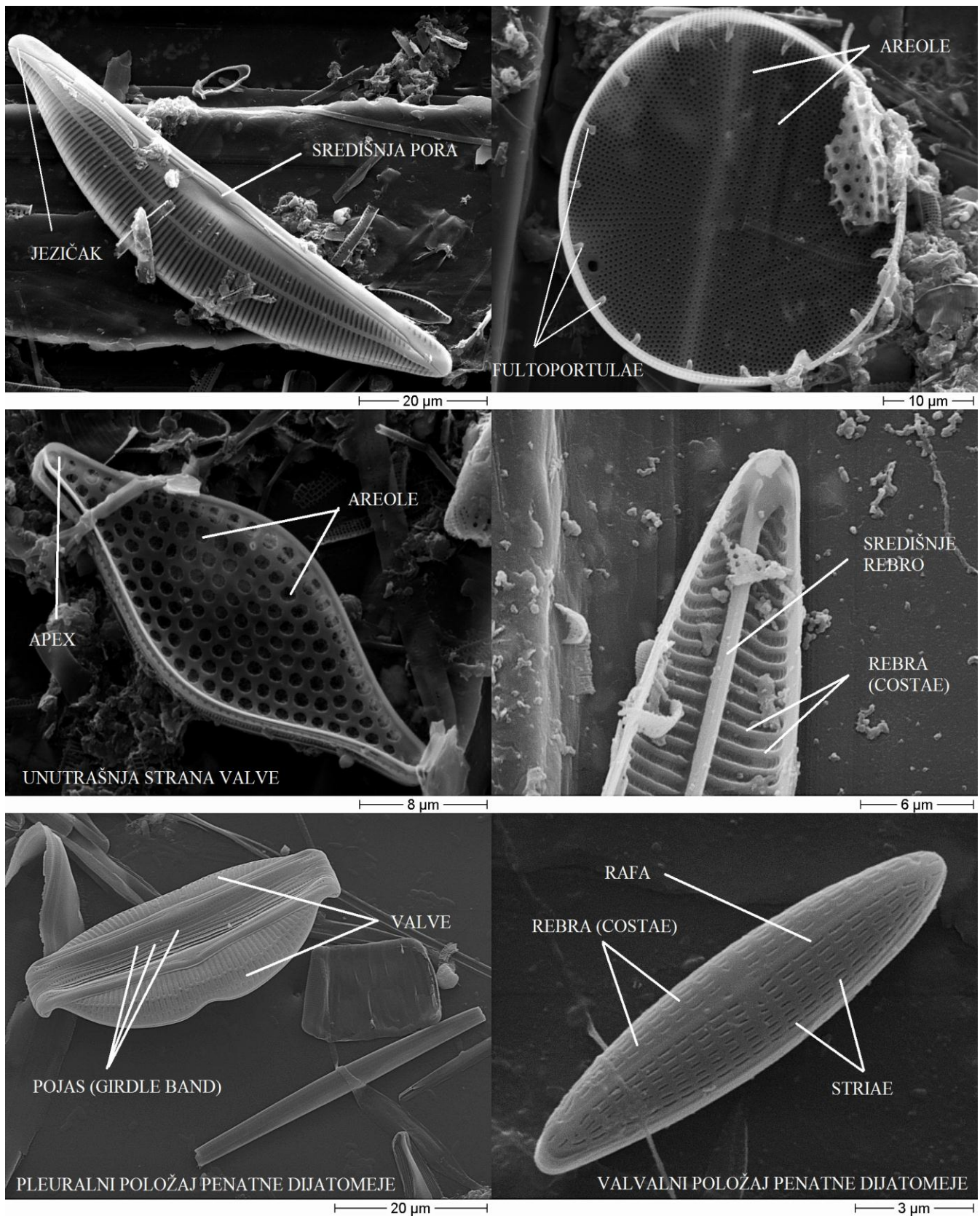


Slika 4. Ravnine i osi simetrije u dijatomeja s radijalnom simetrijom (a) i bilateralnom simetrijom (b)-
Preuzeto i prilagođeno sa:

http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/biodiversity/sahyadri_enews/newsletter/issue26/article1/chap3.htm

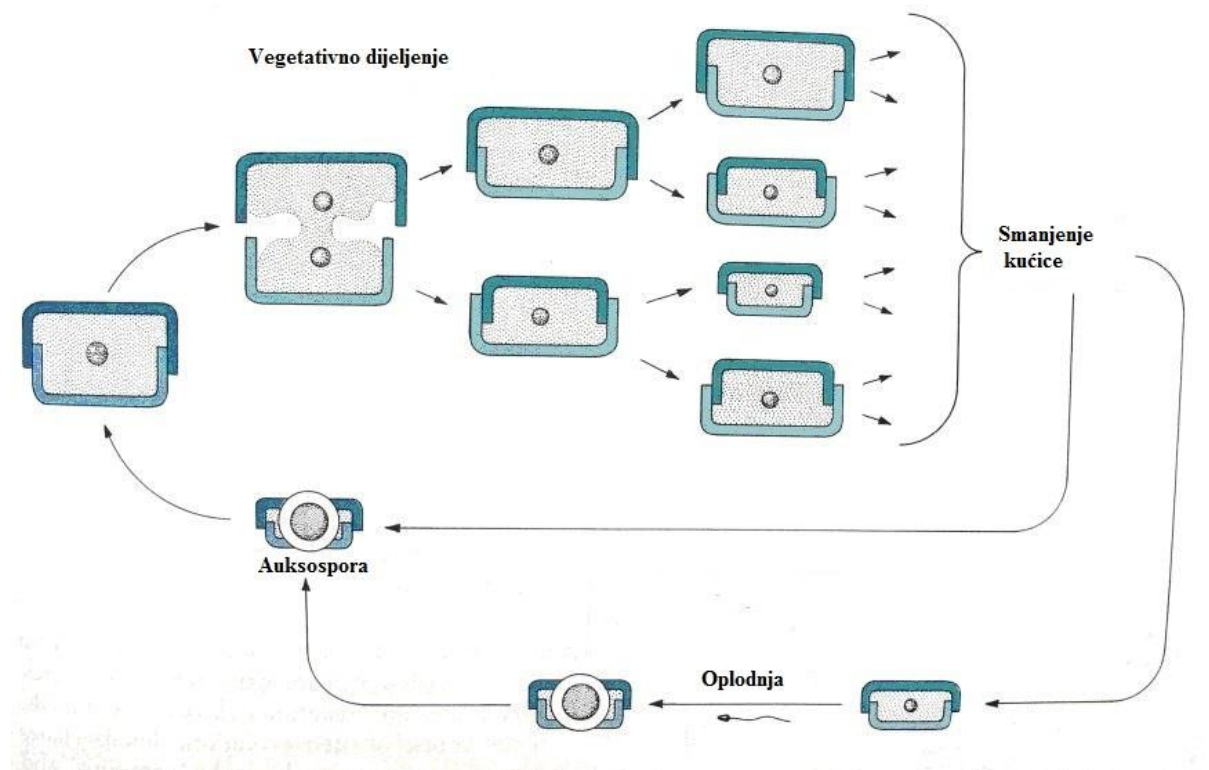
Neke pentane dijatomeje imaju longitudinalni prorez u teki koji se zove pukotina ili rafa (*rapha*) koja je podijeljena na dva dijela središnjim čvorom (*nodulus centralis*), a svaka polovica rafe završava u ispupčenju koje se zove vršni čvor (*nodulus apicalis* ili *nodulus terminalis*). Rafe vrlo često završavaju vršnim, apikalnim porama (*porus apicalis*) ili jezičastom strukturom (*helictoglossum*) (Slika 5). Dok je kod nekih vrsta rafa reducirana na samo jednu valvu (*monorafidale*), kod drugih se nalazi na obje valve (*birafidale*) ili ju uopće nemaju (*arafidale*).

Uz rafu, postoje dva tipa perforacija ljuštura: jednostavne rupe ili pore i kompleksnije lokule ili areole (Hendey 1964, Ross i Sims 1972). Pora se sastoji od jednostavne rupe u inače homogenoj silificiranoj ljušturi koja je često pojačana rebrima (*costae*). Pore ili areole mogu biti u jednom, dva ili više redova (*stria*, pl. *striae*).



Slika 5. Glavne morfološke karakteristike ljušturice penatnih dijatomeja

Razmnožavanje je najčešće vegetativno, diobom stanice, ali postoji i raznolik spolni život. U vegetativnoj diobi svaka od novih stanica zadržava polovinu ljušture stanice-majke, a drugu polovinu sama dograđuje (za to im treba 10 – 20 minuta, a tijekom dana mogu se dijeliti 1 – 8 puta). Novonastale stanice nisu jednake po veličini. Jedna stanica je veličine epiteke stanice-majke, a druga stanica je veličine njezine hipoteke. Kao posljedica takvog načina diobe, odnosno nakon niza uzastopnih dioba, javlja se postupno smanjivanje veličine stanica (Slika 6).



Slika 6. Životni ciklus penatne dijatomeje. Preuzeto i prilagođeno sa <http://www.bio.vu.nl/thb/deb/>

Kad se veličina stanice smanji na polovinu ili trećinu normalne veličine stanice-majke, aktivira se gen koji zaustavi daljnju diobu stanice, a zatim dolazi do spolnog rasploda (kopulacije). Nakon kopulacije razvija se auksospora. Ona počinje klijati te zbog rastezanja (bubrenja) višestruko naraste. Stare ljušture, koje ponekad još vise na njoj, razmaknu se, te nastaje novi par ljuštura. Tako je nastala ponovno nova, "početna" stanica-majka.

Mnoge dijatomeje nakon aktivnog vegetativnog razdoblja (ili u nepovoljnim uvjetima), prelaze iz vegetativnog oblika u oblik stospore. Kad se količina hranjivih soli i/ili duljina dana ponovno poveća, stospora proklije i vrati se u normalnu, vegetativnu fazu. Vegetativna reprodukcija ograničena je količinom otopljenog silicija u vodi, koji je topljiviji i dostupniji u alkalnoj vodi.

Dosad je opisano oko 12 000 vrsta dijatomeja svrstanih u preko 250 rodova, a pretpostavlja se da bi ukupno moglo biti oko 100 000 vrsta (van der Hoek i sur. 1995). Na temelju molekularnih podataka, sastava pigmenata te strukture plastida, dijatomeje su smještene u odjel Heterokontophyta (Medlin 2006). Dijatomeje, kao najvažnija i najdominantnija skupina perifitonskih zajednica te njihova uloga u primarnoj produkciji u vodenim staništima su često podcijenjene. Osim kvantitativnih i kvalitativnih važnosti perifitonskih dijatomeja, njihovom istraživanju je pridana važnost jer su odlični ekološki indikatori kako su prisutni u svim vodnim staništima te reagiraju na male ekološke promjene velikim promjenama u biomasi. Posebno, uočeno je da su dijatomeje jako dobar indikator pH, saliniteta te hranjivih soli pa su se počele široko koristiti kao ekološki indikator vode za probleme kao što su problem acidifikacije (Charles i sur. 1990, Battarbee i sur. 1990, Battarbee i sur. 1999), salinifikacije (Fritz 1990, Juggins 1992, Cumming i Smol 1993), eutrofikacije (Smol i sur. 1983, Engstrom i sur. 1985, Whitmore 1989, Anderson 1990, Bennion i sur. 2000), te klimatske promjene (Smol i Cumming 2000). Njihova bioindikatorska uloga se koristi i proučava unutar znanosti paleoekologije.

1.4.1. Dijatomeje u biofilmu

Perifitonske dijatomeje dijele se na različite forme obzirom na njihov rast (Round, 1981): uspravne (prvenstveno arafidne vrste koje su pričvršćene na substrat pomoću ekstracelularnih polimernih substanci (EPS) pomoću kojih izgrađuju stapke), dobro pričvršćene (engl. adnate) koje su prvenstveno monorafidne vrste koje se pričvršćuju cijelom površinom valve, te neke birafidne vrste kao što je *Amphora* spp., pokretne (birafidne vrste koje se slobodno pokreću po substratu), dijatomeje koje formiraju sluzavi omotač (engl. *tube-forming*) - navikuloidni i nitzchoidni oblici koji žive u sluzavim omotačima koje su same proizvele, plokon (engl. *plocon*)

- alge koje su slabo pričvršćene za substrat kao što su centrice i cijanobakterije, planktonske (vrste koje ostaju zarobljene u perifitonskoj zajednici pri tome nastavljajući sa procesima fotosinteze).

Prema Totti i sur. te njihovom istraživanju u sjevernom Jadranu postoji nekoliko faza naseljavanja mikrofitobentosa. U prvoj fazi, substrat naseljavaju samo bakterije i detritus, a slijede dobro pričvršćeni i pokretni oblici dijatomeja koji formiraju rozetaste strukture uspravno se pričvršćivajući na substrat. U zadnjoj fazi događa se veliki rast uspravno pričvršćenih dijatomeja koje naposljetku kreiraju kompleksnu trodimenzionalnu zajednicu (Korte i Blinn, 1983, Tuji, 2000a, b).

1.5. Prethodna istraživanja

1.5.1. Jadransko more

Jadransko more je sjeverni izdanak Sredozemnog mora (Mediterrana), a čini samo 4,6% od ukupne površine. (Riđanović i sur. 1999). Jadransko more je pretežno plitko. Sjeverno od Pule mu dubina ne prelazi 50 m, a sjeverno od Zadra 100 m. Najdublji dio Jadrana je Južnojadranska kotlina čija je dubina veća od 200 m, a dostiže 1243 m. Jadran je također relativno toplo more - temperatura mu ne pada ispod 11 °C.

Sjeverni Jadran je relativno plitko more te njegova dubina ne prelazi 50 metara. Ta karakteristika omogućuje da se zajednice algi razvijaju i na samom dnu budući je cijelo more u eufotičkoj zoni (svjetlost dopire do samog dna).

Rijeka Po najsnažniji je izvor slatke vode i nutrijenata u sjevernom dijelu Sredozemlja (Pettine i sur. 1998). Povećana koncentracija nutrijenata u sjevernom Jadranu izaziva pojačan razvoj fitoplanktona (Revelante i Gilmartin 1976, Chiaudani i sur. 1980, N. i T. Tegaccia 1983, Gilmartin i sur. 1990, Giordani i sur. 1997). Dominiraju dijatomeje, ali je i čest razvoj toksičnih vrsta (Honsel i sur. 1992). Morske struje određuju raspodjelu fizikalno-kemijskih te bioloških svojstava u sjevernom Jadranu. Tako se npr. more uz istarsku obalu u proljeće i ljeto zagrijava brže nego što se hladi u jesen, a to je povezano sa širenjem vode rijeke Po (Supić i Orlić 1992).

1.5.2. Istraživanja u Jadranskom moru

Istraživanja rađena u sjevernom Jadranu su prvi podaci o distribuciji mikrofitobentosa ne samo u Jadranskom moru, već i u cijelom Mediteranu. U nekoliko istraživanja pokazalo se da se kolonizacija na umjetnim podlogama razlikuje od one na prirodnim (Hamilton i Duthie 1984, Sabater i sur. 1998). Pokazalo se da ne postoji bitna razlika u strukturi zajednica na različitim umjetnim podlogama, već da se slične zajednice mogu promatrati na različitim supstratima. Perifitonske zajednice u sjevernom Jadranu sastojale su se pretežito od dijatomeja koje su pokazale izrazitu sezonsku varijabilnost. Najveća abundancija i biomasa bila je uočena u periodu između veljače i listopada ($557,156 \pm 82,602$ stanica cm^{-2}), dok je u periodu između siječnja i veljače abundancija i biomasa bila mnogo niža (365 ± 407 stanica cm^{-2}) (Totti i sur., 2007). Podaci su uskladu s istraživanjima koje je proveo Round (1972, 1985) koji je otkrio da je najveća raznolikost dijatomeja upravo u periodu najveće insolacije i temperature. Rezultati su također u korelaciji s podacima o sezonskoj varijabilnosti planktonskih zajednica istog područja (Totti i sur. 2000, Bernardy-Aubry i sur. 2004). Nagli porast broja dijatomeja pripisuje se duljini danjeg svjetla te također naglom porastu nutrijenata nakon zimskog miješanja (Marini i sur. 2002).

Uočeno je više faza kolonizacije umjetnih podloga: u prvoj fazi na podlogu se smještaju bakterije te organski detritus, u sljedećoj fazi dolaze dijatomeje koje leže na supstratu te uspravne vrste koje tvore neku vrstu rozete, a tek u posljednjoj fazi javlja se nagli porast uspravnih dijatomeja koje tvore kompleksnu trodimenzionalnu zajednicu (Totti i sur., 2007).

Također, uočena je sezonalna razlika u strukturi zajednica. Pokretne vrste predstavljale su glavnu komponentu perifitonske zajednice tijekom cijelog vremena trajanja istraživanja. Uspravne vrste povećale su svoj broj u proljeće te kasno proljeće. Adnatne dijatomeje u većem broju pojavile su se u ljeto, dok su "*tube dwellers*" svoj maksimum imale u proljeće. Plokon i planktonske vrste imale su zanemariv broj. Prisutnost planktonskih vrta zimi povezano je za klasičnim zimskim cvjetanjem fitoplanktona u sjevernom Jadranskom moru. Dominacija pokretnih vrsta može se povezati sa njihovom sposobnošću da se slobodnije kreću u biofilmu, što ih čini superiornijim kompetitorima za nutrijente i svjetlost od ostalih (DeNicola i McIntyre 1990).

Biološka istraživanja perifitonskih dijatomeja u srednjem Jadranu do današnjeg dana bazirana su na područja poput estuarija hrvatskih krških rijeka. Većina ih je rađena na estuariju rijeke Zrmanje (Caput et al. 2005, Burić et al. 2004). Obalno more uz ušće rijeke Zrmanje položeno je između planinskog lanca Velebita sa sjeverne strane i prostrane sjevernodalmatinske zaravni s južne i istočne strane (Friganović 1961). Područje čini izrazito razveden i složen hidrogeomorfološki sustav (Fritz 1972) u kojem more ulazi duboko u kopno i pod snažnim je utjecajem oborinskih voda. Podaci pokazuju da oštra haloklina u estuariju Zrmanje dijeli vodeni stupac na boćati sloj iznad halokline i na morski sloj ispod halokline, po čemu se estuarij Zrmanje može klasificirati kao visokostratificirani sustav, u vrijeme pojačanog dotoka slatke vode (Viličić i sur. 1999).

U južnom Jadranu u tijeku su istraživanja koja se fokusiraju na taksonomiju epifitskih dijatomeja na područjima zahvaćenim invazivnim vrstama makroalge iz roda *Caulerpa*. Do sada je pronađena jedna nova vrsta dijatomeje *Cocconeis caulerpacola* sp. nov. (Car A. i sur. 2012). Također, istražuje se i morfologija dijatomeja koje obraštaju alge roda *Caulerpa*, kao što je rod *Mastogloia* (Car A. i sur. 2012, međunarodna recenzija, znanstveni sažetak).

1.6. Cilj istraživanja

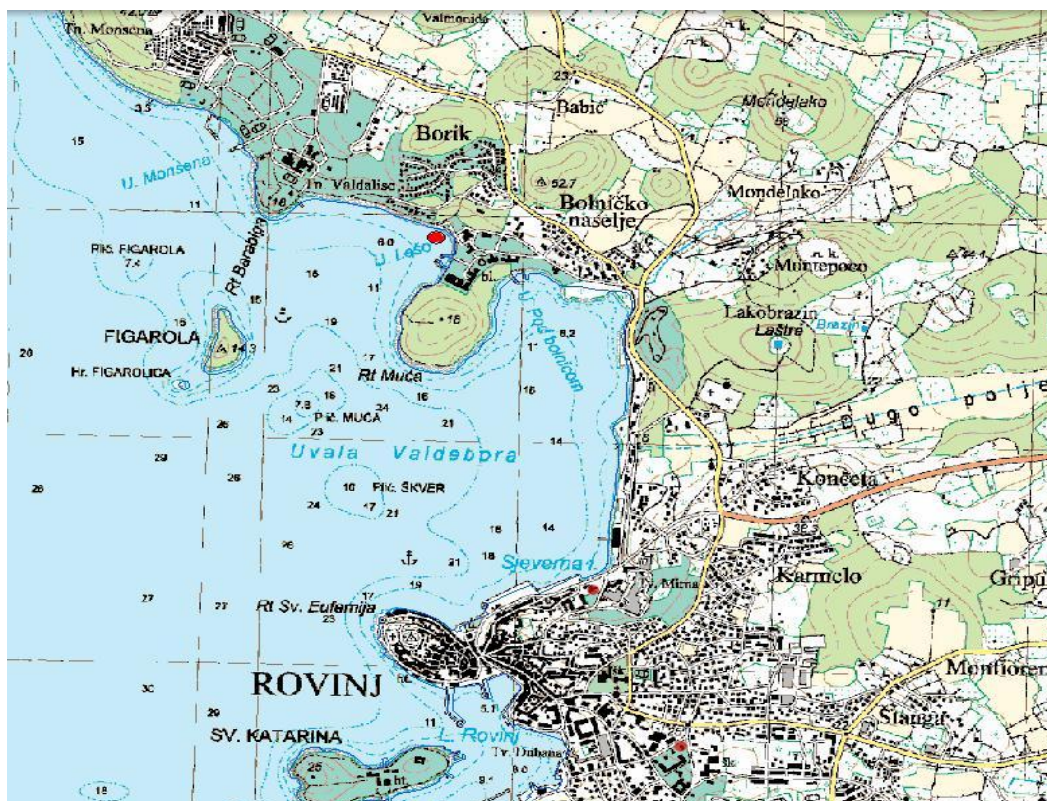
Glavni ciljevi ovog istraživanja su: (i) istražiti sukcesiju i naseljavanje u procesu nastajanja primarnog biofilma u moru, (ii) odrediti dinamiku naseljavanja organizama primarnog biofilma na umjetnoj podlozi kako bi se dobio uvid u slijed naseljavanja (iii) obraditi cijelu zajednicu primarnog biofilma kako bi se dobila jasnija slika razvoja obraštaja.

Također, ciljevi ovog istraživanja su: odrediti brojnost i kvalitativni sastav dijatomeja na umjetnim pleksiglas pločicama, a sa njima, utvrditi i brojnost te skupinu bakterija. Ovo istraživanje uz brojnost bakterija i dijatomeja želi pokazati i njihovu raspodjelu kroz ispitivano vrijeme od 30 dana, međusobni utjecaj na rast i razvoj te dati uvid u procese naseljavanja viših organizama.

2. Terenski dio istraživanja

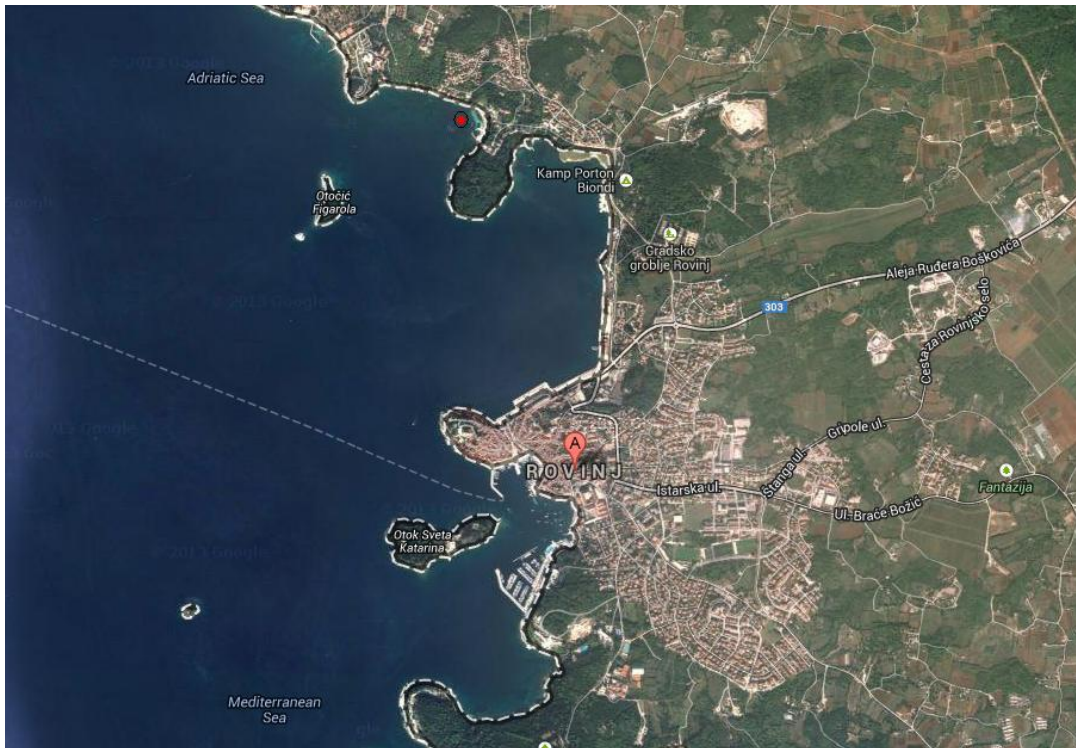
2.1. Područje istraživanja

Istraživanje i uzorkovanje perifitona provedeno je u uvali Val de Lesso kod Rovinja u periodu od 9. rujna do 7. listopada 2013. godine (Slika 7, Slika 8, Slika 9). Umjetne pleksiglas pločice postavljene su 9. rujna na dubinu od 5 metara, a zadnja je uzorkovana 7. listopada.



