

# Morfološke i fiziološke prilagodbe morskih dijatomeja iz rodu Thalassionema, Thalassiosira i Synedra na smanjenu koncentraciju fosfora

---

Fornažar, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:540573>

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

Marija Fornažar

**Morfološke i fiziološke prilagodbe morskih  
dijatomeja iz rodova *Thalassionema*,  
*Thalassiosira* i *Synedra* na smanjenu  
koncentraciju fosfora**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za evolucijsku ekologiju, Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković, u Rovinju pod voditeljstvom doc.dr.sc. Mirte Smodlaka Tanković te suvoditeljstvom doc.dr.sc. Sunčice Bosak s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre struke ekologije i zaštite prirode.

*“If you want to go fast, go alone. If you want to go far, go together.” Afrička poslovica*

## ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici doc.dr.sc. Mirta Smodlaka Tanković prije svega na vrlo ugodnom pristupu, stalnoj podršci i ohrabrenju kada je trebalo. Hvala na prilici da pod Vašim mentorstvom izradim diplomski rad na temi za koju nisam ni znala koliko će mi postat zanimljiva. Hvala vam i na velikom strpljenju prilikom ispravljanja rada kao i na savjetima za njegovo pisanje i uređivanje.

Hvala komentorici doc.dr.sc. Sunčici Bosak na pomoći oko pisanja i ispravljanja teksta kao i vođenju cijelog administrativnog procesa

Hvala mag. Nataši Kužat na velikoj pomoći oko samog eksperimenta, čestom savjetovanju i dobrom društvu.

Hvala dr.sc. Danieli Marić Pfannkuchen na usmjeravanju pri determinaciji vrsta u eksperimentu te na zanimljivim pričama iz svijeta planktona.

Hvala doc.dr.sc. Ani Baričević na pomoći prilikom molekularne obrade uzoraka kao i interpretaciji dobivenih rezultata.

Hvala dr.sc. Martinu Pfannkuchenu na pomoći oko izrade pojedinih grafova te na razgovorima koji su mi pomogli oko interpretacije samih rezultata.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za evolucijsku ekologiju, koji su me prihvatili kao svoju i u čijem sam se društvu od prvog dana osjećala kao kod kuće.

Zahvaljujem i svojim prijateljima obitelji na dugogodišnjoj potpori i strpljenju tokom studiranja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Morfološke i fiziološke prilagodbe morskih dijatomeja iz rodova *Thalassionema*, *Thalassiosira* i *Synedra* na smanjenu koncentraciju fosfora

Marija Fornažar

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom radu istražene su različite prilagodbe dijatomeja rodova *Thalassionema*, *Thalassiosira* i *Synedra* na uvjete s ograničenom koncentracijom fosfora. Pratila se stopa rasta, morfološke promjene, aktivacija enzima alkalne fosfataze, kinetika enzimske reakcije, koncentracija anorganskog fosfora u kulturama i fluorescencija klorofila *a*. Vrste su se preliminarno odredile pomoću svjetlosnog mikroskopa te je vrstama *Thalassiosira* cf. *eccentrica* i *Thalassionema* cf. *frauenfeldii* identitet potvrđen i molekularnim metodama. Za sve vrste utvrđena je veća brojnost i stopa rasta u eksponencijalnoj fazi u uvjetima obogaćenim fosforom. U uvjetima s ograničenom koncentracijom fosfora utvrđena je enzimatska aktivnost kod vrsta *T. cf. eccentrica* i *T. cf. frauenfeldii*, te morfološke promjene i smanjena fluorescencija klorofila kod vrste *T. cf. eccentrica*. Za vrstu *Synedra* sp. se promjena fluorescencije klorofila nije mogla izmjeriti. Rezultati eksperimenata ukazuju da vrsta *Synedra* sp. prikazuje obilježja ravnotežne vrste dok su *T. cf. eccentrica* i *T. cf. frauenfeldii* slabije kompetitorske vrste. Poznavanjem koncentracije anorganskog fosfora u ekosustavu mogli bi predvidjeti fitoplanktonski sastav danog područja čime možemo dobiti bolji uvid u lokalnu trofičku mrežu i ciklus ugljika kroz trofičke stepenice, mikrobnog kruga i samu biološku pumpu.

(52 stranice, 23 slike, 10 tablica, 79 bibliografskih referenci; izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb.