Slika 7. Lokacija uzorkovanja, Uvala Val de Lesso, Rovinj. Izvor: <http://natura2000.dzrp.hr/georefapp3/>

HTRS96 koordinate: x: 274239,134407, y: 4999489,096748



Slika 8. Lokacija uzorkovanja, Uvala Val de Lesso, Rovinj. Izvor: <https://maps.google.hr/>

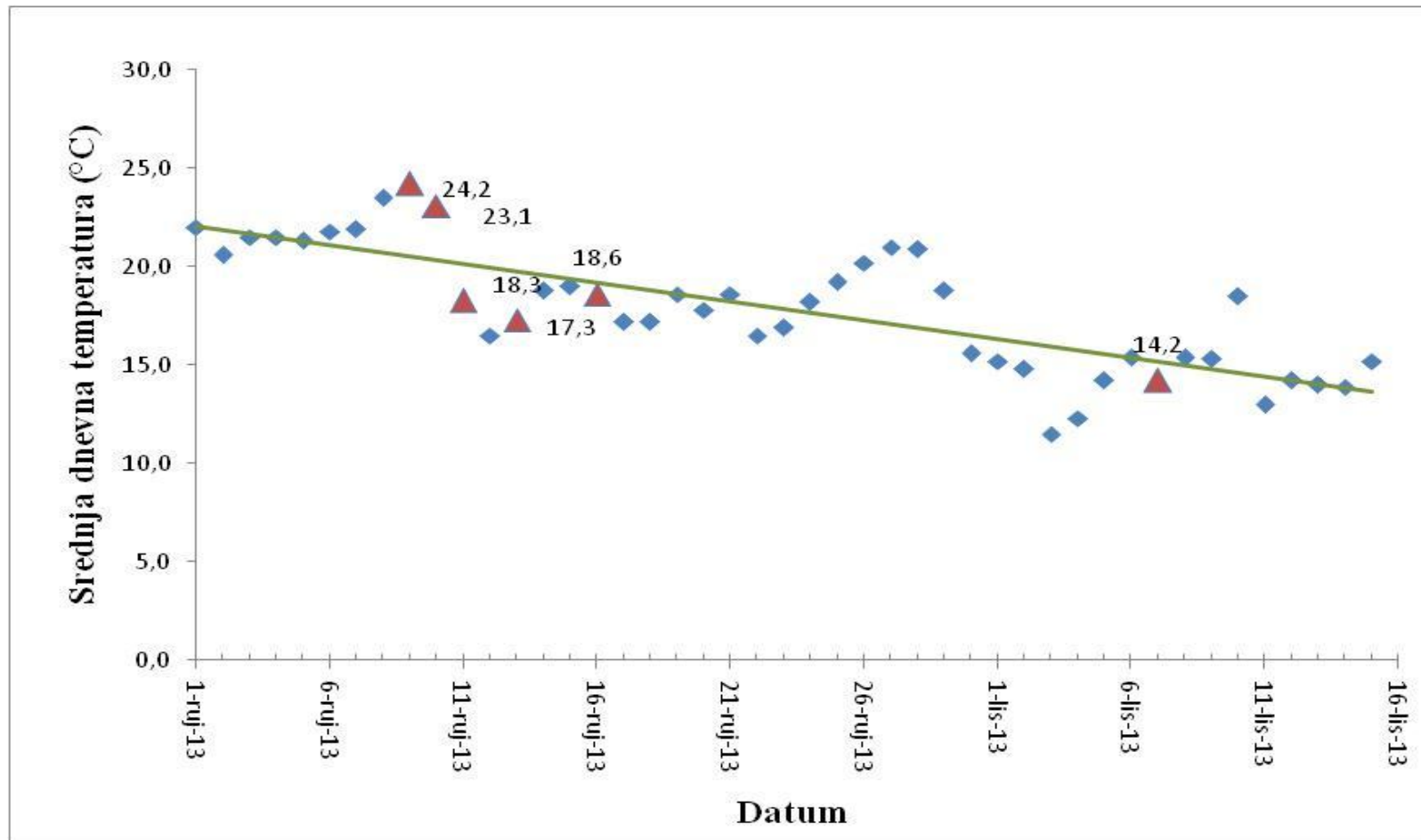


Slika 9. Lokacija uzorkovanja, Uvala Val de Lesso, Rovinj

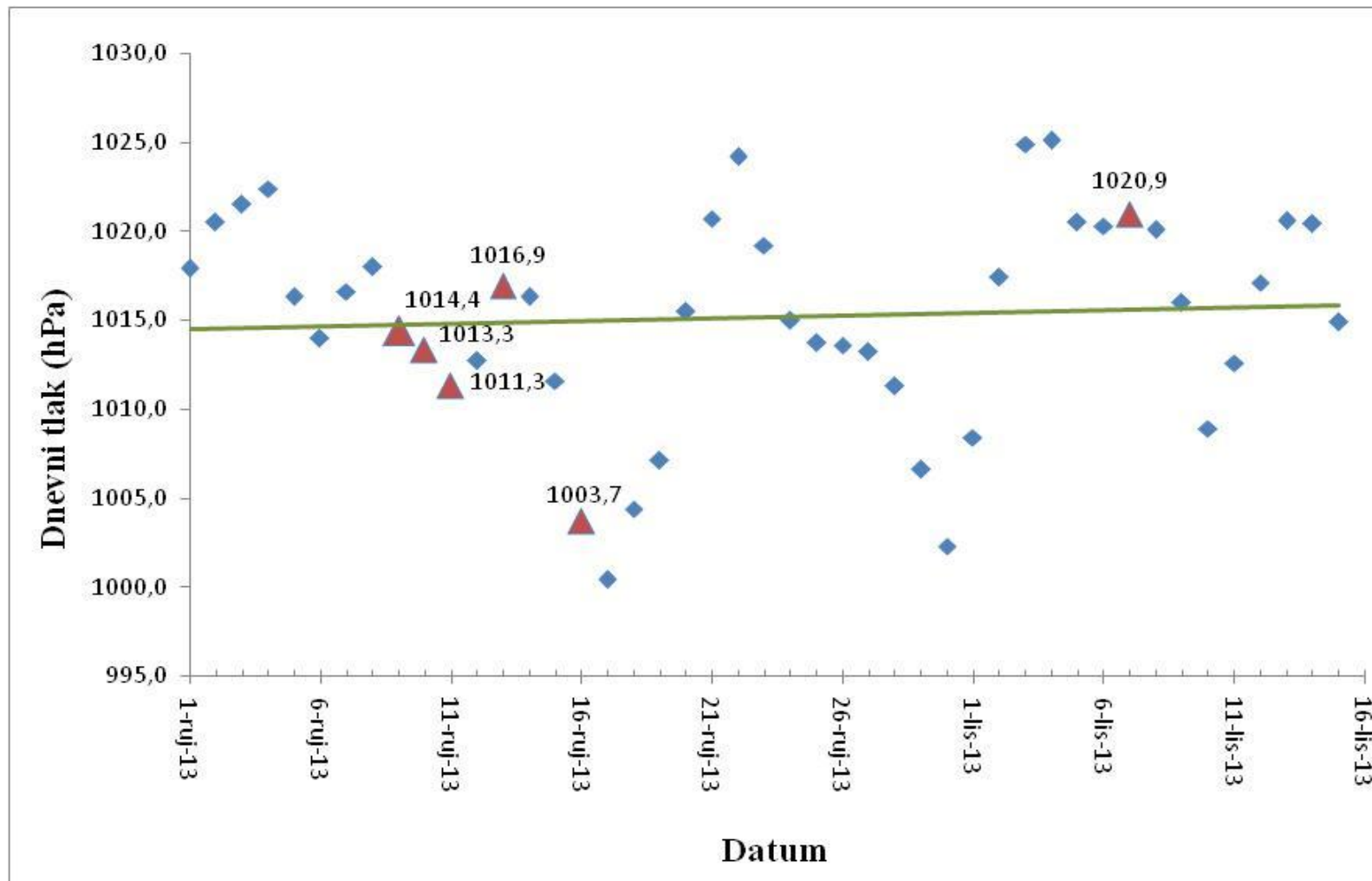
2.2. Hidrografski čimbenici

Tijekom uzrokovanja u mjesecu rujnu i listopadu 2013. godine vremenski uvjeti su bili nestabilni što se odrazilo na samu strukturu vodenog stupca, a posljedično i strukturu perifitonskih zajednica i formiranje biofilma na umjetnim pleksiglas pločicama. Hidrografski parametri za spomenuto razdoblje dani su u slikama (Slike 10 – 13) i tablicama (Tablica 1) u ovom poglavlju, a ustupljeni su od strane Državnog Hidrometeorološkog Zavoda, Odsjeka za obradu podataka brodskih dnevnika i temperature mora, Split.

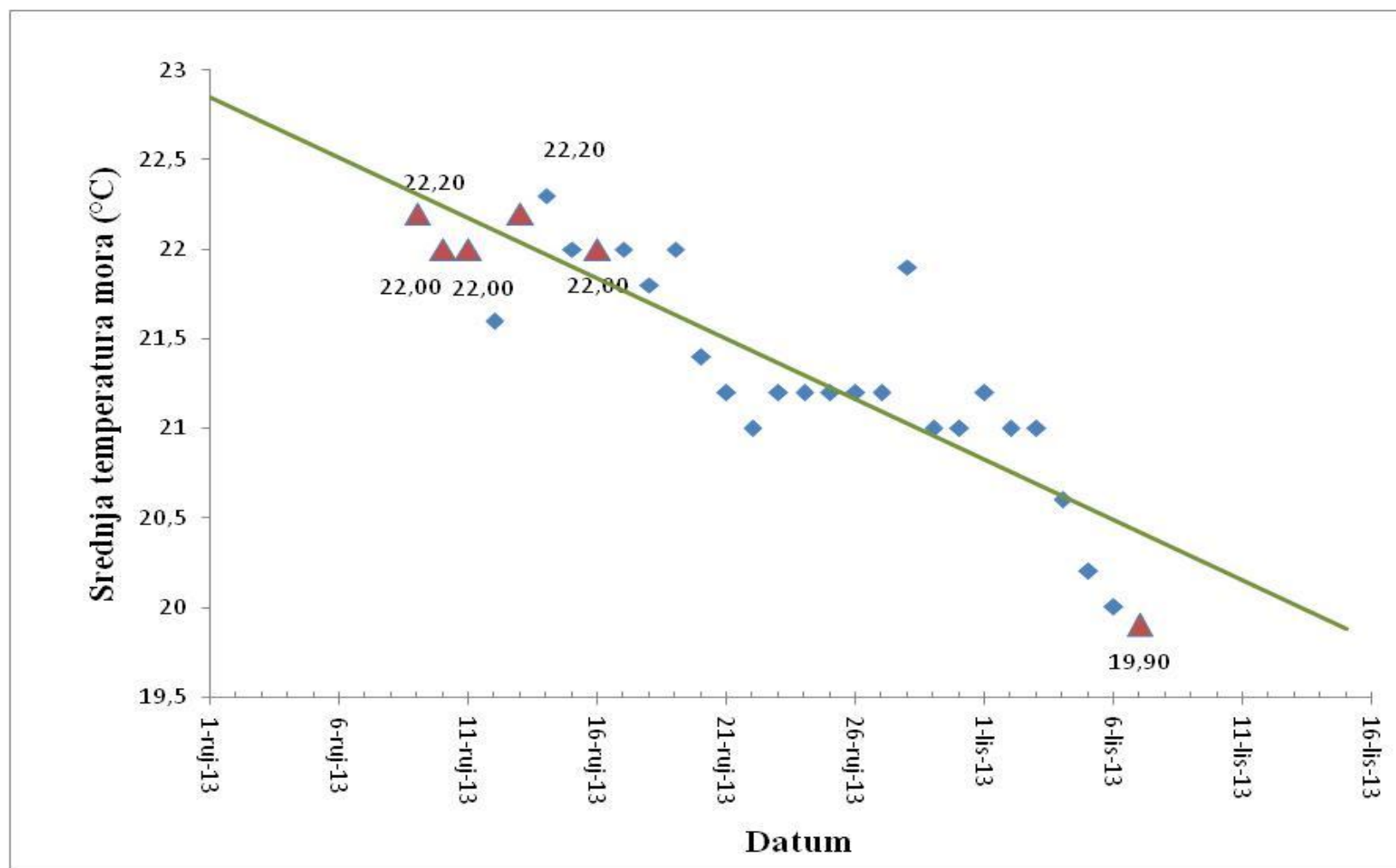
9. rujna 2013. godine, na dan postavljanja eksperimenta temperatura zraka bila je 24,2 °C, dnevni tlak 1014,4 hPa, temperatura mora 22,2 °C, količina oborine 0,3 mm te jačina sjevero-sjeverozapadnog (SSW) vjetra 3, što je za posljedicu imalo izmješani vodeni stupac do 5 m dubine na kojoj je postavljena konstrukcija. Vidljivost tijekom ronjenja i postavljanja konstrukcije je bila jako loša, a površinski i pridneni valovi veliki do ~80 cm.



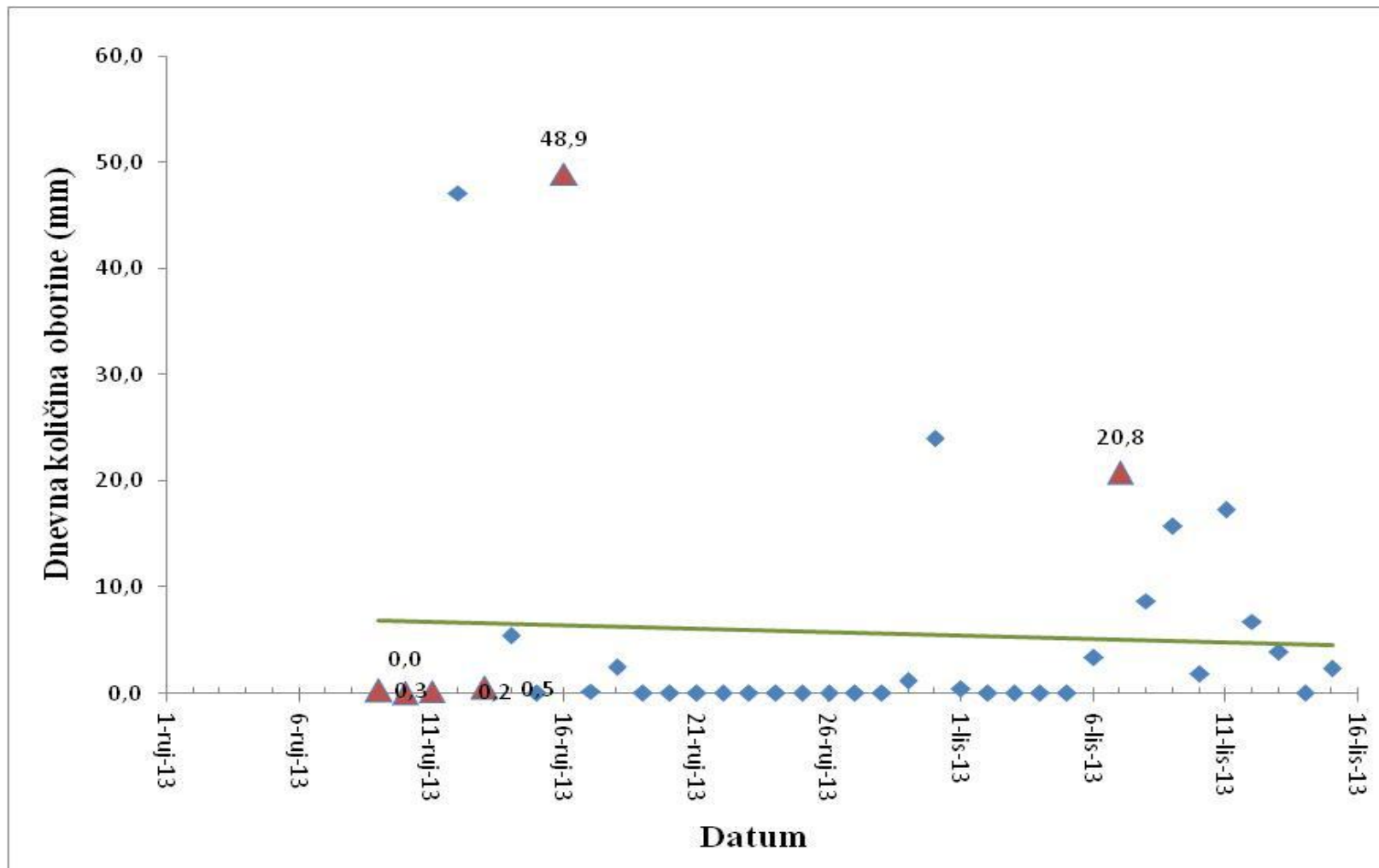
Slika 10. Srednja temperatura zraka za razdoblje rujan/listopad 2013. godine; plavi kvadrati – srednje vrijednosti temperature za pridružene datume; crveni trokuti – srednje vrijednosti temperature za datume uzorkovanja; zelena linija – linearni trend srednje dnevne temperature



Slika 11. Dnevni tlak za razdoblje rujan/listopad 2013. godine; plavi kvadrati – vrijednosti dnevnog tlaka za pridružene datume; crveni trokuti – vrijednosti dnevnog tlaka za datume uzorkovanja; zelena linija – trend dnevnog tlaka



Slika 12. Temperatura mora za razdoblje rujan/listopad 2013. godine; plavi kvadrati – vrijednosti temperature mora za pridružene datume; crveni trokuti – vrijednosti temperature mora za datume uzorkovanja; zelena linija – trend temperature mora



Slika 13. Količina oborine za razdoblje rujan/listopad 2013. godine; plavi kvadrati – dnevne vrijednosti količine oborine za pridružene datume; crveni trokuti – dnevne vrijednosti količine oborine za datume uzorkovanja; zelena linija – trend dnevne količine oborine

Tablica 1. Podaci jačine i smjera vjetra za razdoblje rujan/listopad 2013. godine; vrijednosti jačine jetra po Beaufortovoj ljestvici jačine vjetra (0-12); NE – sjeveroistočnjak; ENE – istočnjak-sjeveroistočnjak; E- istočnjak; ESE – istočnjak-jugoistočnjak; SSE - jugo-jugoistočnjak; SE – jugoistočnjak; SW – jugozapadnjak; WNW – zapadni-sjeverozapadni; SSW – jugo-jugozapadni; WSW – zapadni-jugozapadni; W – zapadni; E – istočni; N – sjeverni; S – južni; C – nema vjetra;

Rujan 2013.						Listopad 2013.						
7	sati	14	sati	21	Sat	7	sati	14	sati	21	sat	
Smjer	Jačina	Smjer	Jačina	Smjer	Jačina	Smjer	Jačina	Smjer	Jačina	Smjer	Jačina	
1	NE	2	SW	3	ESE	1	ENE	1	WNW	3	ENE	2
2	ENE	2	WNW	3	ENE	2	ENE	3	WSW	3	ENE	3
3	ENE	1	WNW	3	NNE	2	ENE	1	WSW	2	ENE	2
4	ENE	1	SSW	3	ENE	1	ENE	1	NNW	2	ENE	1
5	ENE	1	WSW	3	NE	1	E	1	ENE	3	E	3
6	E	1	WSW	3	ENE	1	E	1	ESE	2	NNE	2
7	NE	1	WNW	2	NE	1	ENE	1	SSW	1	ENE	3
8	ESE	1	SSW	3	ESE	2	E	3	NE	2	NE	1
9	SSE	4	SSW	3	ESE	2	ENE	1	WSW	2	E	1
10	SE	1	SSW	3	SSW	3	ENE	1	SE	3	SSE	4
11	SE	1	SSW	2	E	1	W	1	NW	2	SSW	1
12	ENE	2	WSW	3	ENE	1	ESE	1	SW	3	ENE	1
13	ESE	1	WNW	3	E	1	ESE	1	WNW	2	ENE	1
14	ESE	2	SW	3	ESE	1	ENE	1	NNW	3	E	2
15	SE	2	SE	3	WSW	3	C	0	WSW	2	SSW	1
16	NE	2	WNW	3	SE	2	NNW	1	WNW	3	ESE	1
17	SW	4	SSW	2	E	2	ENE	1	NW	3	ENE	1
18	ENE	2	SSW	3	ENE	1	ENE	1	WNW	3	ENE	1
19	ESE	2	SSW	2	ESE	2	ESE	1	SSW	3	ESE	1
20	ESE	1	SW	3	ENE	1	ESE	1	SW	2	ESE	1

2.3. Priprema eksperimenta

Kao supstrat za nastanak biofilma korištene su umjetne pleksiglas pločice (polimer metil metakrilata, proizvođač Akripol, Slovenija) dimenzija D:Š:V 100 x 70 x 2 mm za algološko uzorkovanje i 70 x 20 x 2 mm za bakteriološko uzorkovanje koje su se postavile u čeličnu konstrukciju s plastičnim vodilicama (Slika 14). Konstrukcija je postavljena u more na dubinu od 5 m u naselje morske cvjetnice *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, odignuta od sedimenta 30 cm i dodatno učvršćena sa žicom za betonske blokove kako bi se sprječila mogućnost nestanka ili oštećenja tijekom mjesec dana.



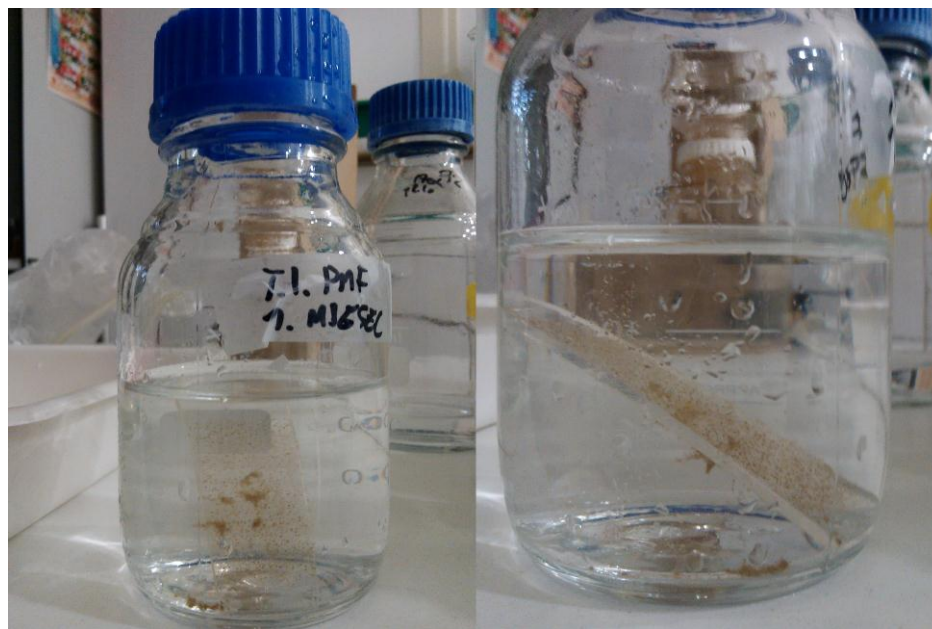
Slika 14. Konstrukcija sa pleksiglas pločicama postavljena u naselje morske cvjetnice *Cymodocea nodosa*

Postavljene su po dvije veće te jedna manja pleksiglas pločica za svako uzorkovanje, ukupno 24. Pleksiglas pločice su prethodno dezinficirane 70%-tnim etanolom i spremljene u sterilne spremnike. Sve bočice za bakteriološke pločice prethodno su sterilizirane u autoklavu i napunjene sa po 100 mL fiziološke otopine.

2.4. Uzorkovanje

2.4.1. Bakteriološka analiza

Nakon određenog vremena ekspozicije (1, 12, 24 sata, 1 tjedan, 1 mjesec) pločice su izvađene iz konstrukcije, nježno isprane sa 100 mL sterilne fiziološke otopine (0,8 % NaCl) i uronjene u Schott boce koje su sadržavale 150 mL sterilne fiziološke otopine tako da je cijela površina pločice bila uronjena u tekućinu (Slika 15). Boce su prenošene do laboratorija u prenosivom hladnjaku i držane na +4 °C do početka pokusa. Pokusi su provedeni najviše 24 sata nakon uzorkovanja.



Slika 15. Schott boce sa pleksiglas pločicama i fiziološkom otopinom

2.4.2. Algološka analiza

Nakon određenog vremena ekspozicije (1, 12, 24, 48 sati, 4 dana, 1 tjedan, 1 mjesec) pločice su na dubini od 5 m stavljene u sterilne vrećice (Slika 16) pri tome pazeći da se biofilm ne ošteti. Potom su vrećice s pločicama (po dvije po uzorku) prenošene do laboratorija u prenosivom hladnjaku na +4 °C. Daljnja obrada je napravljena po dolasku u laboratorij.



Slika 16. Sterilne vrećice sa pleksiglas pločicama na kojima je pričvršćen biofilm

2.4.3. Fitoplankton

Uz uzorkovanje pleksiglas pločica za perifiton, uzeti su uzorci fitoplanktona na dubini od 5 m pomoću boce zapremine 5 L od kojih se 250 mL odvojilo i fiksiralo za analizu po Utermöhlju (1958) dok se ostatak profiltrirao kroz planktonske čaše. Fitoplankton se uzorkovao nakon 1, 24, 48 sati, 4 dana, 1 tjedan te 1 mjesec. Uzorak fitoplanktona nije uziman nakon 12 sati ekspozicije.

2.4.4. Morska cvjetnica *Cymodocea nodosa*

Prvi dan nakon postavljanja eksperimenta, uzorkovala se i morska cvjetnica *Cymodocea nodosa* u sterilne plastične vrećice kako bi se utvrdila prirodna epifitska zajednica dijatomeja.

2.5. Obrada uzoraka

2.5.1. Bakteriološka analiza

Biofilm s bakterioloških pločica je raspršen pomoću ultrazvučne sonde (Bandelin Sonopuls). Sonda je uronjena u boce s pločicama pri tome pazeći da ne dodiruje stijenke boce ili pleksiglas pločicu te je uključena sa programom 40W, 120 ciklusa u trajanju od 1 sekunde. Biofilm se razbijao u trajanju od ukupno 2 minute po uzorku. Nakon tretmana ultrazvukom uzeti su uzorci supernatanta i nacijepljeni na odgovarajuće hranjive podloge.

2.5.1.1. Određivanje ukupnog broja bakterija

Za određivanje ukupnog broja saprofitskih bakterija korišten je Marine Agar, DIFCO, USA. Uzorci su se razrijedili decimalnim razrjeđenjima i nacijepili na podloge te inkubirali na sobnoj temperaturi od 25 °C tijekom 72 sata.

Za određivanje broja fekalnih koliforma korišten je m-FC agar, Biolife, Italy. Uzorci su se filtrirali preko nitroceluloznog filtra sa vakuum pumpom i to u volumenima od 10, 50 i 100 mL morske vode. Potom su se filtri postavili na hranjive podloge sa m-FC agarom, a podloge su se inkubirale na 44,5 °C tijekom 24 sata.

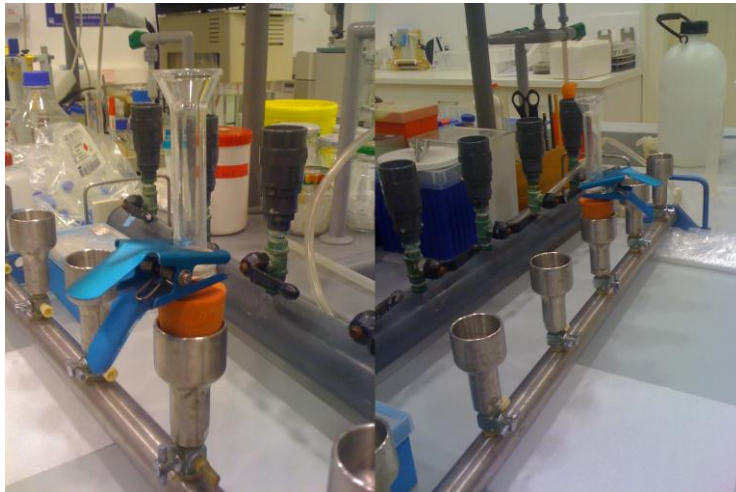
Za određivanje broja fekalnih streptokoka korišten je Slanetz-Bartley agar, Biolife, Italy. Uzorci su se filtrirali preko nitroceluloznog filtra sa vakuum pumpom i to u volumenima od 10, 50 i 100

mL morske vode. Potom su se filtri postavili na hranjive podloge sa Slanetz-Bartley agarom, a podloge su se inkubirale na 35 °C tijekom 72 sata.

Nakon inkubacije porasle kolonije su prebrojane sa Colony counter SC6 (Stuart) i određen je broj bakterija u biofilmu po jedinici površine (CFU cm⁻²).

2.5.1.2. Određivanje broja bakterija bojanjem sa DAPI

Fiksirani uzorci za epifluorescencijski mikroskop lagano su promiješani te je od svakog odvojen volumen od 2 mL i postavljen u filtracijski lijevak (Slika 17) sa polikarbonatnim filtrom veličine oka 0,2 μm. U lijevak je zatim dodana DAPI boja volumena 100 μL te je uzorak ostavljen 10 minuta u tami da se DAPI veže za DNA bakterija. Nakon 10 minuta upaljena je vakuum pumpa te je uzorak sa DAPI bojom profiltriran kroz polikarbonatni filter koji je potom postavljen na predmetno stakalce i sa kapljicom imerzijskog ulja pregledan pod epifluorescencijskim mikroskopom Zeiss AxioCam HRm (Slika 18).



Slika 17. Filtracijski lijevak sa uzorkom

Bakterije su prebrojane pod UV ekscitacijom i povećanjem od 1000 x na 10 vidnih polja. Koncentracija bakterija je potom izračunata po formuli:

$$N = \bar{a} \times F_{2\text{mL}}$$

*N je broj stanica po mL, \bar{a} je srednja vrijednost izbrojanih stanica, F je faktor konverzije mikroskopa normaliziran za volumen od 2 mL ($F_{2\text{mL}} = 6691$)



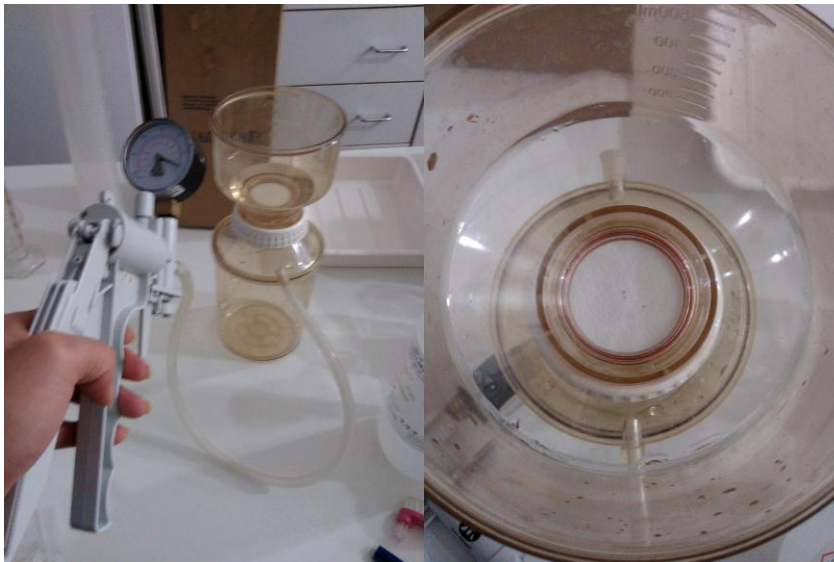
Slika 18. Epifluorescencijski mikroskop Zeiss AxioCam HRm

2.5.2. Algološka analiza

Obraštaj sa pločica za algološku analizu sastrugan je s unutarnje i vanjske strane pločice koristeći četkicu (Slika 19) te ispran sa prethodno profiltriranom morskom vodom kroz bakteriološki filtar promjera oka 0,2 μm . Svaki od uzoraka ispran je s različitim volumenom profiltrirane morske vode, ovisno o potrebi obraštaja. Potom je isprani biofilm odijeljen u tri poduzorka: po 20 mL za epifluorescencijski mikroskop (Zeiss AxioCam HRm), po 100 mL za brojanje po Utermöhl (1958) te je ostatak profiltriran kroz plastičnu aparaturu s ručnom pompom (Slika 20) preko filtera sa staklenim vlaknima veličine pora 0,7 μm (GF/FWhatman). Do ekstrakcije, filteri su pohranjeni u tekućem dušiku.



Slika 19. Struganje biofilma s pleksiglas pločice koristeći četkicu



Slika 20. Aparatura za filtriranje uzoraka za pohranu u tekućem dušiku

Drugi set pločica sa kojih obraštaj nije bio sastrugan, ostavljen je na sušenje na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, pločica je mehanički odlomljena na komadić veličine predmetnog stakalca kako bi se izravno mogla pregledati pod epifluorescencijskim mikroskopom sa DAPI bojom te na manji komadić koji se mogao staviti na aluminijski nosač te pregledati pod skenirajućim elektronskim mikroskopom Philips 515 SEM (FEI Co.).

2.5.3. Fitoplankton

Uzorci fitoplanktona zapremine 5 L odvojeni su po 250 mL za brojanje po Utermöhlju (1958), a ostaci su profiltrirani kroz planktonsku čašu veličine oka 20 µm izuzev uzorka od jednog mjeseca koji je profiltriran kroz planktonsku čašu veličine oka 50 µm. Svi uzorci su prebačeni u plastične bočice odgovarajuće zapremine te konzervirani u 4%-tnoj otopini formaldehida izuzev uzorka fitoplanktona od jednog tjedna.

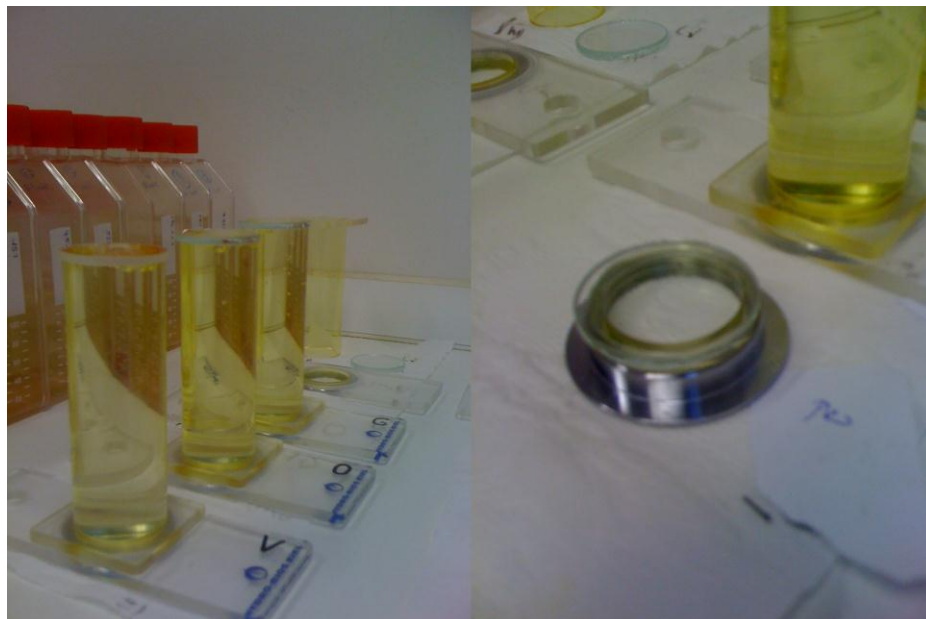
2.5.4. Morska cvjetnica *Cymodocea nodosa*

Dio lista morske cvjetnice namakan je u destiliranoj (H₂O) te je ostavljen na sušenje preko noći da bi se mogao obložiti zlatom i pregledati SEM-om. Ostatak cvjetnice je očišćen od organske tvari kako bi se pregledao taksonomski sastav stabilne epifitske zajednice (vidi p. Elektronska mikroskopija)

2.6. Mikroskopija

2.6.1. Svjetlosna mikroskopija

Za kvantitativnu analizu perifitona i fitoplanktona korištena je metoda po Utermöhlju (1958). Fiksirani uzorci fitoplanktona i perifitona lagano su izmješani preokretanjem bočice te su postavljeni na sedimentaciju (Slika 21). Korištene su manje sedimentacijske komorice zapremine 5 mL za obraštaj te veće sedimentacijske komorice zapremine 10 mL za fitoplankton. Dijatomeje koje se nisu mogle identificirati svjetlosnom mikroskopijom popisivane su kao neidentificirane pentane dijatomeje.



Slika 21. Sedimentacijske komorice za fitoplankton (lijevo) i obraštaj (desno)

Svi uzorci su sedimentirani 24 sata te potom pregledani pod inverznim mikroskopom AxioVert 200, Zeiss GmbH (Oberkocher, Germany) (Slika 22).



Slika 22. Inverzni mikroskop AxioVert 200, Zeiss GmbH

2.6.2. Elektronska mikroskopija

Kako bi se provela dodatna taksonomska analiza pod elektronskim mikroskopom, uzorci su očišćeni od staničnog sadržaja i organske tvari. Proces čišćenja temeljio se na oksidaciji organske tvari agresivnom metodom oksidacije kombinacijom jakih kiselina.

2.6.2.1. Čišćenje uzoraka

Čišćenje uzoraka od organske tvari provedeno je u tri koraka:

1. Ispiranje uzorka od formaldehida

Nakon sedimentacije 24 sata, talog je pokupljen s dna bočice kapalicom i prebačen je u kivetu. Uzorci su u kivetama isprani destiliranom vodom i centrifugirani (10 minuta na 4000 okretaja) te je nakon centrifugiranja vakuum sisasljkom uklonjen supernatant.

2. Uklanjanje anorganske i organske tvari

Uzorku iz kojeg je uklonjen supernatant dodana je približno ista količina kloridne kiseline (HCl) pri čemu je došlo do otapanja kalcijevog karbonata (CaCO_3). Zatim je uzorak ispran od kloridne kiseline na isti način kao i od formaldehida te je u njega dodan 4 x volumen sulfatne kiseline (H_2SO_4). Uzorak je zatim pažljivo zagrijavan sve dok se optički više nisu mogli vidjeti fragmenti i čestice organske tvari u njemu. Nakon zagrijavanja, u uzorak se dodalo par kristalića kalijevog permanganata (KMnO_4) da se obezboji.

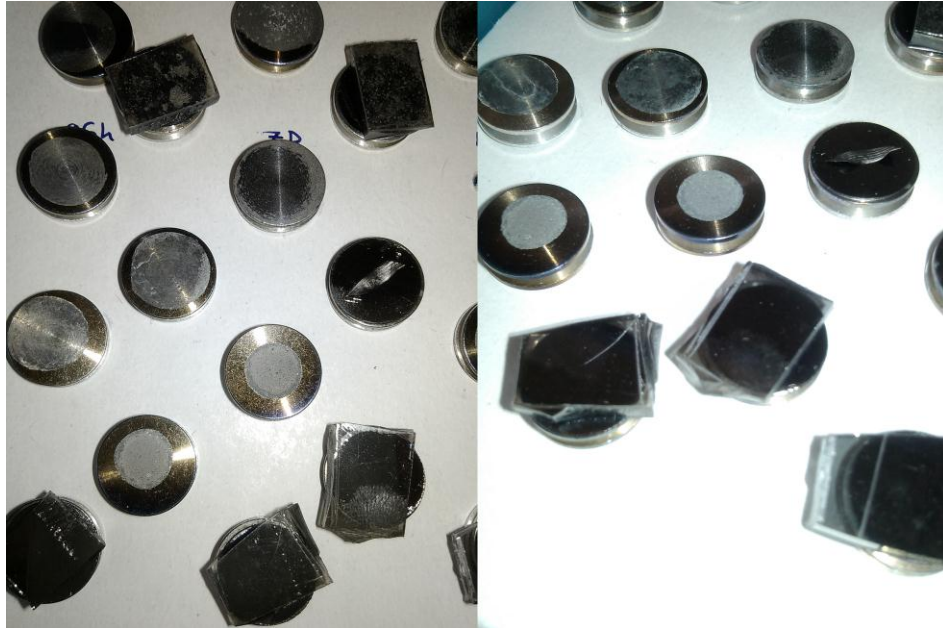
3. Ispiranje kiseline iz uzorka

Nakon hlađenja, uzorak se isprao sa destiliranom vodom više puta (ponavljani postupak opisan gore) sve do pojave pH neutralnog. Skuhani uzorci pohranili su se u epice u hladnjak na $+4\text{ }^\circ\text{C}$ do korištenja za elektronsku mikroskopiju.

Svi očišćeni uzorci u epicama lagano su promiješani i sa kapalicom naneseni na aluminijske nosače za SEM i ostavljeni preko noći da se posuše (Slika 23). Također, mali komadići pleksiglas pločice su zalijepljeni na nosače i skupa sa očišćenim materijalom

Materijali i metode

postavljeni u uređaj za oblaganje zlatom S150A Sputter coater (Edwards Ltd., Crawley, UK). Nakon oblaganja zlatom, svi uzorci su pregledani pod SEM-om (Slika 24) kako bi se utvrdila taksonomska zajednica i slijed sukcesije na počice.



Slika 23. Aluminijski nosači sa nakapanim, osušenim uzorcima i komadićima pleksiglas pločica obloženim zlatom



Slika 24. SEM Philips 515 SEM (FEI Co.)

2.7. Tekuća kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracija fitoplanktonskih pigmenata izmjerena je metodom tekuće kromatografije visokog učinka (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*). Uzorci morske vode za analizu pigmenata volumena 1 L profiltrirani su preko filtera sa staklenim vlaknima veličine pora 0,7 μm (GF/FWhatman). Do ekstrakcije, filteri su pohranjeni u tekućem dušiku. Sadržaj filtera je tijekom analize u laboratoriju ekstrahiran u 4 ml hladnog 90%-tnog acetona pomoću ultrazvučne šipke, u trajanju od 1 minute te centrifugiran 10 minuta na 4000 okretaja. Supernatant je prebačen u čistu smeđu staklenu bočicu ipohranjen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do kromatografske analize. Neposredno prije analize na instrumentu ekstrakt je pomiješan u omjeru 1:1 s 1 M amonijevim acetatom i 500 μl pripremljene otopine injektirano je u HPLC sustav preko injektorske petlje volumena 200 μl . Za samu analizu korištena je kolona Thermo Hypersil MOS2,C-8, sa 120 Å porama, veličine 150 x 4,6 mm (Thermo Hypersil-Keystone). Pigmenti su razdvojeni pri brzini toka od 1 mL min^{-1} koristeći program linearnog gradijenta u trajanju od 40 min. Otopina A sastojala se od metanola i 1 M amonijevog acetata u omjeru 70:30, a otopina B od 100%-tnog metanola. Klorofili i karotenoidi detektirani su absorbancijom od 440 nm (Spectra System, Model UV 2000). Kvalitativna i kvantitativna analiza pigmenata provedena je vanjskom standardnom kalibracijom pomoću autentičnih standarda (VKI, Danska).

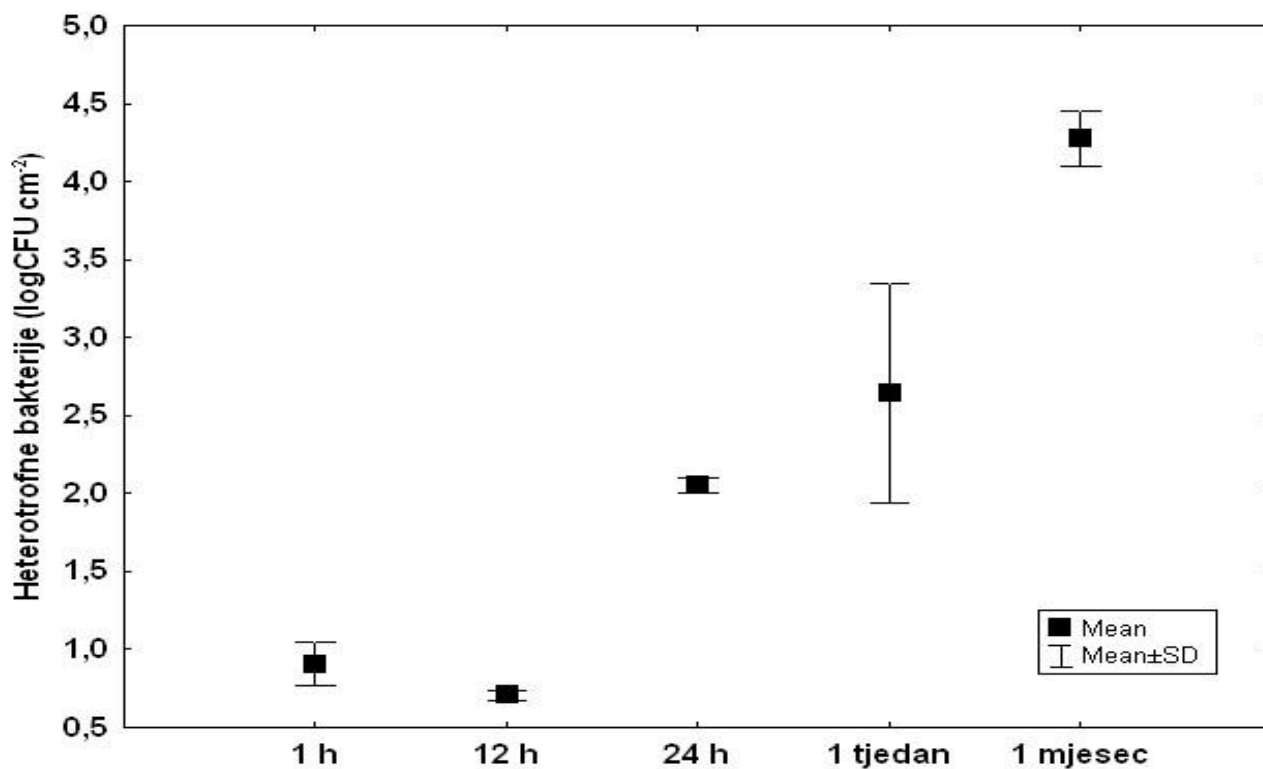
Materijali i metode

Tablica 2. Popis materijala i metoda. "-" – uzorak nije uzet ili je izgubljen; Analiza obraštaja i analiza fitoplanktona – kvantitativna metoda po Utermöhlju (1958); Određivanje broja bakterija sa DAPI - epifluorescencijska metoda prebrojavanja bakterijskih stanica; Direktna analiza podloge – epifluorescencijska i elektronska mikroskopija osušenih ploča; Određivanje ukupnog broja bakterija – nacjeppljivanje na selektivne podloge i prebrojavanje poraslih kolonija; SEM – kvalitativna taksonomska analiza skenirajućom elektronskom mikroskopijom; HPLC – analiza pigmenata metodom tekuće kromatografije visokog učinka

EKSPOZICIJA	Analiza obraštaja	Analiza fitoplanktona	Određivanje broja bakterija sa DAPI	Direktna analiza podloge	Određivanje ukupnog broja bakterija	SEM	HPLC
1 h	+	+	+	+	+	+	+
12 h	+	-	+	+	+	+	-
24 h	+	+	+	+	+	+	+
48 h	+	+	+	+	-	+	+
4 dana	+	+	+	+	-	+	+
1 tjedan	+	-	+	+	+	+	+
1 mjesec	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cymodocea nodosa</i>	-	-	-	-	-	+	-

3. Bakteriološka analiza

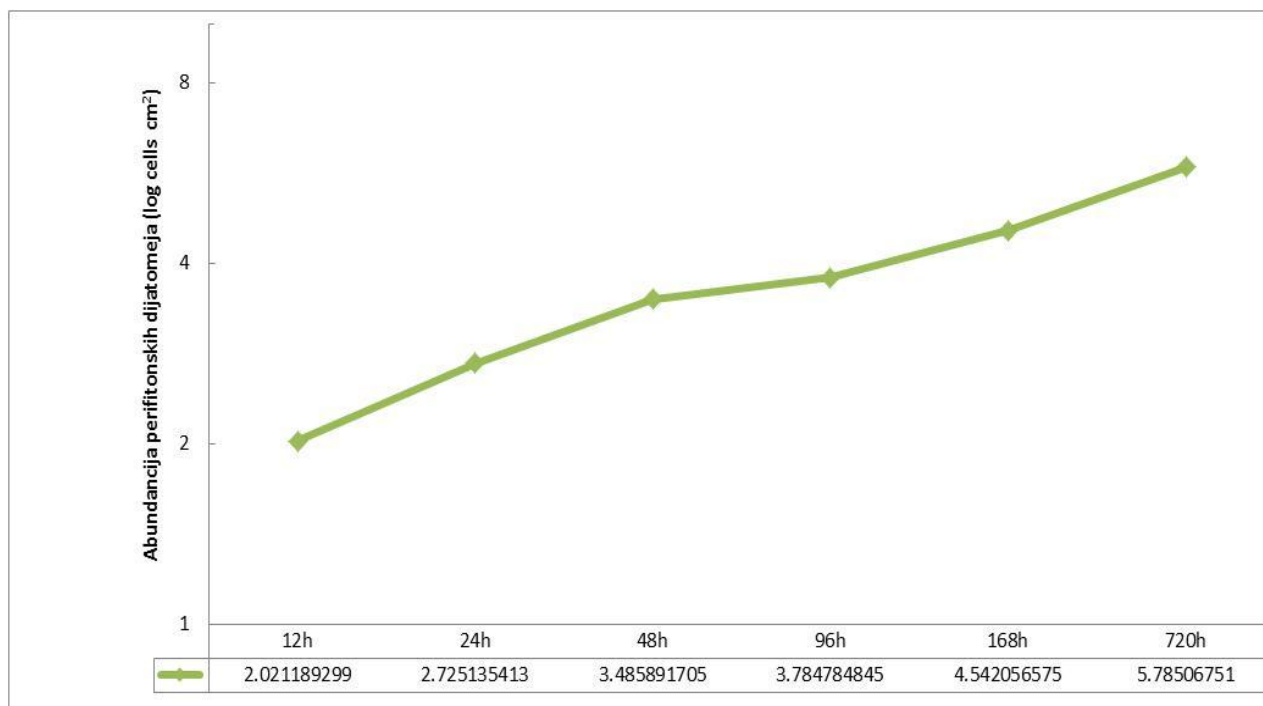
Bakterije porasle na Marine Agar-u dosegle su brojnost $1,96 \pm 0,79 \times 10^4$ CFU cm⁻². Abundancija tijekom mjesec dana ekspozicije prikazana je na slici (Slika 25). Unatoč tome što su fekalni koliformi i intestinalni enterokoki zapaženi u vodenom stupcu na početku eksperimenta (fekalni koliformi 255 ± 78 CFU L⁻¹, intestinalni enterokoki 180 ± 28 CFU L⁻¹), fekalni koliformi uzgajani na podlogama s m-FC agarom nisu narasli niti nakon mjesec dana, dok su se intestinalni enterokoki uzgajani na podlogama sa Slanetz-Bartley agarom nakon mjesec dana pojavili u zanemarivom broju kolonija od 60 ± 10 CFU cm⁻².