**Ključne riječi:** morske dijatomeje, Sjeverni Jadran, alkalna fosfataza, ograničenje fosforom, adaptacija

**Voditelj:** doc.dr.sc. Mirta Smodlaka Tanković

**Suvoditelj:** doc.dr.sc. Sunčica Bosak

**Ocjenitelji:** doc.dr.sc. Sunčica Bosak

izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

prof.dr.sc. Nada Oršolić

Rad je prihvaćen: 01.04.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

# Morphological and physiological responses of marine diatoms *Thalassionema*, *Thalassiosira* and *Synedra* to phosphorus deficiency

Marija Fornažar

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

This thesis investigates the adaptations of diatoms belonging to genera *Thalassionema*, *Thalassiosira* and *Synedra* to a phosphorus deficient medium. Activation of alkaline phosphatase enzyme, chlorophyll *a* absorbance, phosphorus concentration, growth rate, cell abundance and morphological changes were monitored. Species were identified with light microscopy and molecular analysis confirmed the identities for *Thalassiosira* cf. *eccentrica* and *Thalassionema* cf. *frauenfeldii*. For *Synedra* sp. molecular determination was not possible. Higher cell abundance as well as greater cell growth rate in exponential growth phase was detected for all monitored species in phosphorus rich medium. In phosphorus deficient medium enzymatic activity was noted for *T. cf. eccentrica* and *T. cf. frauenfeldii* as were morphological changes and lower chlorophyll *a* fluorescence for *T. cf. eccentrica*. For *Synedra* sp. measurement of chlorophyll *a* fluorescence change wasn't possible because phosphorus concentration was below detection levels. *Synedra* sp. characteristics depict a behaviour of an equilibrium species where *T. cf. eccentrica* and *T. cf. frauenfeldii* show characteristics of opportunistic species. Knowing phosphorus concentrations in the marine environment would enable better prediction of phytoplankton composition thus giving us a better understanding of the local food web and carbon cycling through trophic interactions.

(52 pages, 23 figures, 10 tables, 79 references; original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

**Key words:** marine diatoms, northern Adriatic, alkaline phosphatase, phosphorus deficiency, adaptations

**Supervisor:** Mirta Smodlaka Tanković, PhD, Assist.Prof.

**Co-supervisor:** Sunčica Bosak, PhD, Assist.Prof.

**Reviewers:** Sunčica Bosak, PhD, Assist. Prof.

Petar Kružić, PhD, Assoc. Prof.

Nada Oršolić, PhD, Full Prof.

Thesis accepted: 01.04.2021.

# SADRŽAJ

1.	UVOD	
1.1.	Jadransko more.....	1
1.2.	Kruženje nutrijenata u Jadranu.....	1
1.3.	Ograničenje fosforom u moru i sjevernom Jadranu .....	2
1.4.	Fitoplankton .....	3
1.4.1.	Dijatomeje.....	4
1.4.2.	Struktura zajednice fitoplanktona u Sjevernom Jadranu .....	8
1.5.	Prilagodbe fitoplanktona na ograničenje fosfora .....	10
1.6.	Alkalna fosfataza.....	11
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3.	MATERIJALI I METODE.....	13
3.1.	Odabrane dijatomejske vrste .....	13
3.2.	Identifikacija istraživanih vrsta .....	13
3.2.1.	Morfološka identifikacija vrsta.....	13
3.2.2.	DNA barkodiranje .....	14
3.3.	Priprema medija za uzgoj kultura i eksperimentalni dizajn .....	18
3.4.	Određivanje abundancije stanica i praćenje morfoloških promjena .....	18
3.5.	Mjerenje intenziteta fluorescencije klorofila.....	19
3.6.	Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze.....	19
3.7.	Kinetika enzima alkalne fosfataze.....	20
3.8.	Mjerenje koncentracije fosfata .....	21
3.9.	Obrada podataka.....	21
4.	REZULTATI.....	22
4.1.	Taksonomska identifikacija dijatomejskih vrsta (mikroskopija i barkodiranje).....	22
4.2.	Morfološki i fiziološki odgovor dijatomejskih vrsta.....	28
4.2.1.	<i>Thalassiosira</i> cf. <i>eccentrica</i> (Ehrenberg) Cleve 1904 .....	28
4.2.2.	<i>Thalassionema</i> cf. <i>frauenfeldii</i> (Grunow) Tempère i Peragallo 1910.....	32
4.2.3.	<i>Synedra</i> sp.....	35
3.	RASPRAVA.....	38
5.1.	<i>Thalassiosira</i> cf. <i>eccentrica</i> . .....	38
5.2.	<i>Thalassionema</i> cf. <i>frauenfeldii</i> .....	39
5.3.	<i>Synedra</i> sp. ....	40
5.4.	Usporedba odgovora između vrsta .....	41