Slika 25. CFU cm⁻² heterotrofnih bakterija tijekom mjesec dana ekspozicije; crni kvadrat – srednja brojnost; linije – odstupanje od srednje brojnosti

3.1. Algološka analiza

Perifitonske dijatomeje su također pokazale stabilan rast tijekom mjesec dana ekspozicije. Maksimalna srednja vrijednost abundancije perifitonskih dijatomeja bila je $5,80 \times 10^5$ st. cm^{-2} . Abundancija perifitonskih dijatomeja prikazana je na slici (Slika 26).



Slika 26. Abundancija perifitonskih dijatomeja (log st. cm^{-2}) tijekom ekspozicije od mjesec dana (prikazano u satima 1 – 720); zeleni kvadrati – vrijednosti abundancije pridruženi vremenu ekspozicije; crvena linija – trend rasta

3.1.1. Taksonomska analiza obraštaja svjetlosnom mikroskopijom

Taksonomskom analizom perifitonskih dijatomeja utvrdila se raspodjela vrsta po vremenu ekspozicije (Tablica 3). Pionirskim vrstama su se pokazale *Cylindrotheca closterium*, *Dactyliosolen fragilissimus*, *Diploneis bombus*, *Nitzschia longissima*, *Proboscia alata* te grupa *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* "sensu lato", a slijedile su ih *Thalassionema*

Rezultati

nitzschioides, *Leptocylindrus danicus*, *Microtabella interrupta*, *Pleurosigma angulatum*, *Licmophora* sp. i *Melosira nummuloides*. Najveću abundanciju pokazala je vrsta *Cylindroteca closterium* ($5,5 \times 10^4$ st cm^{-2}). Najabundantnije perifitonske dijatomeje bile su *Licmophora* sp. ($3,7 \times 10^4$ st. cm^{-2}) i *Cylindroteca closterium* ($5,5 \times 10^4$ st. cm^{-2}).

Tablica 3. Vrste perifitonskih dijatomeja po vremenu ekspozicije (h - sati). U poljima je prikazana abundancija pojedine vrste (broj st. cm^{-2}).

Vrsta	Ekspozicija						
	1 h	12 h	24 h	48 h	96 h	168 h	720 h
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i> (Bergon) Hasle	2						
<i>Cylindroteca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin	16		60	115	150	7230	55760
<i>Diploneis bombus</i> Ehrenberg	2						
<i>Leptocylindrus danicus</i> Cleve				26			
<i>Licmophora</i> sp.						1430	37170
<i>Melosira nummuloides</i> C.Agardh							700
<i>Microtabella interrupta</i> (Ehrenberg) Round					200		90
<i>Nitzschia longissima</i> (Brébisson) Ralfs	16				25	30	
<i>Pleurosigma angulatum</i> (Quekett) W. Smith				2			
<i>Proboscia alata</i> (Brightwell) Sundström	65			30	25		
<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> "sensu lato"	200		160	140		180	
<i>Thalassionema nitzschioides</i> (Grunow) Mereschkowsky		25	80	520	780	250	
Neidentificirane penatne dijatomeje	310	50	225	2230	4900	25720	515810

3.1.2. Taksonomska analiza obraštaja elektronskom mikroskopijom

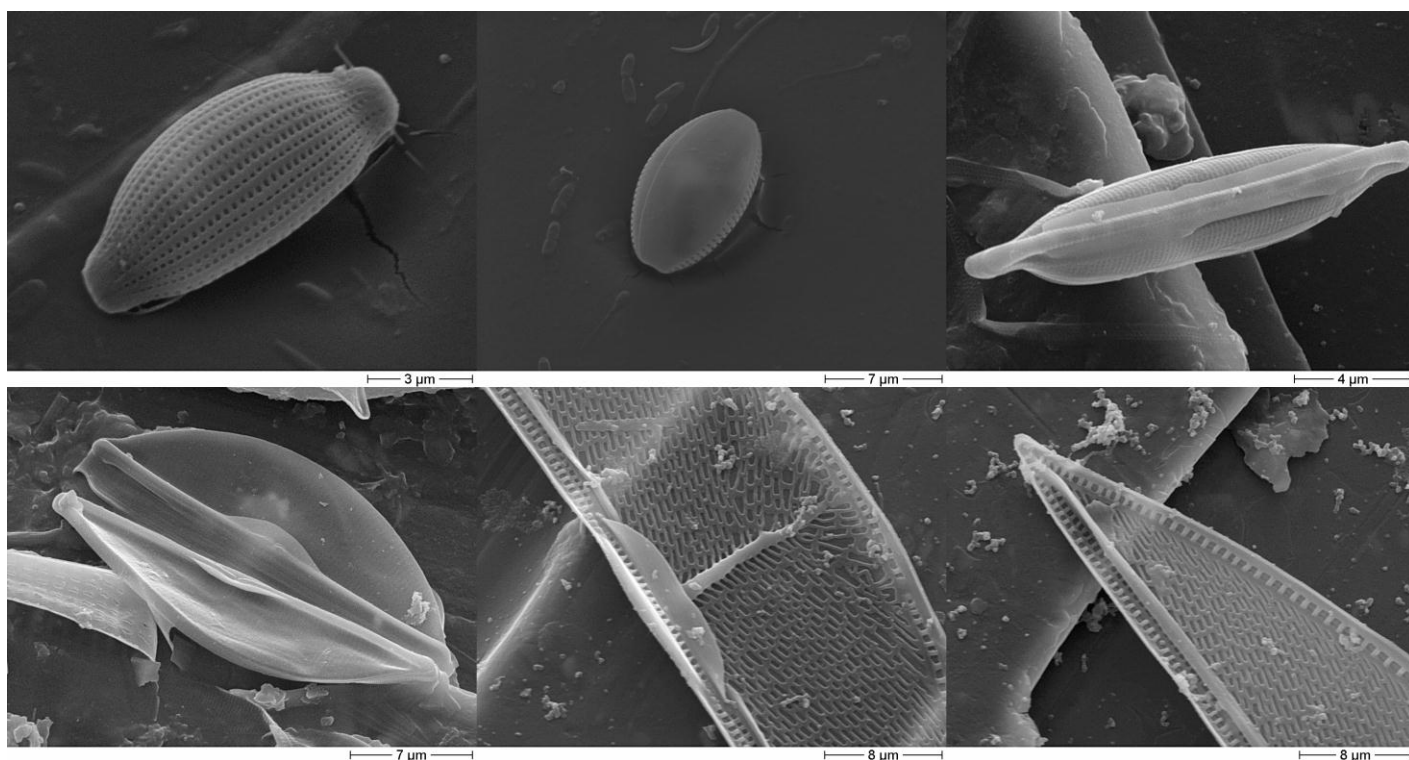
Kvalitativnom analizom je sveukupno utvrđeno 30 svojiti perifitonskih dijatomeja od kojih su tri svojite (*Achnanthes* sp., *Cyclophora* sp. te *Microtabella interrupta* zabilježene samo analizom cvjetnice *Cymodocea nodosa* (Tablica 4). Dominantne vrste u obraštaju bile su *Amphora ovalis*, *Navicula* sp. i *Thalassiosira* sp. (Slike 27 - 29) sa frekvencijom pojavljivanja 71,42%, potom *Amphora* sp. (42,85%), *Licmophora* sp. (42,85%), *Mastogloia* sp. (42,85%), *Proschkinia bulnheimii* (42,85%), *Thalassionema nitzschioides* (42,85%), *Cyclotella* sp. (42,85%).

Tablica 4. Taksonomski sastav perifitonskih dijatomeja analiziran SEM-om; Vrijeme ekspozicije prikazano je u satima (h) (1-96) te 1 tjedan i 1 mjesec; fr – frekvencija pojavljivanja svojiti (nalazi za cvjetnicu *C. nodosa* su izuzeti iz računanja frekvencije)

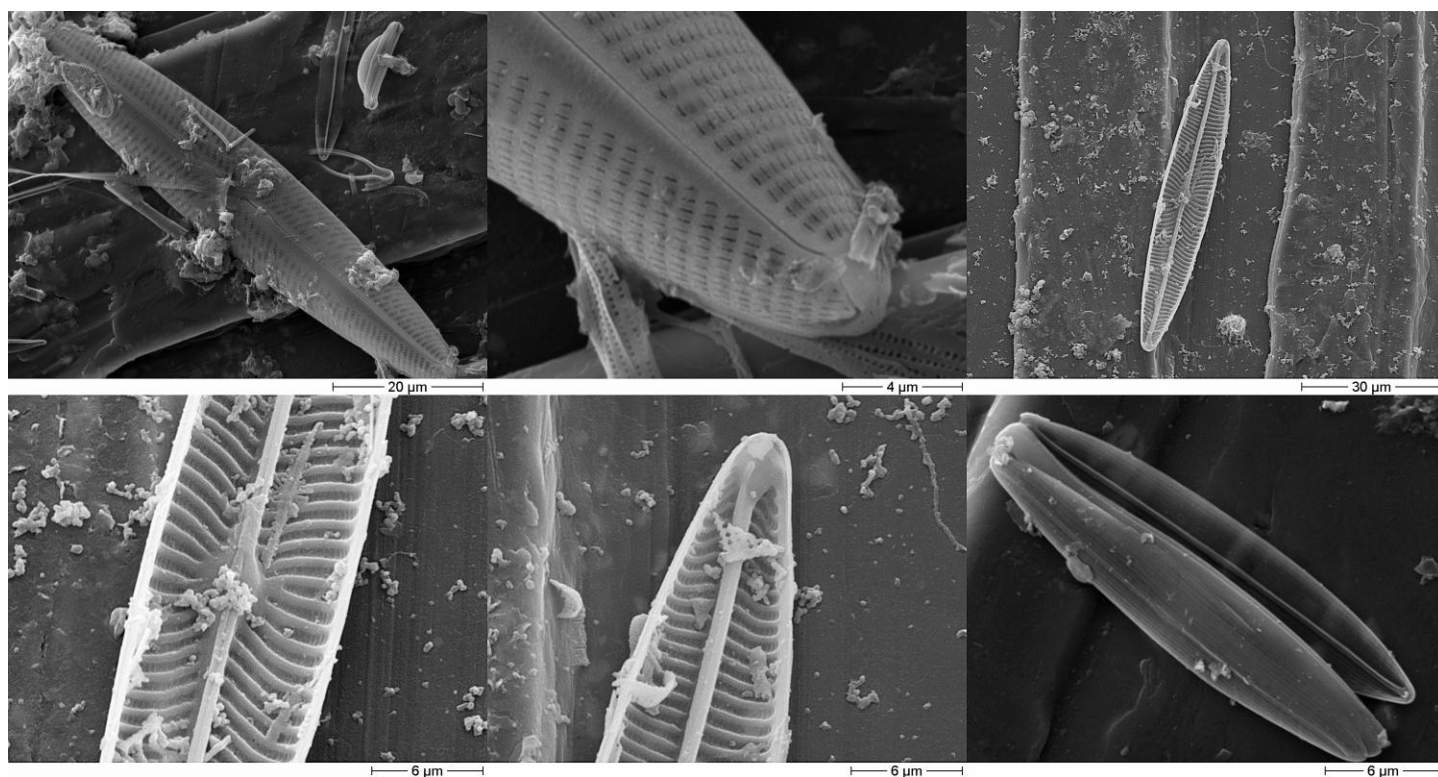
Svojta	Ekspozicija							<i>C. nodosa</i>	fr (%)
	1 h	12 h	24 h	48 h	96 h	1 tjedan	1 mjesec		
<i>Achnanthes</i> sp.								*	0
<i>Amphora coffeaeformis</i> Cleve	*				*	*	*	*	57
<i>Amphora ovalis</i> (Kützing)			*	*	*	*	*	*	71
Kützing									
<i>Amphora</i> sp.					*	*	*	*	43
<i>Bacteriastrum</i> sp.							*		
<i>Cocconeis</i> sp.					*	*		*	29
<i>Cyclophora</i> sp.								*	0
<i>Cyclophora tenuis</i> Castracane						*			14
<i>Cyclotella</i> sp.	*			*			*		43
<i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin						*	*		29
<i>Diploneis bombus</i> Ehrenberg							*		14
<i>Diploneis</i> sp.					*	*	*		43
<i>Fallacia</i> sp.							*		14
<i>Gomphonema</i> sp.							*		14
<i>Grammatophora marina</i> (Lyngbye) Kützing							*		14
<i>Licmophora flabellata</i> (Grev.) C.Agardh							*		14
<i>Licmophora</i> sp.					*	*	*		43
<i>Mastogloia</i> sp.	*				*		*	*	43

Rezultati

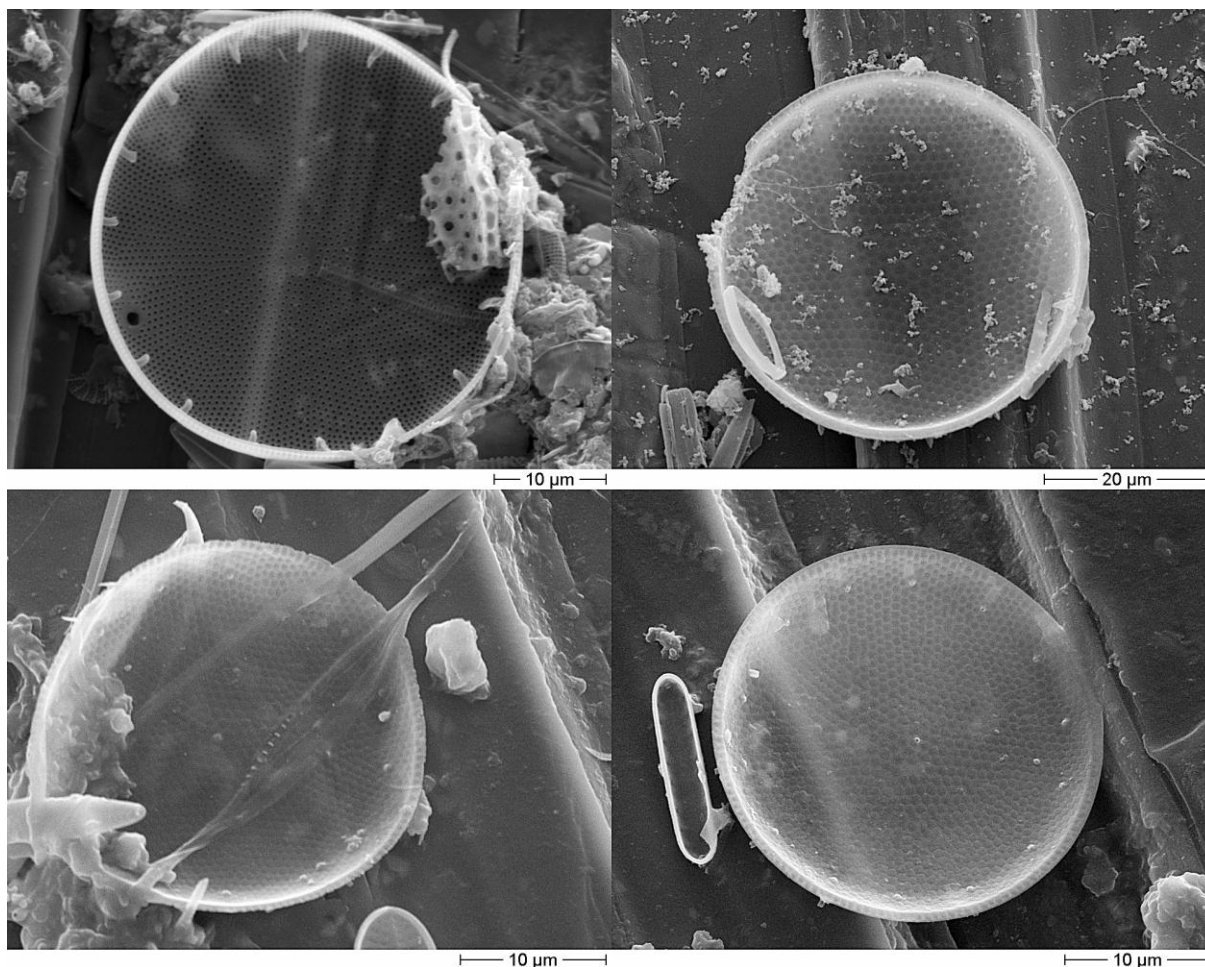
Svojtá	Ekspozicija						C. nodosa	fr (%)
	1 h	12 h	24 h	48 h	96 h	1 tjedan		
<i>Mastogloia undulata</i> Grunow							*	14
<i>Microtabella interrupta</i> (Ehrenberg) Round							*	0
<i>Navicula</i> sp.	*			*	*	*	*	71
<i>Nitzchia</i> sp.			*			*	*	29
<i>Paralia sulcata</i> (Ehrenberg) Cleve	*							14
<i>Pleurosigma angulatum</i> (Quekett) W. Smith							*	14
<i>Proschkinia bulnheimii</i> (Grunow) Karayeva					*	*	*	43
<i>Psammodictyon mediterraneum</i> (Hustedt) D.G.Mann						*	*	29
<i>Rhizosolenia</i> sp.	*							14
<i>Thalassionema nitzschioides</i> (Grunow) Mereschkowsky			*		*		*	43
<i>Thalassiosira</i> sp.	*	*	*		*		*	71
<i>Triceratium</i> spp.	*							14
Total: 30 taxa								



Slika 27. Ljušturice vrste *Amphora ovalis* snimljene SEM-om



Slika 28. Ljušturice svoje *Navicula* sp. snimljene SEM-om



Slika 29. Ljušturice svoje *Thalassiosira* sp. snimljene SEM-om

3.2. Fitoplankton

Svjetlosnom mikroskopijom utvrđene su 24 dominantne vrste skupine Bacillariophyceae, 6 dominantnih vrsta skupine Dinophyceae te skupine Cryptophyceae i nano Chlorophyceae (Tablica 5). Sastav fitoplanktona kroz period ekspozicije bio je relativno stalan sa dominantnom grupom *Pseudo nitzschia pseudodelicatissima* "sensu lato" čija je najveća abundancija bila 7. listopada 2013. godine ($10,2 \times 10^4$ st. L⁻¹).

Tablica 5. Taksonomski sastav fitoplanktona u uvali Val de Lesso kod Rovinja u periodu od 9. rujna do 7. listopada 2013. godine. Abundancija vrsta prikazana je u poljima (broj st. L⁻¹); ekspozicija prikazana u satima (1-720).

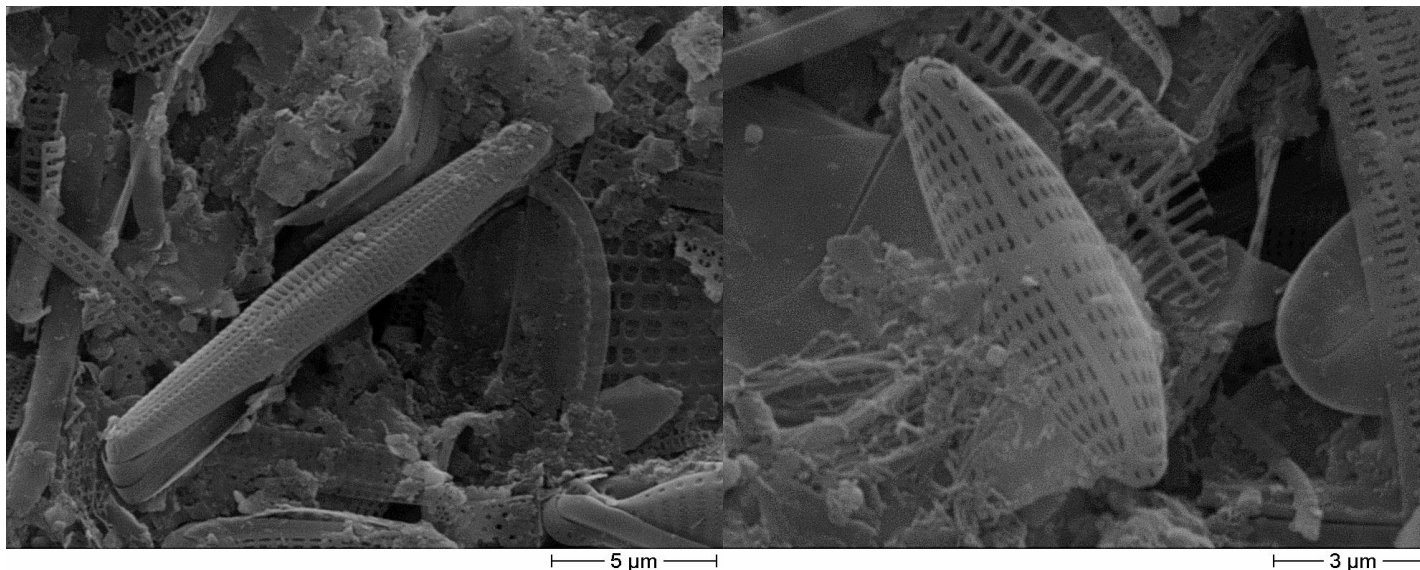
Vrsta	Ekspozicija				
	1 h	24 h	48 h	96 h	720 h
Bacillariophyceae					
<i>Achnantes</i> sp.	760	380			
<i>Amphora</i> sp.			380		
<i>Bacteriastrum jadranum</i> Godrijan, Maric & Pfannkuchen					4180
<i>Chaetoceros contortus</i> F.Schütt					3420
<i>Chaetoceros danicus</i> Cleve					5320
<i>Chaetoceros</i> sp.			380		
<i>Chaetoceros vixvisibilis</i> Schiller					7600
<i>Cyclotella</i> sp.	380				
<i>Cyclotella choctawhatcheeana</i> Prasad			3040		
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i> (Bergon) Hasle	4180	1140	2660	380	4940
<i>Detonula</i> sp.			380		
<i>Cylindroteca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin	2280	380			
<i>Diploneis bombus</i> Ehrenberg	380		380		
<i>Guinardia flaccida</i> (Castracane) Peragallo			760		
<i>Guinardia striata</i> (Stolterfoth) Hasle			120		1520
<i>Hemiaulus hauckii</i> Grunow	380				
<i>Leptocylindrus danicus</i> Cleve	1520	2280	3040	760	5320
<i>Lioloma pacificum</i> (Cupp) Hasle					9880
<i>Microtabella interrupta</i> (Ehrenberg) Round			80		
<i>Nitzschia longissima</i> (Brébisson) Ralfs	760		380		
<i>Pleurosigma</i> sp.		380	760		380
<i>Proboscia alata</i> (Brightwell) Sundström	1520	1520	760	4180	1140
<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> "sensu lato"	12540	24700	17480	44460	102220
<i>Rhizosolenia imbricata</i> Brightwell	380				
<i>Thalassiosira</i> sp.			760		
Neidentificirane penatne dijatomeje	180855	45931	120570	8360	
Dinophyceae					
<i>Ceratium maseliense</i> (Gourret) E.G.Jørgensen			760	380	
<i>Ceratium tripos</i> (Müller) Nitzsch		1520			
<i>Hermesinum adriaticum</i> Zacharias	40	380	40		
<i>Ostreopsis</i> sp.	380				
<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	4560		380		
Neidentificirane vrste skupine Dinophyceae				380	
Chryptophyceae					
Neidentificirane Chryptophyceae	14200	1419	8514	12771	2127
Chlorophyceae					
Neidentificirane nano Chlorophyceae	5676	1419	1419		

3.3. Morska cvjetnica *Cymodocea nodosa*

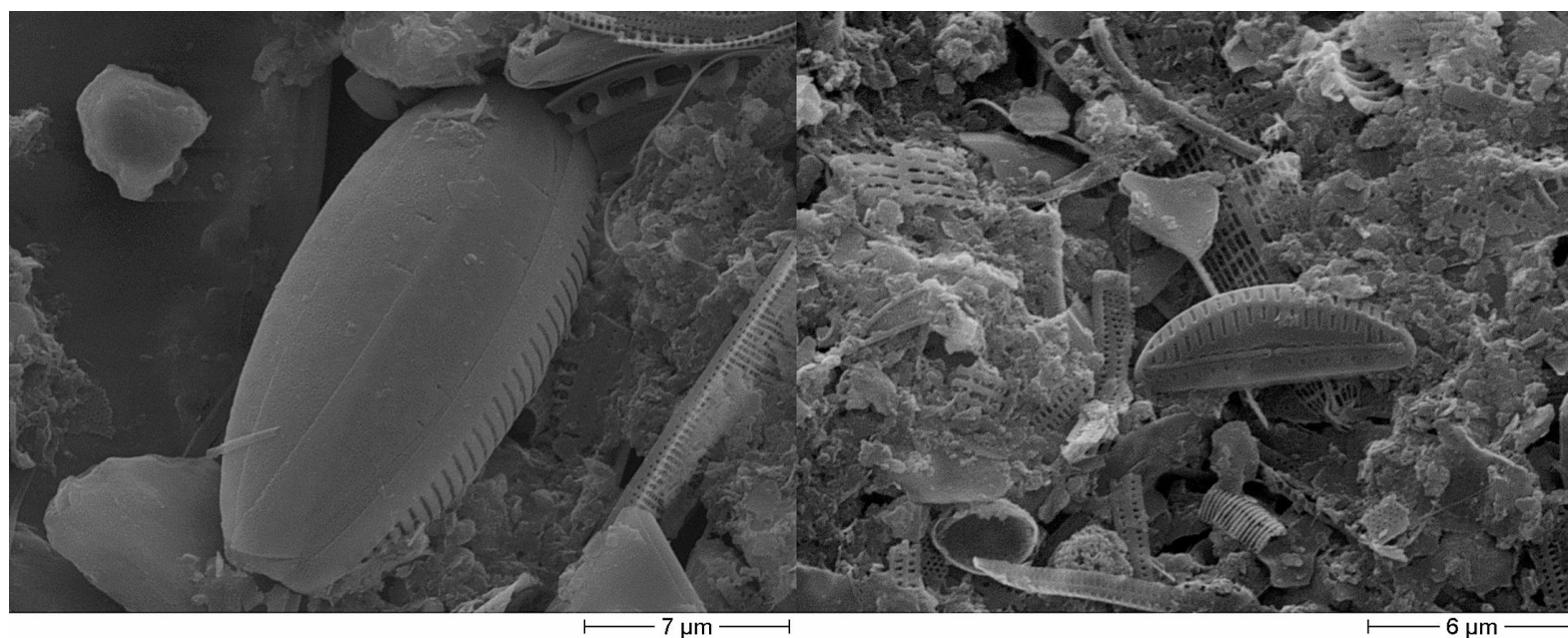
Kvalitativnom analizom stabilne zajednice perifitonskih dijatomeja na listovima cvjetnice *Cymodocea nodosa* pronađeno je ukupno 11 svojti (Tablica 6). Dominantne vrste bile su *Amphora ovalis*, *Cyclophora* sp., *Navicula* sp. te *Proschkinia bulnheimii* (Slike 30 - 33).

Tablica 6. Taksonomski sastav perifitonskih dijatomeja na cvjetnici *Cymodocea nodosa*

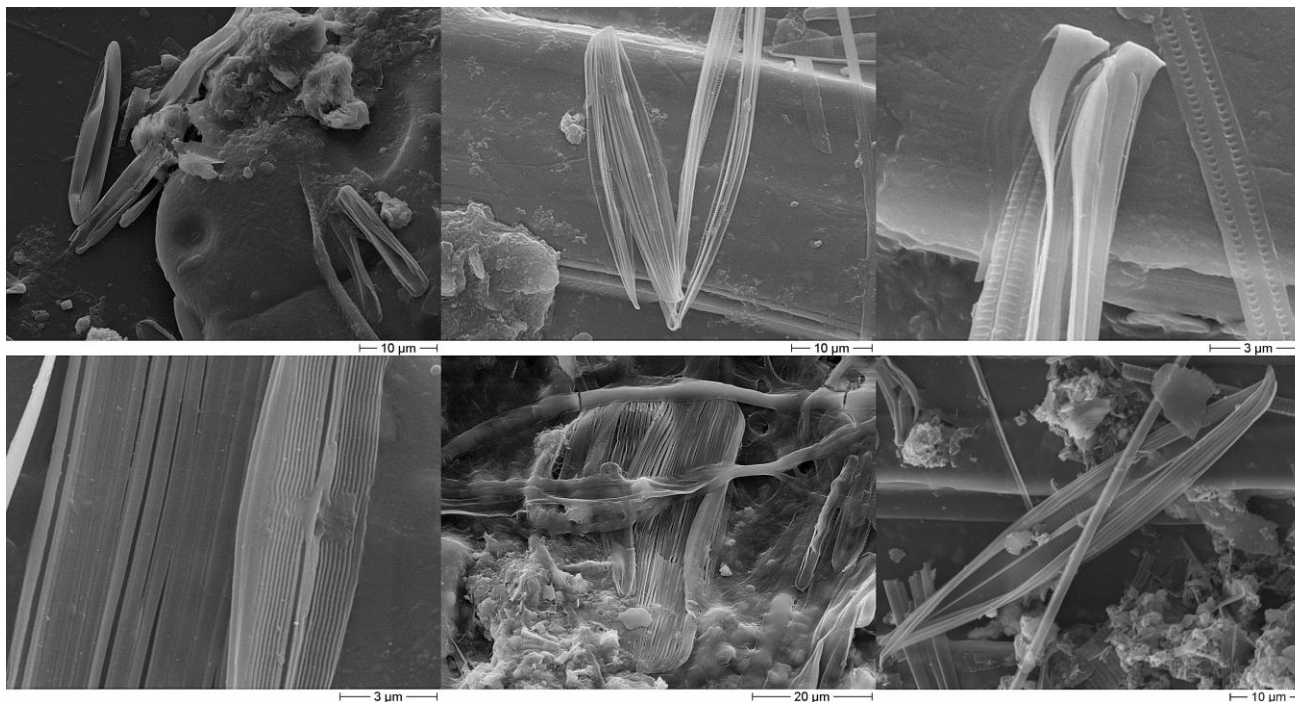
Vrsta	Cvjetnica <i>Cymodocea nodosa</i>
<i>Achnanthes</i> sp.	*
<i>Amphora coffeaeformis</i> Cleve	
<i>Amphora ovalis</i> (Kützing) Kützing	*
<i>Amphora</i> sp.	*
<i>Bacteriastrum</i> sp.	
<i>Caloneis alpestris</i> (Grunow) Cleve	
<i>Cocconeis</i> sp.	*
<i>Cyclophora</i> sp.	*
<i>Cyclophora tenuis</i> Castracane	
<i>Cyclotella</i> sp.	
<i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin	
<i>Diploneis</i> sp.	
<i>Fallacia</i> sp.	
<i>Gomphonema</i> sp.	
<i>Grammatophora</i> sp.	
<i>Licmophora</i> sp.	
<i>Mastogloia</i> sp.	*
<i>Microtabella interrupta</i> (Ehrenberg) Round	*
<i>Navicula</i> sp.	*
<i>Nitzchia</i> sp.	*
<i>Paralia sulcata</i> (Ehrenberg) Cleve	
<i>Pleurosigma</i> sp.	
<i>Proschkinia bulnheimii</i> (Grunow) Karayeva	*
<i>Psammodictyon mediterraneum</i> (Hustedt) D.G.Mann	*
<i>Rhizosolenia</i> sp.	
<i>Thalassionema nitzschioides</i> (Grunow) Mereschkowsky	
<i>Thalassiosira</i> sp.	
<i>Triceratium</i> spp.	



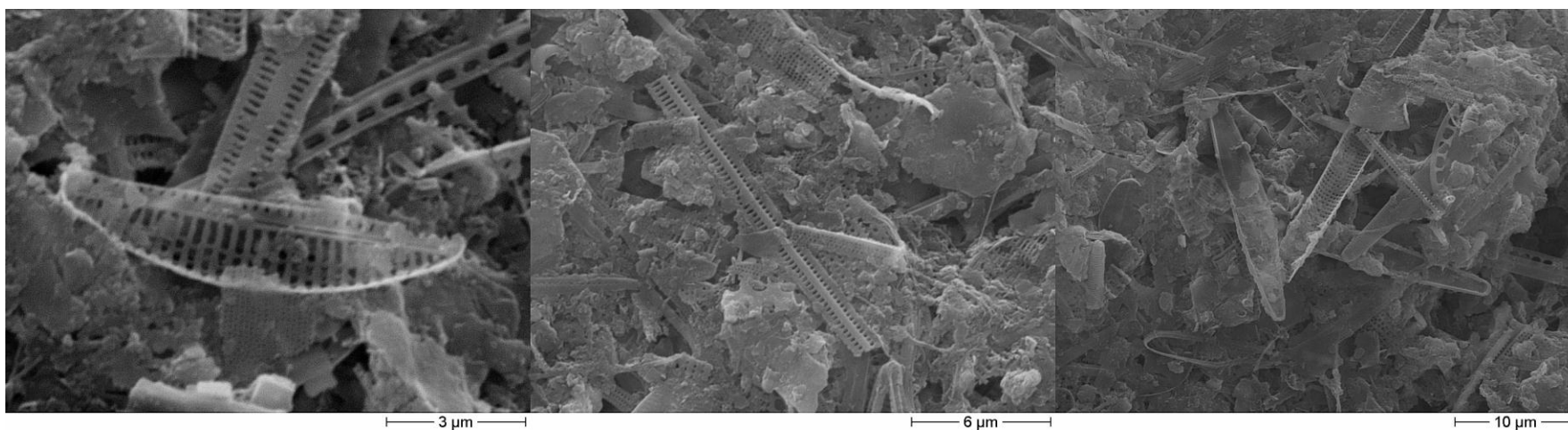
Slika 30. Ljušturice vrste *Navicula* sp. snimljene SEM-om



Slika 31. Ljušturice vrste *Amphora ovalis* snimljene SEM-om



Slika 32. Ljušturice vrste *Proschkinia bulnheimii* snimljene SEM-om



Slika 33. Ljušturice vrste *Cyclophora* sp. snimljene SEM-om

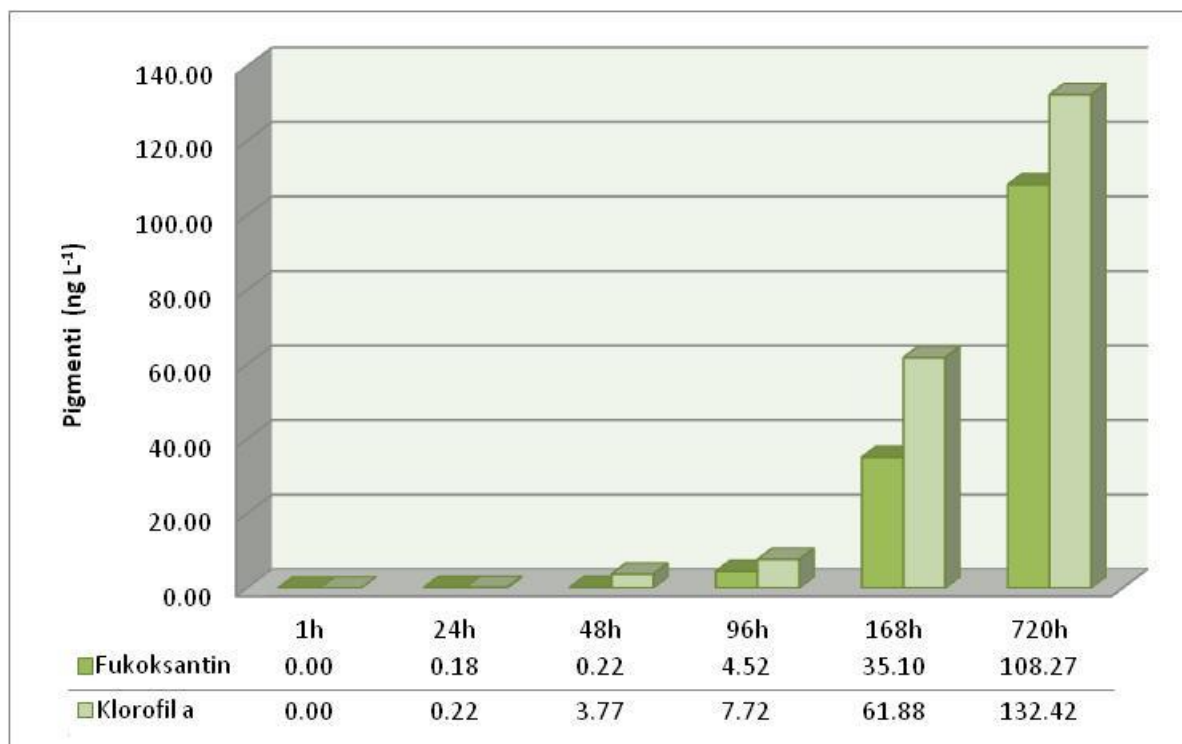
3.4. Kemotaksonomija

HPLC analizom pigmenata obraštaja utvrdilo se 10 različitih pigmenata koji pripadaju različitim skupinama: peridinin, diadinoksantin, butinin (Dinophyceae), klorofil *a* (Chl *a*), klorofil *c* (Chl *c*), fukoksantin, heksanoiloksifukoksantin, zeaksantin, β -karoten (Bacillariophyceae) te prasinoksantin (Prasinophyceae). Tijekom ovog istraživanja klorofil *c*, prasinoksantin i zeaksantin detektirani su tek nakon 96 sati ekspozicije što je u korelaciji sa pojavljivanjem cijanobakterija na pločama tek nakon prvog tjedna. Klorofil *a*, fukoksantin i peridinin od početka dominiraju što indicira na dijatomeje i dinoflagelate kao primarne kolonizatore (Tablica 7).

Tablica 7. HPLC analiza pigmenata (ng cm^{-2}); ekspozicija je prikazana u satima (1-720); vrijednosti koncentracije pigmenata su u poljima

Pigmenti	Ekspozicija					
	1h	24h	48h	96h	168h	720h
Peridinin	0,00	4,47	39,44	31,81	18,10	8,68
Butinin	0,00	0,46	4,11	3,57	1,64	0,81
Fukoksantin	0,00	0,18	0,22	4,52	35,10	108,27
Heksanoilfukoksantin	0,00	0,00	0,57	0,11	0,31	0,00
Prasinoksantin	0,00	0,00	0,25	0,41	4,05	4,29
Diadinoksantin	0,00	0,00	0,25	0,41	4,05	4,29
Zeaksantin	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	2,84
Klorofil <i>a</i> (Chl <i>a</i>)	0,00	0,22	3,77	7,72	61,88	132,42
Klorofil <i>c</i> (Chl <i>c</i>)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	32,78
β -karoten	0,00	0,00	0,00	0,89	7,03	14,68

Najveću koncentraciju imali su klorofil *a* i fukoksantin, karakteristični pigmenti skupine Bacillariophyta. Odnos dvaju potonjih prikazan je slikom (Slika 34). Klorofil *a* je nakon mjesec dana dostigao koncentraciju 132,42 ng cm⁻², dok je fukoksantin dostigao 108,27 ng cm⁻².



Slika 34. Koncentracije pigmenata klorofila *a* i fukoksantina (ng cm⁻²); legenda prikazuje točne koncentracije fukoksantina i klorofila *a* po vremenu ekspozicije u satima (1-720)

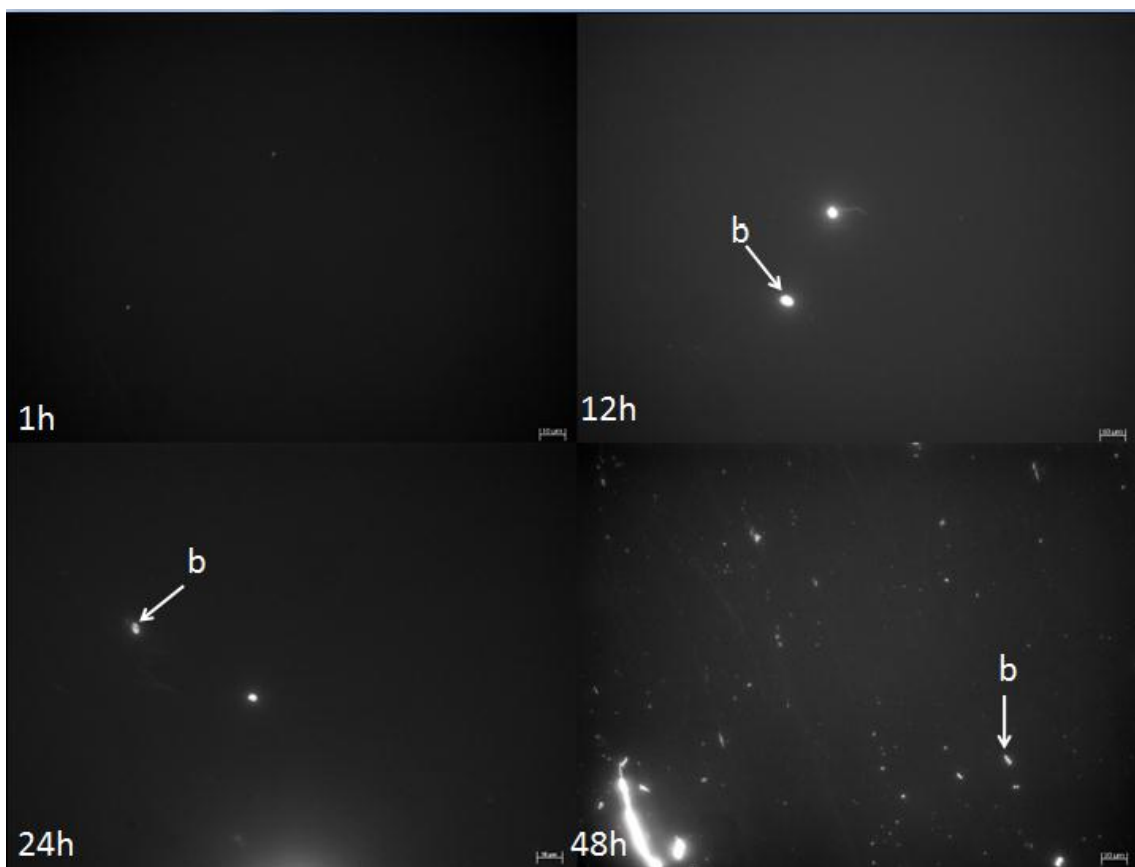
3.5. Direktna analiza podloge

Zbog boljeg uvida u način naseljavanja podloge, pleksiglas pločice su pregledane pod epifluorescencijskim mikroskopom i skenirajućim elektronskim mikroskopom. Tijekom razvijanja biofilma neki dijelovi površine su ostali nenaseljeni, dok se na drugima razvijao opsežni trodimenzionalni biofilm. Debljina biofilma varira od svega nekoliko mikrometara do par centimetara ovisno o sastavu medija. Također, debljina biofilma nije homogena na svim

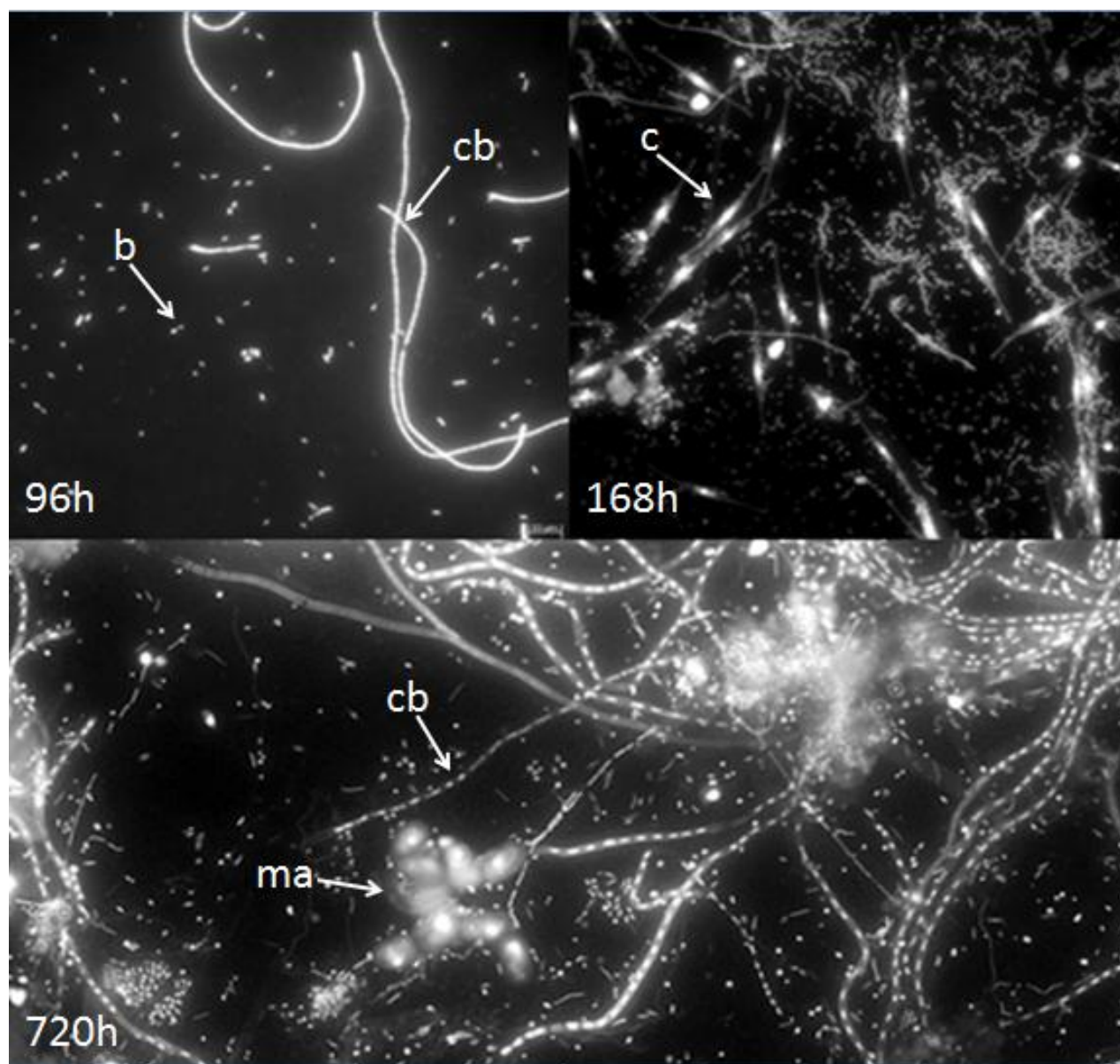
djelovima substrata, pa je dvjema deskriptivnim metodama dobiven bolji redosljed naseljavanja organizama.

Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, pločice su nakapane sa DAPI bojom i pregledane pod epifluorescencijskim mikroskopom. Odabrane slike složene su u kronologiju (slijed naseljavanja) po vremenu ekspozicije (Slika 35, Slika 36).

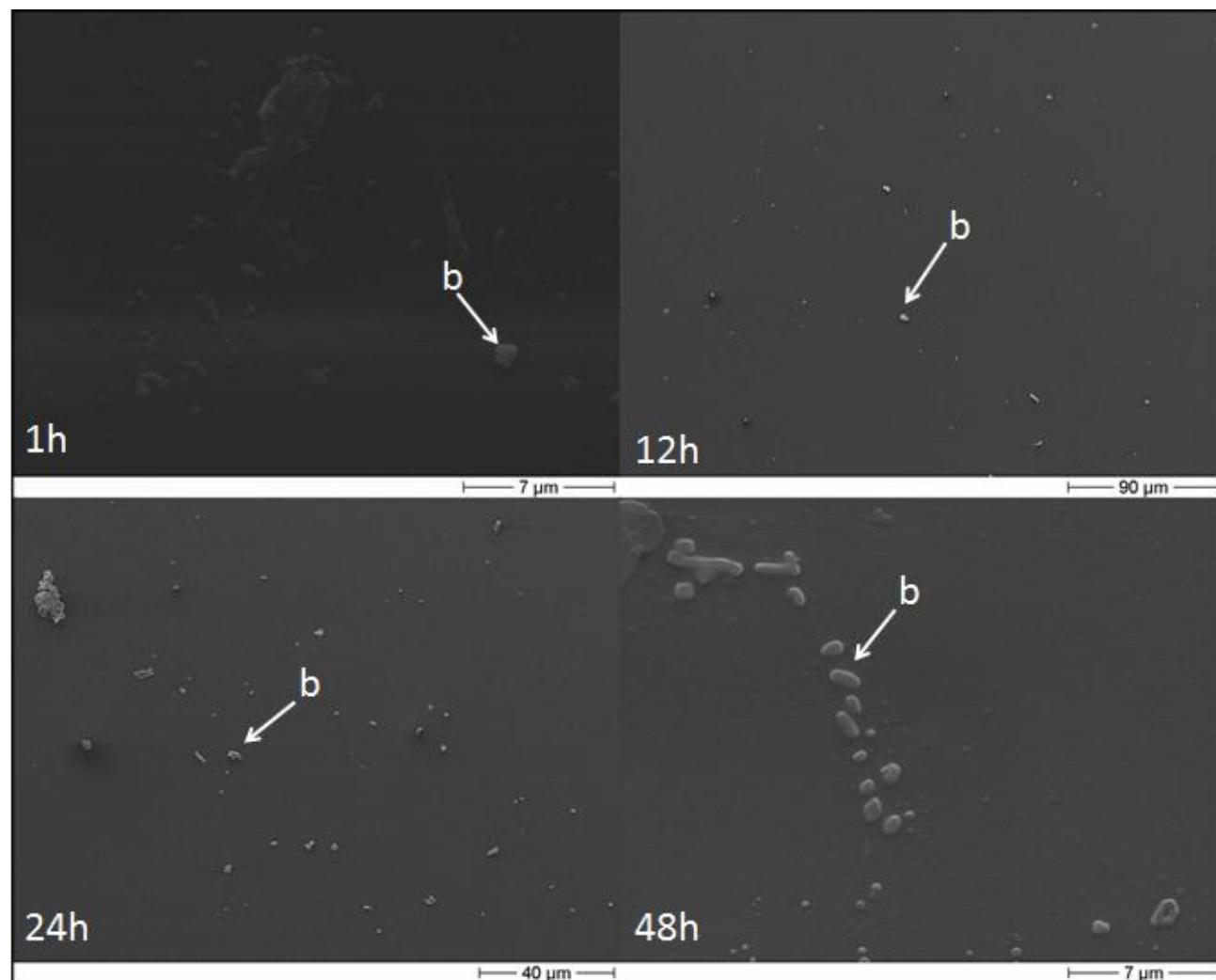
Također, manji komadići osušenih pleksiglas pločice su nakon oblaganja zlatom, pregledani pod SEM-om (Slika 37, Slika 38, Slika 39) kako bi se utvrdio slijed sukcesije na pločice.



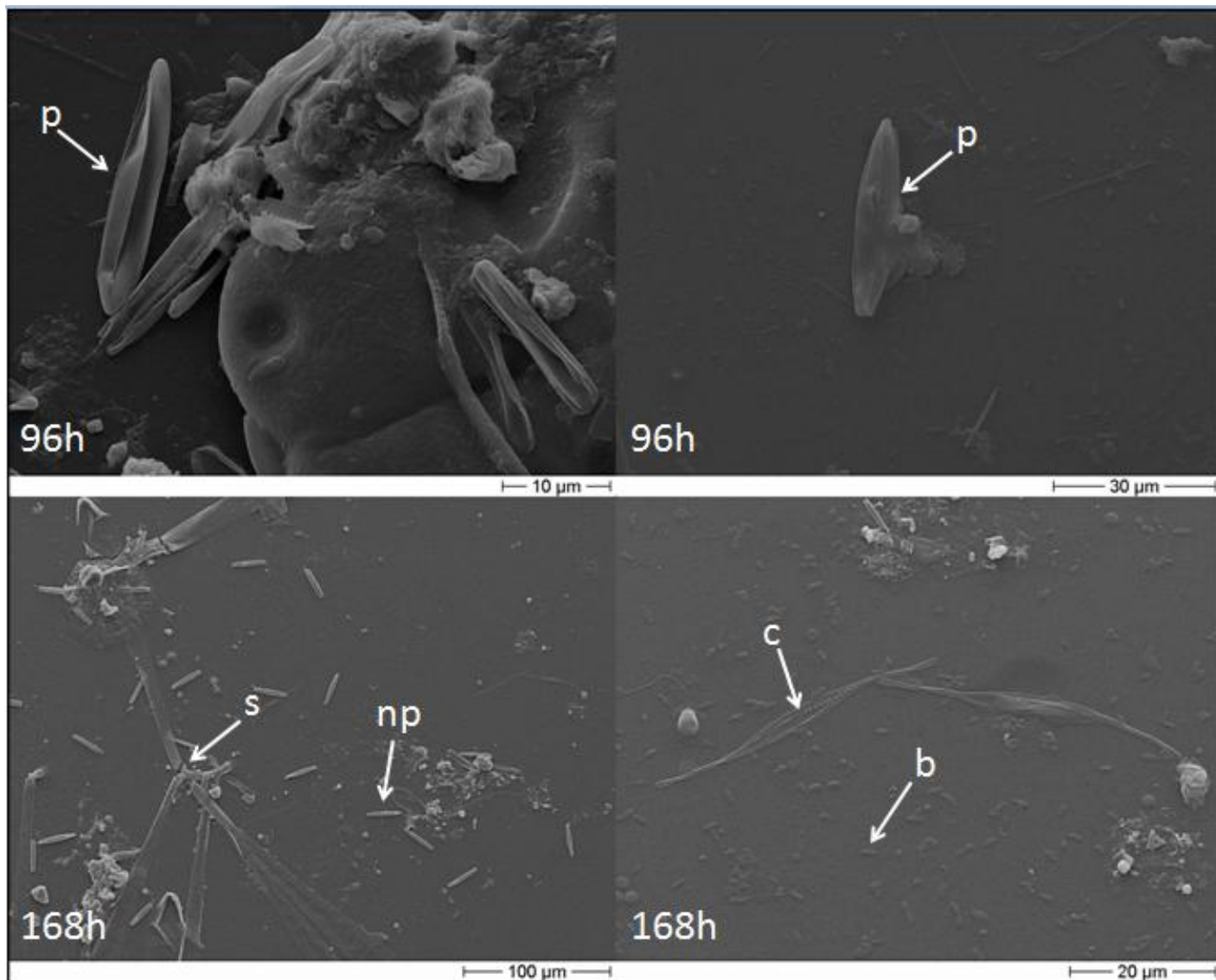
Slika 35. Direktna analiza podloge epifluorescencijskim mikroskopom po vremenu ekspozicije (1 – 48 h); b – bakterijska stanica



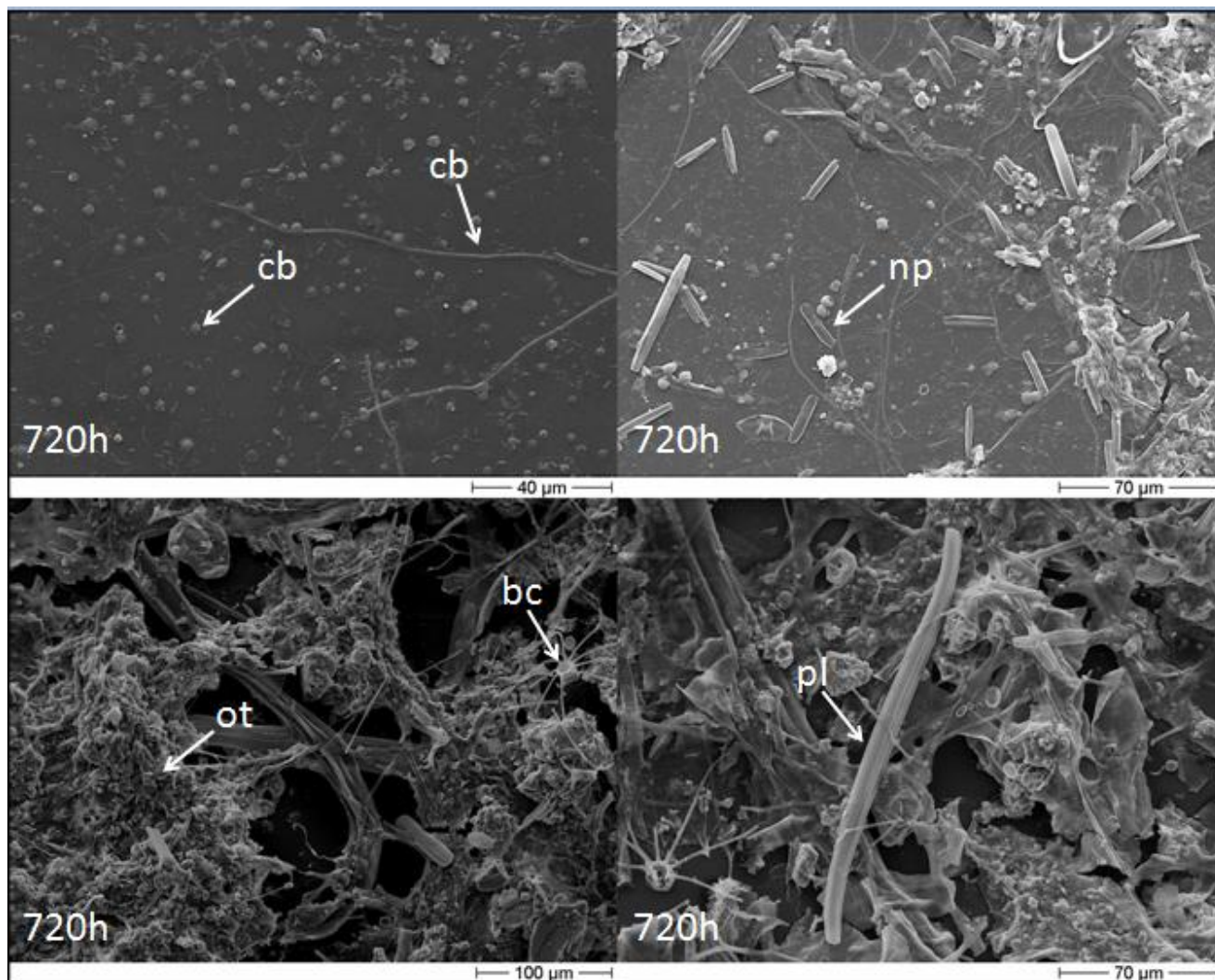
Slika 36. Direktna analiza podloge epifluorescencijskim mikroskopom po vremenu ekspozicije (96 – 720 h); b – bakterijska stanica; cb – lanac cijanobakterija; c – stanica dijatomeje *Cylindrotheca closterium*; ma – makroagregat u trodimenzionalnom biofilmu nakon 720 h kontakta



Slika 37. Direktna analiza podloge elektronskom mikroskopijom po vremenu ekspozicije (1 – 48 h); b – bakterijska stanica



Slika 38. Direktna analiza podloge elektronskom mikroskopijom po vremenu ekspozicije (96 – 168 h); b – bakterijska stanica; p – stanica dijatomeje *Prischkinia bulnheimii*; c – stanica dijatomeje *Cylindrotheca closterium*; np – neidentificirane pentane dijatomeje; s – stalak s kojim se pričvršćuju dijatomeje roda *Licmophora* sp.



Slika 39. Direktna analiza podloge elektronskom mikroskopijom po vremenu ekspozicije (720 h); cb – stanice i lanci cijanobakterija; np – neidentificirane pentane dijatomeje; bc – stanica dijatomeje *Bacteriastrum* sp. zalijepljena u organsku tvar; ot – organska tvar (EPS); pl – stanica dijatomeje *Pleurosigma* sp.

4. Rasprava

Nakon 30 dana ekspozicije umjetnih pleksiglas ploča postavljenih na pet metara dubine u naselje cvjetnice *Cymodocea nodosa* pojavio se sluzavi mukozni biofilm. Biofilm se sastojao od pričvršćenih stanica bakterija, cijanobakterija, dijatomeja, dinoflagelata, zelenih (Chlorophyceae) i smeđih (Phaeophyceae) alga.

Za naseljavanje perifitonskih zajednica Slādečková (1962) upravo preporuča pleksiglas materijal jer je pogodniji od prirodnih substrata. Također, dubina od pet metara osigurala je razvoju biofilma dovoljno svjetlosti, dok utjecaji pridnenih valova te plime i oseke nisu ometali sukcesiju. Istraživanje se olakšalo i odabirom kasnog ljeta/početka jeseni za period ekspozicije jer je temperatura kao bitan čimbenik brzine naseljavanja obraštaja na umjetnim podlogama (Hillebrand i Sommer 1997) bila relativno stalna unutar raspona od 19,90 – 22,20 °C. U istraživanjima perifitonskih alga na prirodnim i umjetnim podlogama dolazi do poteškoća u kvantificiranju površine supstrata te do različitosti i netočnosti u tehnici skidanja obraštaja s podloge, što otežava usporedbu rezultata (Barbiero 2000). Kod umjetnih substrata moguće je izabrati materijal podloge, teksturu i veličinu podloge (Cattaneo i Amireault 1992), a lako rukovanje (Weitzel i sur. 1979) uz mogućnost određivanja lokaliteta i trajanja izloženosti podloge bitno doprinosi kvaliteti proučavanja procesa imigracije, kolonizacije i mjerenja stope rasta. Također, umjetni substrati su kritizirani zbog selektivnosti bentoske mikroflora obzirom na sposobnost pričvršćivanja stanica (Snoeijs 1991).

U ovom istraživanju odabirom pleksiglas ploča kao umjetnog substrata olakšalo se mjerenje površine skidanja obraštaja, omogućilo lakše rukovanje te izbjegla mogućnost pojave organizama koji nisu od interesa za razvoj biofilma. Ploče su se postavile okomito što je pogodnije za istraživanje jer je smanjeno gomilanje mulja i biomasa alohtonih alga u perifitonu (Slādečková 1962). Problem metodologije skidanja obraštaja pojavio se pri kvantitativnoj analizi bakterijskih stanica. Metoda brojanja kolonija na selektivnim pločama dala je vjerodostojnije podatke nego metoda prebrojavanja bakterija putem filtracije na polikarbonatni filter i bojanja sa DAPI. Naime, uzorci obraštaja koji su se filtrirali za epifluorescencijski mikroskop nisu bili

razbijani ultrazvukom u sterilnim uvjetima nego strugani sa četkicom u nesterilnim uvjetima što je rezultiralo krivim podacima.

Danas se smatra da je mnoštvo čimbenika koji su uključeni u procese naseljavanja, uključujući i strukturu površine, maseni transport, površinski naboj, hidrofobnost, hrapavost površine i površinski mikro - reljef (Palmer i sur. 2007). Nalaz koji upućuje da su fekalni koliformi i intestinalni enterokoki zabilježeni u stupcu vode, ali ne u biofilmu mogu se objasniti s kemijskim sastavom, hrapavosti i mikro - topografiji pleksiglas ploča. Za koliforme se zna da nastanjuju mješovite zajednice biofilma u vodenim staništima (Camper i sur. 1996). U laboratorijskim uvjetima pričvršćivanje i ostanak koliforma u mješovitim biofilmovima na polikarbonatnim površinama uvelike ovisi o stopi rasta inokuluma i vrsti podloge. Pronađen je značajno veći broj heterotrofa i koliforma na čeliku (reaktivna površina) nego na polikarbonatu (inertna površina) (Camper i sur. 1996.) Bakterije, uključujući i koliforme, koji se u početku uspješno naseljavaju podloge, mogu se lako prilagoditi uvjetima u kojima su hranjive soli u niskim koncentracijama (more) (Camper i sur. 1996, Kurath i Morita 1983; Novitsy i Morita, 1978). Prema tome, izostanak fekalni koliformi i intestinalnih enterokoka u biofilmu u eksperimentu je vjerojatno zbog izbora podloge; navedene vrste nisu u stanju se na početku pričvrstiti na površinu inertnog pleksiglasa i nastaviti rast u biofilmu.

U prvom tjednu sukcesije kao bitan čimbenik ističu se jačina i smjer vjetra dan prije (SSW, 3) i na sam dan postavljanja eksperimenta (SSE, 4) jer su doprinijeli miješanju vodenog stupca i pojavljivanju više planktonskih vrsta dijatomeja među pionirskim vrstama na pločama kao što su *Dactyliosolen fragilissimus*, *Nitzschia longissima*, *Proboscia alata*, grupa *Pseudonitzschia pseudodelicatissima* "sensu lato", *Thalassionema nitzschioides*, *Leptocylindrus danicus*, *Melosira nummuloides*. Što je više sukcesija odmicala, planktonske vrste zamijenjene su penatnim bentoskim dijatomejama koje su eksponencionalno povećavale svoju abundanciju. Nakon 30 dana ekspozije perifitnsku zajednicu su činile dijatomeje *Licmophora* sp, *Cylindrothoea closterium*, *Microtabella interrupta* i visoki udio neidentificiranih stanica dijatomeja. Taksonomski sastav i brojnost perifitonskih dijatomeja u ovom istraživanju potvrđuje dosadašnja istraživanja rađena u sjevernom Jadranu. Prema DeNicola i McIntyre 1990 među najistaknutijim kolonizatorima nakon prvog tjedna ekspozicije predstavljaju dijatomeje roda

Licmophora, *Cocconeis* i *Achnantes*, te pokretne penatne dijatomeje koje su kompetitori za svjetlost i nutrijente kao što je rod *Amphora*

Planktonske vrste *Cyclotella* sp., *Thalassionema nitzschioides* i *Thalassiosira* sp., razvijale su se u planktonu te su se slučajno našle u već formiranom mukoznom biofilmu. Kako je potvrđeno i kvantitativnom analizom biofilma, u kvalitativnoj analizi je vidljivo da je u inicijalnom stvaranju biofilma od prvog do četvrtog dana imigracija najvažniji čimbenik te da se najviše planktonskih vrsta može naći upravo u početku kolonizacije (Stevenson 1986), dok se kasnije (od 7. do 30. dana) događa značajan razvoj perifitonskih bentoskih dijatomeja koje se pričvršćuju cijelom površinom valve (rodovi *Cocconeis* i *Amphora*) te proizvodnjom EPS u formi stalaka (*Licmophora* sp.), apikalnih ploča, mucilažnih ploča i staničnih ovoja (Hoagland i sur. 1993). Također, ovo istraživanje korelira sa prijašnjim nalazima (Caput i sur. 2008) i velikoj abundanciji vrste *Amfora coffeaeformis* i *Navicula veneta* koje su dominirale ($f \geq 83\%$, abundancija $> 10^6$ st. cm^{-2}) u estuariju Zrmanje. Uz ove dvije vrste, *Nitzschia longissima* ($f = 80\%$, abundancija $= 1,5 \times 10^6$ st. cm^{-2}) je kodominantna.

Sastav fitoplanktona kroz period ekspozicije bio je relativno stalan sa dominantnom grupom *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* "sensu lato" čija je najveća abundancija bila nakon mjesec dana, 7. listopada 2013. godine ($10,2 \times 10^4$ st L^{-1}). Grupa *P. pseudodelicatissima* "sensu lato" pozitivno korelira s temperaturom u sjevernom Jadranu, što je bio slučaj i u zapadnom Sredozemlju gdje je viša abundancija zabilježena u toplijem dijelu godine npr. u kasno ljeto i jesen što je i u skladu sa ovim istraživanjem (Ljubešić i sur., 2011; Marić i sur., 2012).

Rodovi *Cyclophora* i *Achnantes* te vrsta *Microtabella interrupta* nisu zabilježeni u obraštaju na pločama nakon mjesec dana što se može objasniti činjenicom da naseljavaju kasnije ili samo prirodni supstrat kao što je list cvjetnice. Ipak koliko je rezultat s *C. nodosa* mjerodavan upitno je, pošto se za svaku od pločica zna vremenski period izlaganja morskom okolišu, a za izdanke uzete iz naselja cvjetnice nije određena starost. Mnoga istraživanja su pokazala da makrofiti općenito služe kao izvor hranjivih tvari za perifiton (Cattaneo i Kalff 1979, Carignan i Kalff 1982, Burkholder i Wetzel 1990, Cattaneo i Amireault 1992). Zbog rasta na povišenom

mjestu epifiti imaju bolju dostupnost svjetla te pristup hranjivim tvarima iz vodenog stupca i iz podloge (Hutchinson 1975).

Gieskes i suradnici (1988) smatraju da je omjer pigmenata konstantan unutar određenih skupina alga. Jedno od glavnih postignuća HPLC analize pigmenata je smanjenje potrebnog vremena kojeg iziskuje mikroskopska analiza (Brotas i Plante-Cuny 2003). Neki pigmenti su zajednički svim skupinama algi (npr. klorofil *a* i β -karoten) dok su neki pigmenti (zeaksantin za cijanobakterije, peridinin za dinoflagelate) ili njihovi omjeri specifični za pojedine skupine (npr. fuco: chl *a* za dijatomeje) (Althuis i sur. 1994). Tijekom ovog istraživanja klorofil *c*, prasinoksantin i zeaksantin detektirani su tek nakon 96 h ekspozicije što je u korelaciji sa pojavljivanjem cijanobakterija na pločama tek nakon prvog tjedna. Klorofil *a*, fukoksantin i peridinin od početka dominiraju što indicira na dijatomeje i dinoflagelate kao primarne kolonizatore.

Deskriptivnim metodama direktne analize biofilma epifluorescencijskom i elektronskom mikroskopijom u ovom istraživanju dobio se bolji uvid u slijed naseljavanja na pleksiglas ploče. Do sada te metode nisu korištene u istraživanjima, pa su podaci dobiveni ovim istraživanjem ishodište za razvoj takvih metoda u budućnosti. Ono što se utvrdilo je da su bakterije definitivno prvi kolonizatori koji procesom imobilizacije (revezibilnog vezivanja) ispituju podlogu i raspoloživost hranjivih tvari te zatim procesom konsolidacije (ireverzibilnog vezivanja) počinju izlučivati EPS. Na ljepljive proteine, proteoglikane te ugljikohidrate kolonizaciju započinju penatne dijatomeje koje dalje formiraju kompleksne trajne adhezivne strukture kao što su ploče, drške i stalci. Vrste planktonskih dijatomeja koje su pronađene u biofilmu predstavljaju slučajnu biomasu biofilma jer su "upale" u ljepljivi EPS matriks, što se na fotografijama slikanih SEM-om može lijepo vidjeti. Također, razvojem biofilma i praćenjem brojnosti perifitonskih dijatomeja i bakterija utvrđeno je da su međusobno pozitivno korelirane pošto imaju eksponencionalne razvoje tijekom perioda ekspozicije. Na pločama je vidljiv trodimenzionalni biofilm koji nije na svim dijelovima jednako razvijen, pa se na golim dijelovima površine ploča još uvijek vide bakterijske stanice.

5. Zaključci

Ovo istraživanje je potvrdilo da je pleksiglas materijal pogodan za procese naseljavanja u morskom okolišu u periodu od 30 dana kontakta. Brojnost bakterijskih stanica kao i dijatomeja povećavao se tijekom istraživanja pri tome stvarajući optimalni mikro-okoliš. Sa HPLC analizom pigmenata, istraživanje je potvrdilo vremensku distribuciju i slijed naseljavanja na pločice: prvim kolonizatorima su se pokazale bakterije i cijanobakterije, a slijedile su ih dijatomeje koje skupa čine primarni biofilm u moru. Interakcije dijatomeja, abiotičkih čimbenika i podloge su se pokazale bitnima za formiranje dijatomejskih zajednica u biofilmovima unutar morskih mikrobioloških zajednica. Ovim istraživanjem se nisu testirale prehrambene i kemijske interakcije među bakterijama i dijatomejama, no pokazana je određena prostorna neovisnost među stanicama te ranim i kasnim kolonizatorima što ukazuje na važnost abiotičkih faktora koji utječu na rano formiranje primarnog biofilma.

Analiziranje biofilma u periodu između prvog tjedna i mjesec dana je preporučljivo kako bi se dobio bolji uvid u promjenama omjera pigmenata, prirasta u broju stanica i kvalitativnog mijenjanja perifitonske zajednice. Istraživanjem su se utvrdile bakterije koje naseljavaju selektivnu podlogu Marine Agar, ali bi se molekularnim metodama moglo analizirati kojim skupinama pripadaju i kako se njihov kvalitativni sastav mijenja obzirom na vrijeme ekspozicije.

6. Literatura

- Althuis, Lj. A., Gieskes, W. W. C., Villerius, L., Colijn, F. (1994): Interpretation of fluorometric chlorophyll registrations with Algal pigment analysis along a ferry transect in the Southern North Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, 33: 37-46.
- Anderson, N. J. (1990): Inferring diatom palaeoproduction and lake trophic status from fossil diatom assemblages. 11th International Diatom Symposium, San Francisco 1990. Otto Koeltz, Koenigstein, pp. 539-547.
- Armstrong, E., Boyd, K. G., Burgess, J. G. (2000): Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotech Annual Review*, 6: 221–241.
- Baier, R. E. (1972): Proceedings of the Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling, National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD, p.633-639.
- Barbiero, R. P. (2000): A multi-lake comparison of epilithic diatom communities on natural and artificial substrates. *Hydrobiologia*, 438: 157-170.
- Battarbee, R. W., Mason, J., Renberg, I. and Talling, J. F. (1990): Palaeolimnology and lake acidification. The Royal Society, London.
- Battarebee, R. W., Charles, D. F., Dixit, S. S., and Renberg, I. (1999): Diatoms as indicators of surface water acidity. In: Stoermer E. F. i Smol J. P. (eds) *The diatoms: Applications for environmental and earth sciences*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 85-127.
- Bennion, H., Monteith, D. and Appleby, P. (2000): Temporal and geographical variation in lake trophic status in the English Lake District: evidence from (sub) fossil diatoms and aquatic macrophytes. *Freshwater Biology*, 45: 394-412.
- Bernardi-Aubry, F., Berton, A., Bastianini, M., Socal, G., 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.
- Brotas, V. and Plante-Cuny, M-R. (2003): The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities. *Acta Oecologica*, 24: S109-S115.
- Burić Z., Caput K., Viličić D. (2004): Distribution of the diatom *Cocconeis scutellum* in the karstic estuary (Zrmanja, eastern Adriatic Sea). *Biologia*, 59: 1-8.

- Burkholder, J. M., Wetzel, R. G. (1990): Epiphytic alkaline phosphatase activity on natural and artificial plants in a P-limited lake: re-evaluation of the role of macrophytes as a phosphorus source for epiphytes. *Limnology and Oceanography*, 3: 736-746.
- Camper, A. K., Jones, W. L., Hayes, Y. T., (1996): Effect of Growth Conditions and Substratum Composition on the Persistence of Coliforms in Mixed-Population Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4014-4018.
- Caput K., Burić Z., Olujić G. (2005): Vertical distribution of periphytic diatoms in the karstic Zrmanja River (Croatia), *Acta Botanica Croatica*, 64 : 227–236.
- Car, A., Witkowski, A., Dobosz, S., Burfeind, D. D., Meinesz, A., Jasprica, N., Ruppel, M., Kurzydowski, K. J., Plocinski, T. (2012): Description of a new marine diatom, *Cocconeis caulerpacola* sp. nov. (*Bacillariophyceae*), epiphytic on invasive *Caulerpa* species, *European journal of phycology*, 4: 433-448.
- Car, A., Witkowski, A., Dobosz, S., Jasprica, N., Plocinski, T., Budinjak, I. (2012): Taxonomy, morphology and ultrastructure of the diatom genus *Mastogloia* from areas affected by *Caulerpa racemosa* and *Caulerpa taxifolia* (Adriatic Sea coast, Croatia), Abstracts of 9th Central European Diatom Meeting, Gesierich Doris (ur)., Innsbruck: Institute of Botany, RG Hydrobotany, University of Innsbruck, 48-48.
- Carignan, R., Kalf, J. (1982): Phosphorus release by submerged macrophytes: Significance to epiphyton and phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 27: 419-427.
- Cattaneo, A., Amireault, M. C. (1992): How artificial are artificial substrata for periphyton? *Journal of North American Benthological Society*, 11: 244-256.
- Cattaneo, A., Kalf, J. (1979): Primary production of algae growing on natural and artificial aquatic plants: a study of interaction between epiphytes and their substrate. *Limnology and Oceanography*, 24: 1031-1037.
- Characklis, W. G., Cooksey, K. E. (1983): Biofilms and microbial fouling. In: Laskin AI (ed) *Applied microbiology*. Academic Press. New York, 29: 93-138.
- Charles, D. F. and Smol, J. P. (1990): The PIRLA II Project: Regional assessment of lake acidification trends. *Verhandlungen/Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 24: 474-480.
- Chiaudani, G., Marchetti, R., Vighi, M. (1980): Eutrophication in Emilia- Romagna coastal waters (North Adriatic Sea, Italy): a case history. *Progress in Water. Technologies.*, 12: 185-192.

- Clare, A. S., Rittschof, D., Gerhard, D. J., Maki, J. S. (1992): Molecular approaches to non-toxic antifouling. *Invertebrate Reproduction and Development*, 22: 67–76.
- Compère, C., Bellon-Fontaine, M. N., Bertrand, P., Costa, D., Marcus, P., Poleunis, C., Pradier, C-M., Rondot, B. and Walls, M. G. (2001): Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling*, 17(2): 129-145.
- Cooksey, K. E., Wigglesworth-Cooksey, B. (1995): Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review, *Aquatic Microbial Ecology*, 9: 87-96.
- Cumming, B. F., Smol, J. P. (1993): Diatoms and their relationship to salinity and other limnological characteristics from 65 Cariboo/Chilcotin region (British Columbia, Canada) lakes. *Hydrobiologia*, 269/270: 179-196.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2004): Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 261–289.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., and Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280: 295–298.
- De Nicola, D. M. and McIntyre, C. D. (1990): Effects of substrate relief on the distribution in laboratory streams. I. Hydrology. *Journal of Phycology*, 26: 624-633.
- De Rincon, O. T., Morris, E., De Romero, M., Andrade, S. (2001): Effect of 'pelo de oso' (*Garveia franciscana*) on different materials in Lake Maracaibo. *NACE International, Corrosion/2001*, pp. 15
- Engstrom, D. R., Swain, E. B. and Kingston, J. C. (1985): A pleolimnological record of human disturbance from Harvey's lake, Vermont: Geochemistry, pigments and diatoms. *Freshwater Biology*, 15: 261-288.
- Firganović, M. (1961): Polja gornje Krke. *Radovi Geografskog Instituta Sveučilišta Zagreb*, 1: 1-164.
- Fritz, F. (1972): Razvitak gornjeg toka rijeke Zrmanje. *Krš Jugoslavije*, 8: 1-16.
- Fritz, S. C. (1990): Twentieth-century salinity and water-level fluctuations in Devils lake north Dakota: A test of a diatom-based transfer function. *Limnology and Oceanography*, 35: 1771-1781.
- Fuqua, C., and Greenberg, E. P. (2002): Listening in on bacteria acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 3: 685–695.

Literatura

- Gieskes, W. W. C., Kraay, G. W., Nontji, A., Setiapermana, D. and Sutomo (1988): Monsoonal alteration of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the Banda Sea (Indonesia): A mathematical analysis of algal fingerprints. *Netherlands Journal of Sea Research*, 22: 123-137.
- Gilmartin, M., Degobbi, D., Revelante, N., Smolaka, N. (1990): The mechanism controlling plant nutrient concentrations in the northern Adriatic Sea. *Int. Revue. Ges. Hydrobiologia*, 75: 425-445.
- Giordani, P., Miserocchi, S., Balboni V., Malaguti, A., Lorenzelli, R., Honsel, G., Poniz, P., (1997): Factors controlling trophic conditions in the North- West Adriatic basin: seasonal variability. *Marine Chemistry*, 58: 351-360.
- Godrijan, J., Maric, D., Tomazic, I., Precali, R., Pfannkuchen, M., (2013): Seasonal phytoplankton dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea. *Journal of sea research*, 77: 32-44
- Goldsborough, L. G., Robinson, G. G. C. (1996): *Pattern in Wetlands*. U: Stevenson R. J., Bothwell M. L., Lowe R. L. (ur) *Algal Ecology. Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, San Diego, 77-117.
- Greenberg, T., Itzhak, D. (2002): Marine biofouling of titanium alloys in the coral reef environment. *Corrosion/2002; Denver, CO, USA.*, 7-11
- Hamilton, P. B., Duthie, H. C. (1984): Periphyton colonization of rock surfaces in a boreal forest stream studied by scanning electron microscopy and track in autoradiography. *Journal of Phycology*, 20: 525-532.
- Hillebrand, H. and Sommer, U. (1997): Response of epilithic microphytobenthos of the Western Baltic Sea to in situ experiments with nutrient enrichment. *Marine Ecology Progress Series*, 160: 35-46.
- Hoagland, K. D., Rosowski, J. R., Gretz, M. R., Roemer, S. C. (1993): Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. *Journal of Phycology*, 29: 537-566.
- Holmstrøm, C., Kjelleberg, S. (1999): Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce active extracellular compounds. *FEMS Microbial Ecology*, 30: 285–293.

- Honsell, G., Boni, L., Cabrini, M., Pompei, M. (1992): Toxic or potentially toxic dinoflagellates from the Northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment* (Suppl.), 107-114.
- Hutchinson, G. E. (1975): *A Treatise on Limnology: Limnological Botany*, Vol. 3. John Wiley and Sons, New York, p. 660.
- Juggins, S. (1992): Diatoms in the Thames Estuary, England. Ecology, palaeoecology, and salinity transfer function. *Bibliotheca Diatomologica* 25. J.Cramer, Berlin.
- Kelly, M. (2000): Identification of common benthic diatoms in rivers. *Field studies*, 9: 583-700.
- Korte, V. L., Blinn, D. W. (1983): Diatom colonization on artificial substrates in pool and riffle zones studied by light and scanning electron microscopy. *Journal of Phycology*, 19: 332-341.
- Kurath, G., Morita, R. Y., (1983): Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 45:1206–1211.
- Lehaitre, M., Compère, C. (2007): Biofouling and underwater measurements. In: Babin et al. (eds), *op. cit.*, Backscatter, 10: 22-25.
- Lewis, D. P., Piontkowski, J. M., Straney, R. W; Knowlton, J. J. (1997): Use of potassium for treatment and control of zebra mussel infestation in industrial fire protection water systems. *Fire Technology*, 33: 356-71.
- Ljubešić, Z., Bosak, S., Viličić, D., Borojević, Kralj, K., Marić, D., Godrijan, J., Ujević, I., Peharec, P., Dakovac, T., (2011): Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). *Harmful Algae*, 10: 713-722.
- MacIntyre, H. L., Geide, R. J., Miller, D. C. (1996): Microphytobenthos: the ecological role of the secret garden of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaried*, 19: 186-201.
- Margalef, R. (1983): *Limnología*. Omega, Barcelona.
- Marić, D., Kraus, R., Godrijan, J., Supić, N., Djakovac, T., Precali, R., 2012. Phytoplankton response to climate and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115: 98-112.
- Marini, M., Fornasiero, P., Artegiani, A. (2002): Variations of hydrochemical features in the coastal waters of Monte Conero: 1982-1990. *P.S.Z.N.: Marine Ecology*, 23, Suppl., 1: 258-271.
- Medlin, L. K. (2006): The evolution of the diatoms and a report on the current status of their classification. U: Kromkamp J. i sur (ur) 2006: Functioning of microphytobenthos in estuaries: Proceedings of the Colloquium, Amsterdam, 21-23 August 2003. Koninklijke

- Nederlandse Akademie van Wetenschappen Verhandelingen, Afd. Natuurkunde (Tweede Reeks), 103: 3-6.
- Novitsy, J. A., Morita, R. Y., (1978): Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Marine Biology*, 36: 289–295.
- O’Toole, G., Kaplan, L. A. and Kolter, R., (2000): Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54.
- Palmer, J., Flint, S., Brooks, J. (2007): Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*, 34: 577-588.
- Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2005): Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13: 27–33.
- Pettine, M., Patrolecco, L., Camusso, M., Crescenzo, S. (1998): Transport of carbon and nitrogen to the northern Adriatic Sea by the Po river. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 46: 127-142.
- Revelante, N., Gilmartin, M. (1976): The effect of Po river discharge on the phytoplankton dynamics of the northern Adriatic Sea. *Marine Biology*, 34: 259-271.
- Riđanović, J., Rendulić, I., Šimunović, V. (1999): Hrvatski Jadran u sklopu novog teritorijalnog ustroja. *Zbornik radova 2. Hrvatske Konferencije o vodama*, Dubrovnik, str. 269-276.
- Round, F. E. (1981): *The ecology of algae*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sabater, S., Gregory, S. V., Sedell, J. R. (1998): Community dynamics and metabolism of benthic algae colonizing wood and rock substrates in a forest stream. *Journal of Phycology*, 34: 561-567.
- Sládečková, A. (1962): Limnological investigation methods for the periphyton (“aufwuchs”) community. *The botanical review* (april-june), 286-350.
- Smol, J. P., Brown, S. R. and McNeely, R. N. (1983): Cultural disturbances and trophic history of a small meromictic lake from central Canada. *Hydrobiologia*, 103: 125-130.
- Smol, J. P., Cumming, B. F. (2000): Tracking long-term changes in climate using algal indicators in lake sediments. *Journal of Phycology*. 36: 986-1011.
- Snoeijs, P. (1991): Monitoring pollution effects by diatom community composition. A comparison of sampling methods. *Archiv für Hydrobiologie*, 121: 497-510.
- Stein, J., Wood, C. D., Harblin, O., Resue, J. (2001): *Nontoxic, Self-Cleaning Silicone Fouling Release Coatings*. General Electric Corporate Research and Development

- Stevenson, F. J. (1986): Cycles of soil-carbon, nitrogen phosphorus, sulfur, micronutrients. J. Wiley and Sons. New York.
- Supić, N., Orlić, M. (1992): Annual cycle of sea surface temperature along the east Adriatic coast. *Geofizika*, 9: 79-97.
- Tegaccia, N., Tegaccia, T. (1983): Chronological series of hydrological data on the northern and central Adriatic Sea. *FAO Fish. Report*, 290: 69-80.
- Totti, C., Civitarese, G., Acri, F., Barletta, D., Candelari, G., Paschini, E., Solazzi, A., (2000): Seasonal variability of phytoplankton populations in the middle Adriatic sub-basin. *Journal of Plankton Research*, 22: 1735-1756.
- Totti, C., Cucchiari, E., Romagnoli, T., Penna, A. (2007): Bloom of *Ostreopsis ovata* in the Conero Riviera (NW Adriatic Sea). *Harmful Algae News*, 33: 12–13.
- Tuji, A. (2000a): Observation of developmental processes in loosely attached diatom (*Bacillariophyceae*) communities. *Phycological Research*, 48: 75-84.
- Tuji, A. (2000b): The effect of irradiance on the growth of different forms of freshwater diatoms: implications for succession in attached diatom communities. *Journal of Phycology*, 36: 656-661.
- Utermöhl, H. (1958): Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton Methodik. *Mitteilung Internationa le Vereinigung fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie*, 9: 1-38.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1995): *Algae. An introduction to phycology.* Cambridge University Press, Cambridge
- Viličić, D., Orlić, M., Burić, Z., Carić, M., Jasprica, N., Kršinić, F., Smirčić, A., Gržetić, Z. (1999): Patchy distribution of phytoplankton in a highly stratified estuary (the Zrmanja estuary, October, 1998.). *Acta Botanica Croatica*, 58: 105-125.
- Von Stosch, H. A. (1975): An amended terminology of the diatom girdle. *Nova Hedwiga Beih*, 53: 1-28.
- Weitzel, R. L., Sanocki, S. L., Hoelecek, H. (1979): Sample replication of periphyton collected from artificial substrates. U: Weitzel, R. L. (ed.), *Methods and Measurements of periphyton communities: A Review*, American Society for Testing and Materials, 90-115.
- Wetzel, R. G. (1964): A comparative study of the primary productivity of higher aquatic plants, periphyton and phytoplankton in a large, shallow lake. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 49: 1-61.

Wetzel, R. G. (2001): Limnology. Lake and River Ecosystems. Academic Press, San Diego, 10-66.

Whitmore, T. J. (1989): Florida diatom assemblages as indicators of trophic state and pH. *Limnology and Oceanography*. 34: 882-895.

<http://www.csa.com/discoveryguides/biofoul/overview.php>

(Titanium Metals Corporation, 1999 Broadway, Suite 4300, Denver CO 80202); datum pristupa: 01.04.2014., 10:20 h

<http://natura2000.dzpp.hr/georefapp3/>; datum pristupa: 01.04.2014., 10:20 h

http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/biodiversity/sahyadri_eneews/newsletter/issue26/article1/chap3.htm;

datum pristupa: 01.04.2014., 10:20 h

<http://www.bio.vu.nl/thb/deb/>; datum pristupa: 01.04.2014., 10:20 h

<http://www.svet-biologije.com/>; datum pristupa: 01.06.2014., 17:00 h

7. Prilozi

Fotografije svojti dijatomeja snimljene skenirajućim elektronskim mikroskopom:

- a) *Achnanthes* sp.
- b) *Amphora coffeaeformis* Cleve
- c) *Amphora ovalis* (Kützing) Kützing
- d) *Amphora* sp.
- e) *Bacteriastrum* sp.
- f) *Cocconeis* sp.
- g) *Cyclotella* sp.
- h) *Cylindrotheca closterium*
(Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin
- i) *Diploneis* sp.
- j) *Fallacia* sp.
- k) *Grammatophora* sp.
- l) *Licmophora* sp.
- m) *Mastogloia* sp.
- n) *Microtabella interrupta* (Ehrenberg)
Round
- o) *Navicula* sp.
- p) *Nitzchia* sp.
- q) *Paralia sulcata* (Ehrenberg) Cleve
- r) *Pleurosigma angulatum* W.Smith
- s) *Pleurosigma* sp.

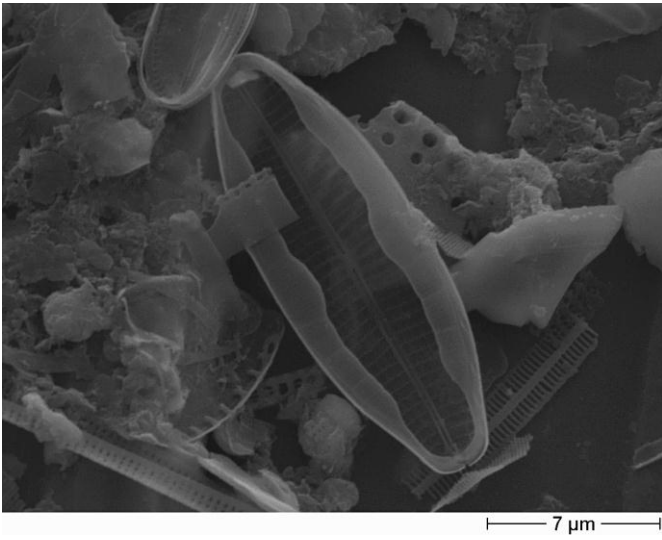
- t) *Proschkinia bulnheimii* (Grunow)
Karayeva
- u) *Psammodictyon mediterraneum*
(Hustedt) D.G.Mann
- v) *Rhizosolenia* sp.
- w) *Thalassionema nitzschioides*
(Grunow) Mereschkowsky
- x) *Triceratium* spp

Fotografije listova morske cvjetnice *C.* *nodosa*:

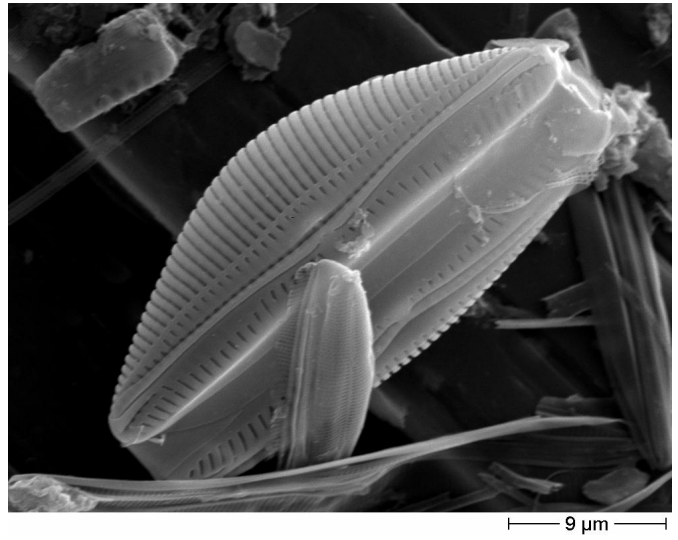
- y) Lanac bakterija
- z) Mikrotopografija lista sa
dijatomejom *Cocconeis* sp.

Životopis

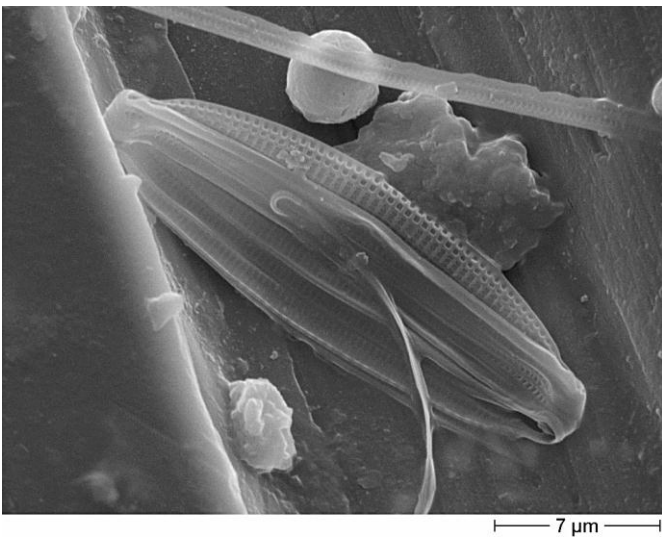
a)



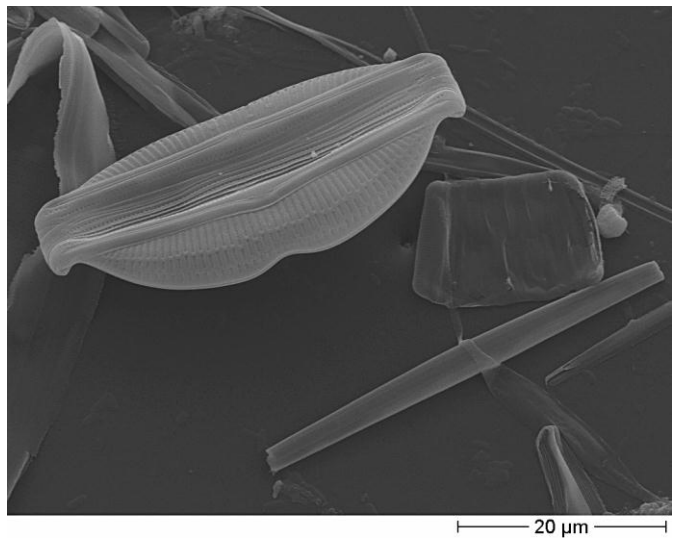
b)



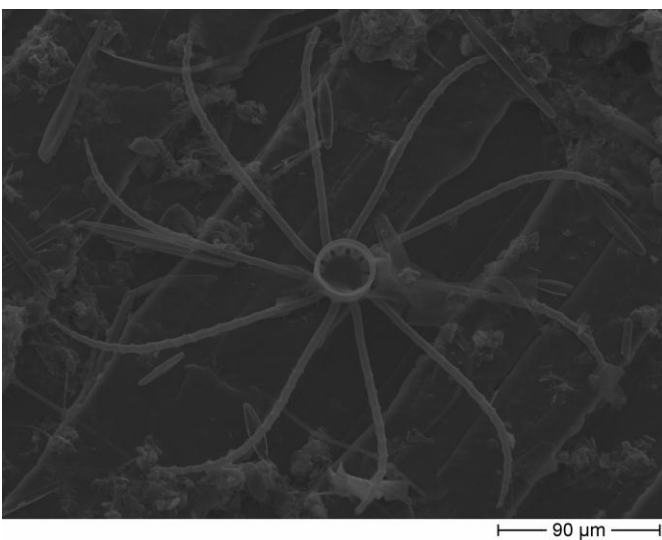
c)



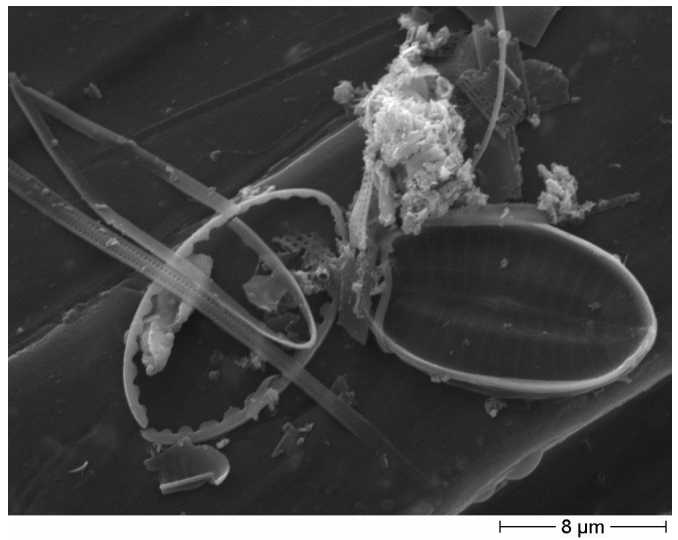
d)



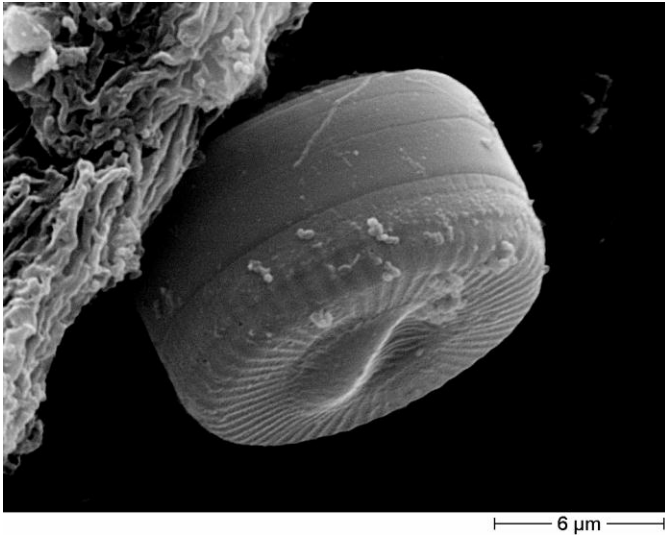
e)



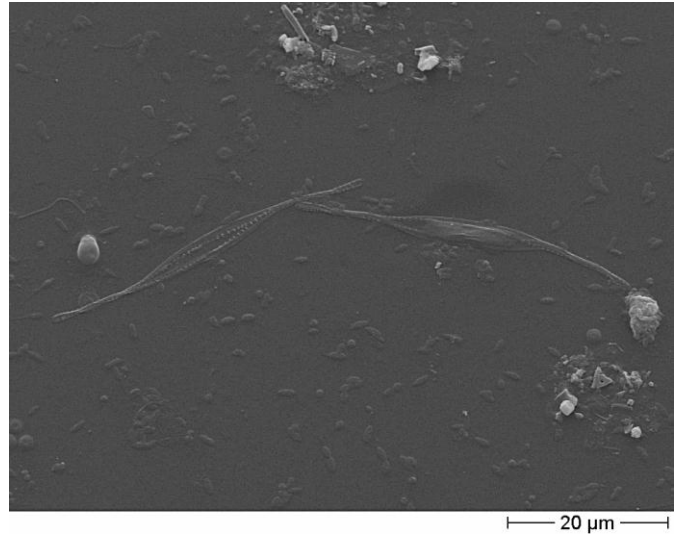
f)



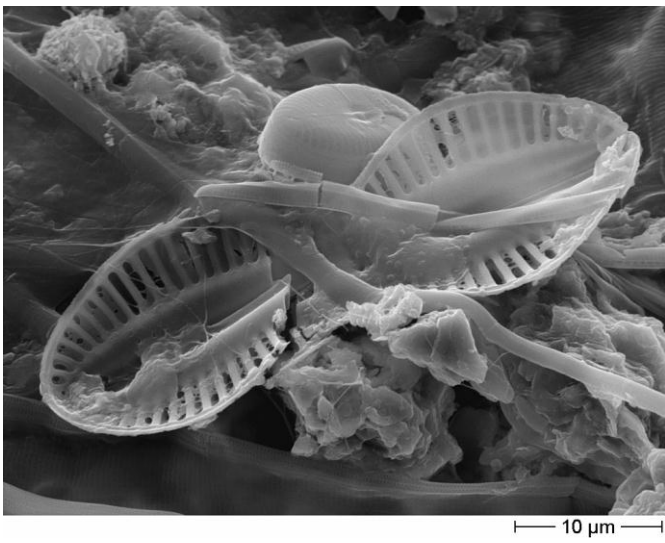
g)



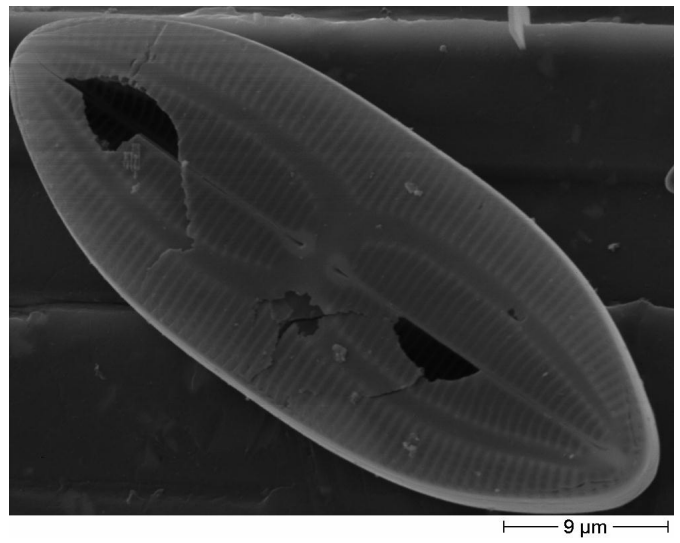
h)



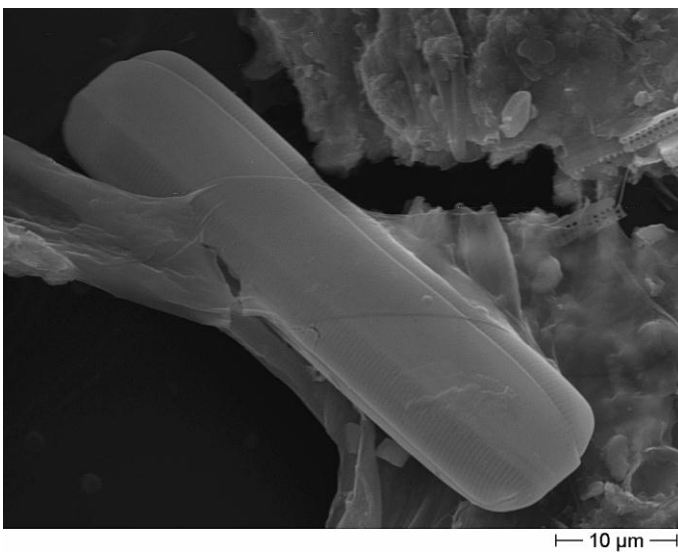
i)



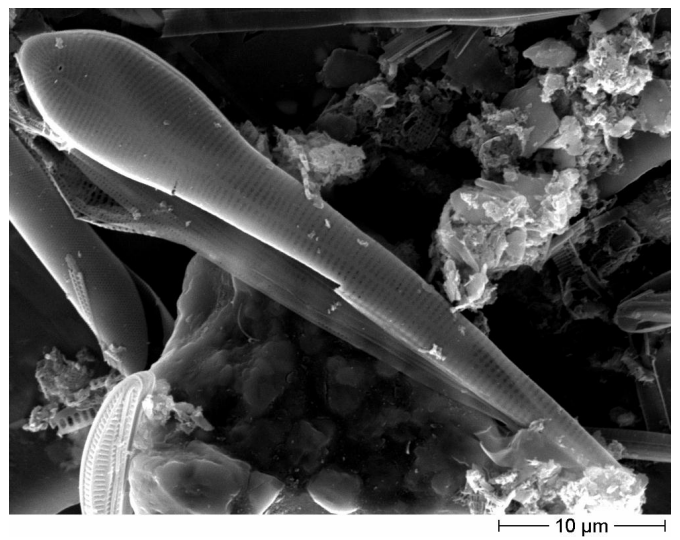
j)



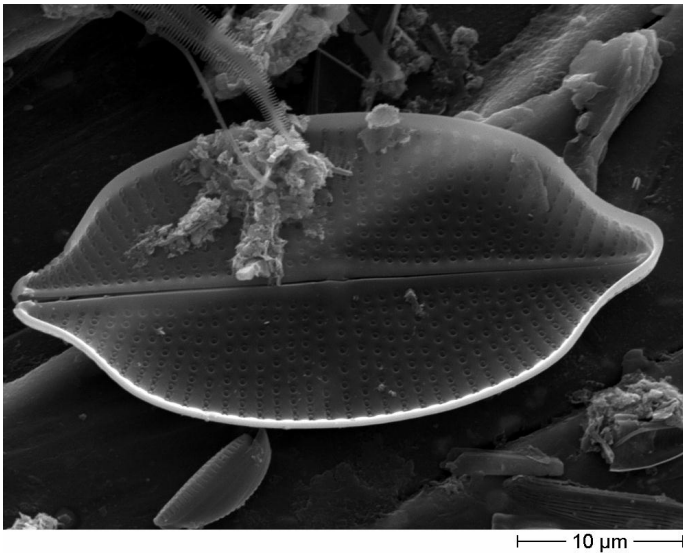
k)



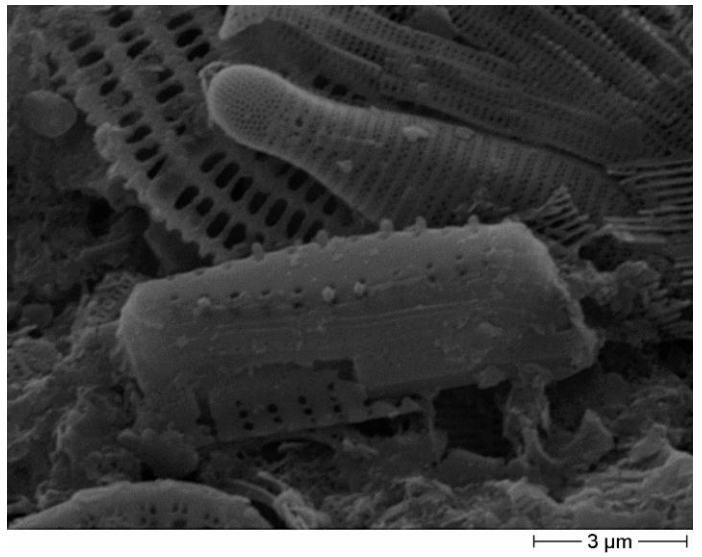
l)



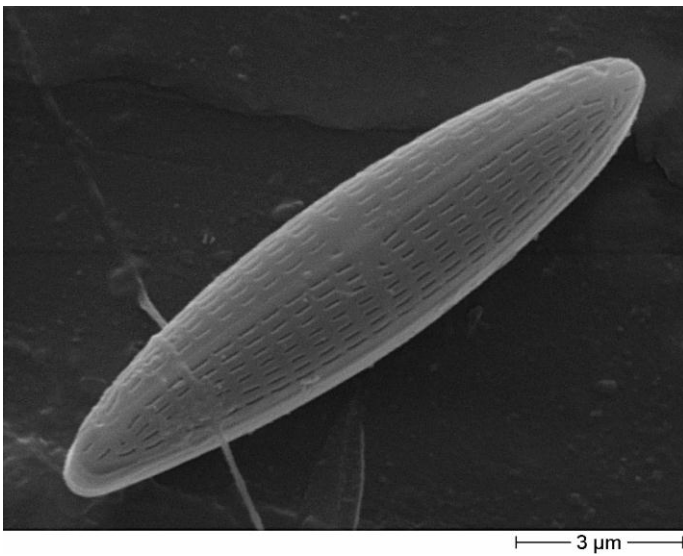
m)



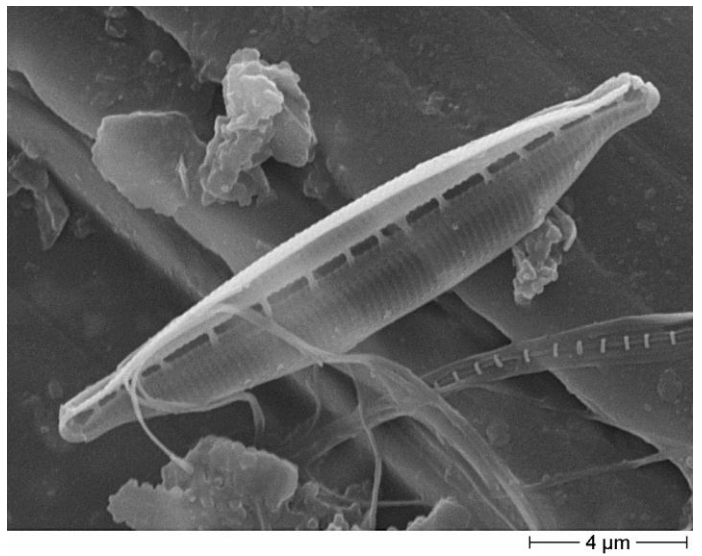
n)



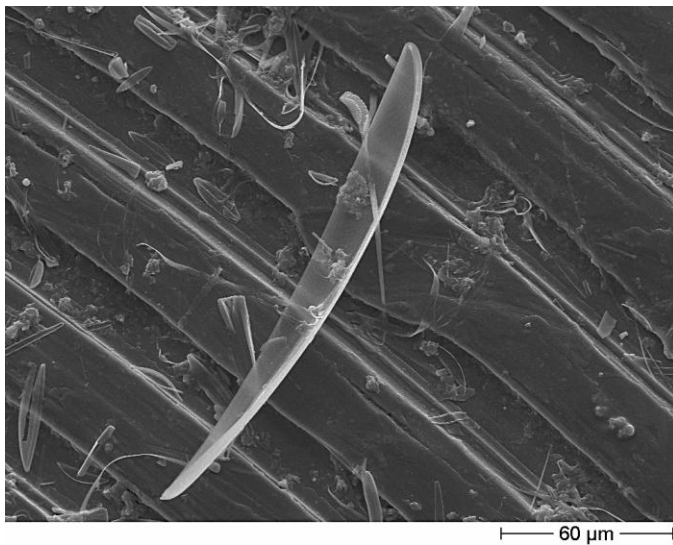
o)



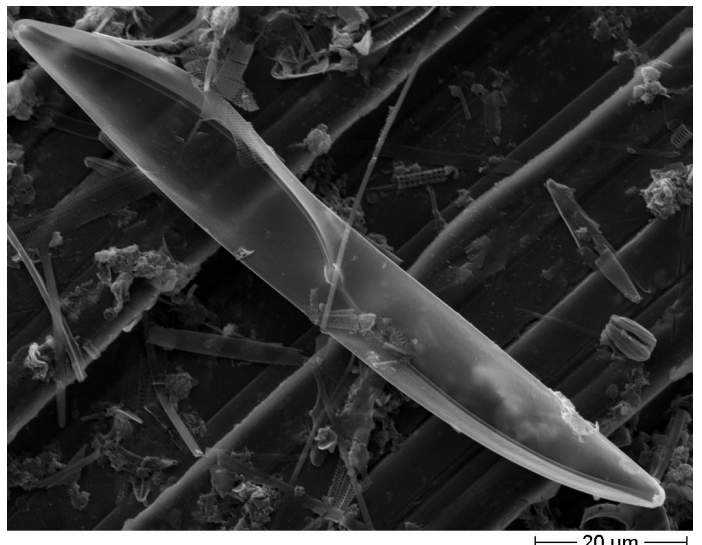
p)



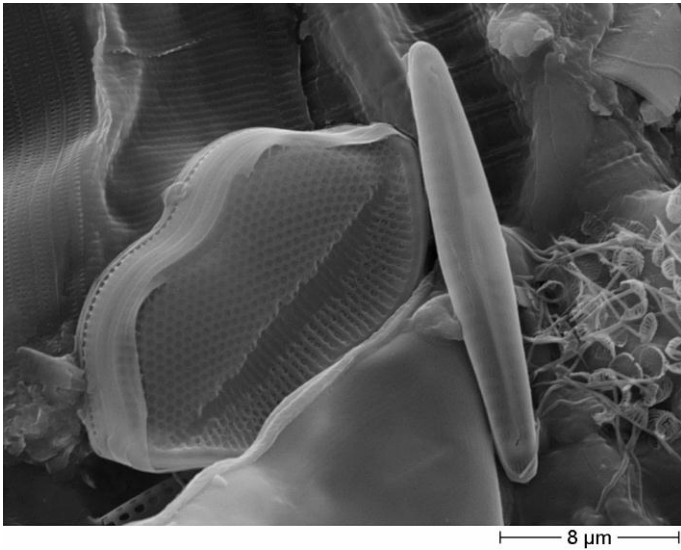
r)



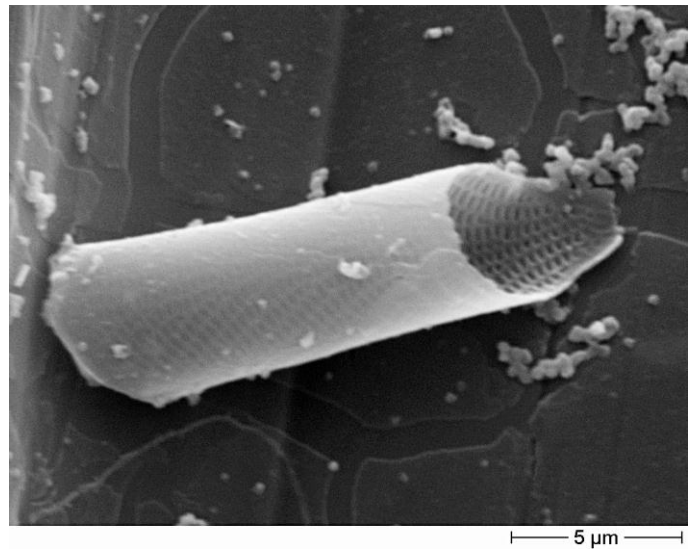
s)



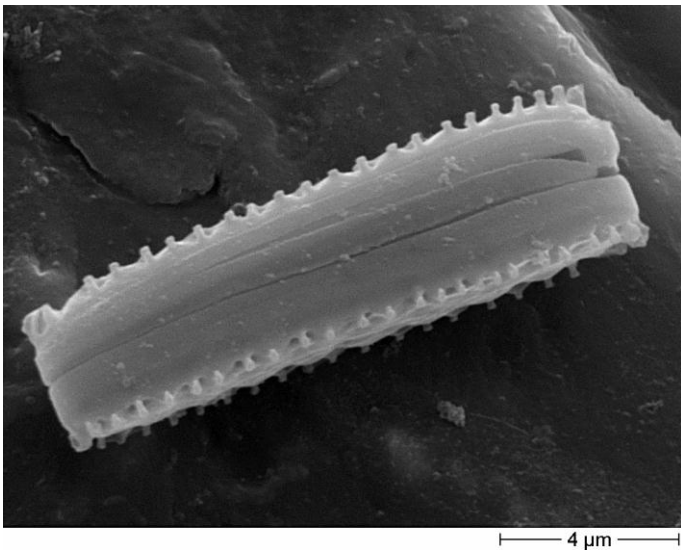
u)



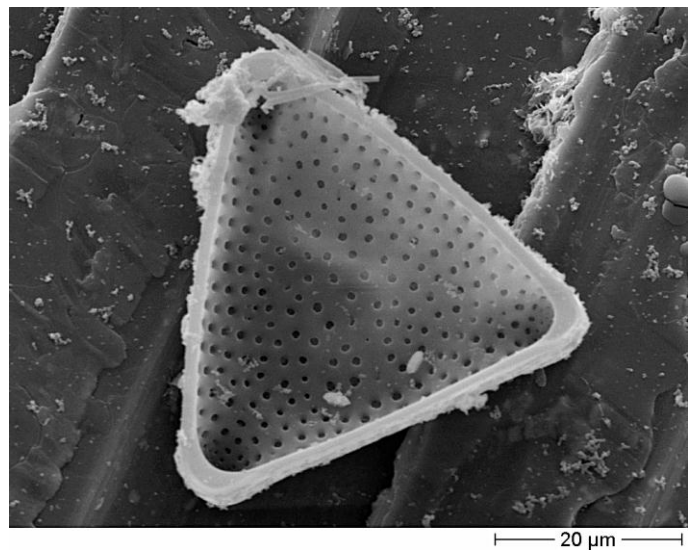
v)



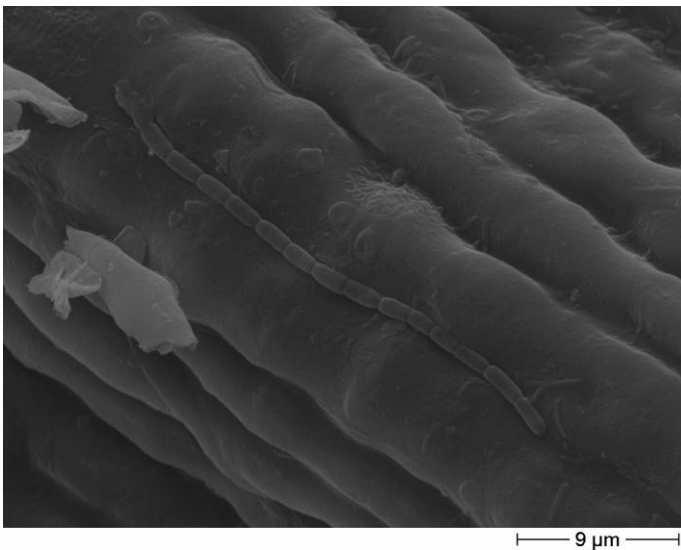
w)



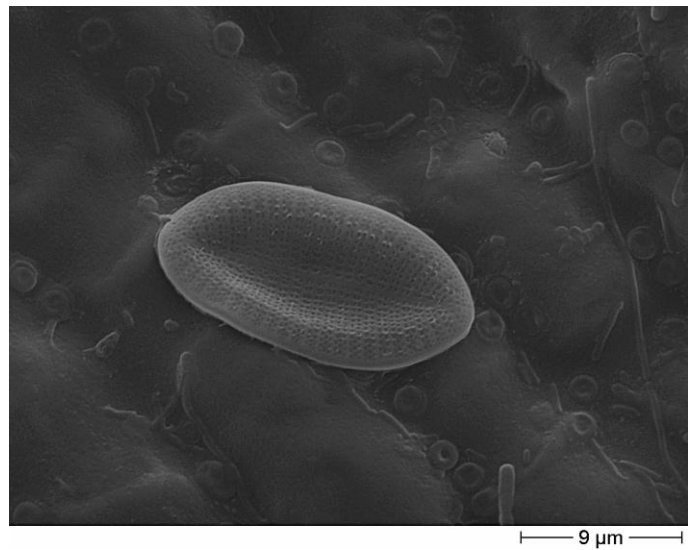
x)



y)



z)



ŽIVOTOPIS

Maja Mejdandžić

- Datum i mjesto rođenja: 2. svibnja 1991. godine, Uskoplje, BiH
- Adresa prebivališta: Kralja Petra Krešimira IV. br. 6, 22300, Knin
- Mobitel: +385997352566
- Email: mmejdandzic@gmail.com

Završeno obrazovanje:

- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek
- Srednja škola "Lovro Monti", smjer: opća gimnazija, Knin
- Osnovna škola "dr. Franjo Tuđman", Knin
- Osnovna glazbena škola "Krstodak", Drniš, podružnica Knin, smjer: glasovir

Kongresna priopćenja:

- Koletić, N., Hanžek, N., Polović, D., Kovarik, I., **Mejdandžić, M.**, Linardić, M., and Slana, A., (2011): *Contribution to the Knowledge of Macro-algae of the Coastal Area of the Island of Hvar*, BALWOIS 2012 - Ohrid, Republic of Macedonia
- **Mejdandžić, M.** i sur. (2014): *Colonization of diatoms and bacteria on artificial substrates in the marine environment*, 8th Central European Diatom Meeting – Zagreb, Croatia

Nagrade i priznanja:

- Dobitnica posebne Rektorove Nagrade Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za projekt "Noć biologije 2012/13."
- Dobitnica Božićnog Granta Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta ak.god. 2013/14.
- Dobitnica Dekanove Nagrade Fakulteta za najboljeg studenta Ekologije i zaštite prirode za akademsku godinu 2013/14.

Udruge i organizacije:

- Član Udruge studenata biologije „BIUS” – Sekcija za alge, Sekcija za gljive
- Voditelj Sekcije za alge udruge „BIUS” (prosinac 2013. – rujan 2014.)