4. ZAKLJUČAK.....	42
5. LITERATURA .....	43
6. ŽIVOTOPIS.....	52

## Popis korištenih kratica

APA- alkalna fosfataza

f/2 - medij obogaćen fosforom (Andersen, 2005)

MUF-P – metilumbeliferil fosfat

MU- metilumbeliferon

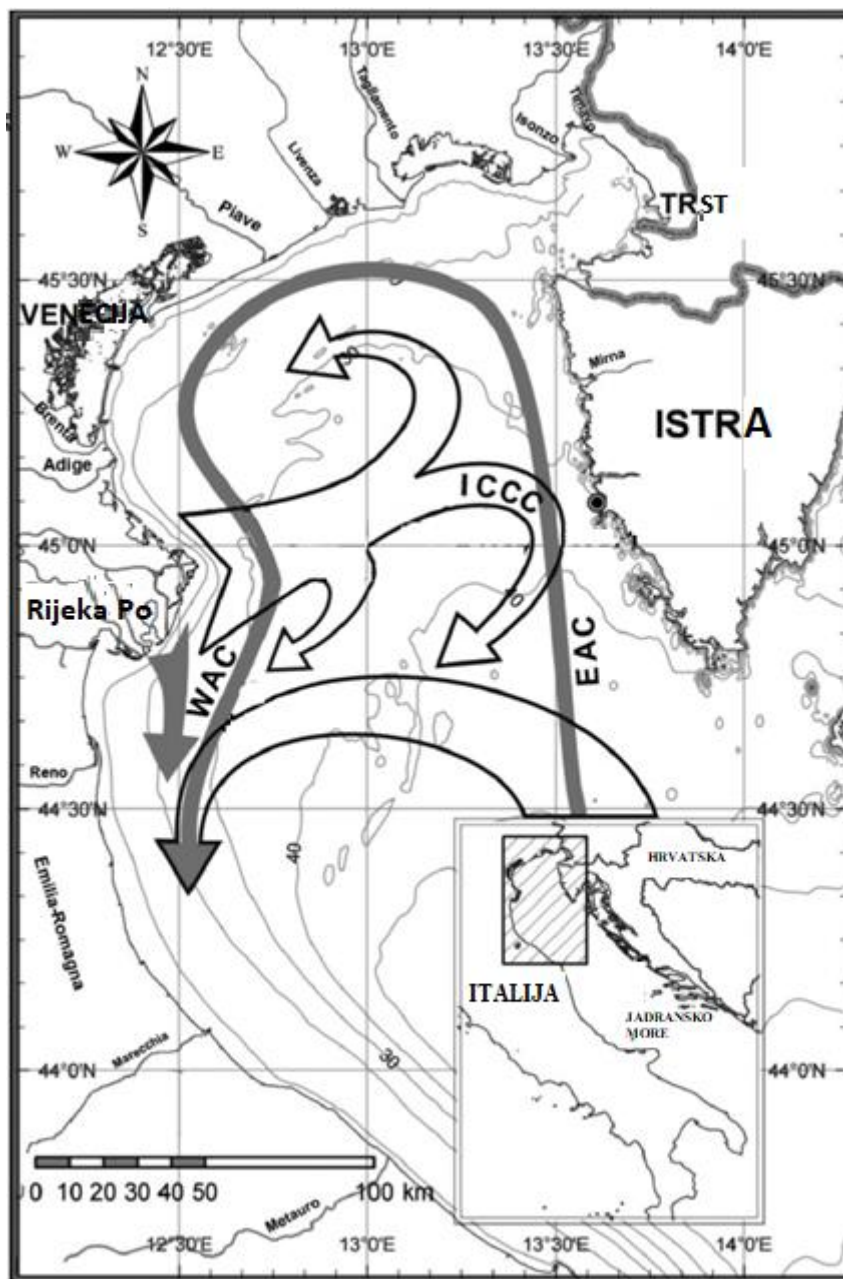
# 1. UVOD

## 1.1. Jadransko more

Jadransko more predstavlja najsjeverniji dio mediteranskog bazena. Longitudinalno se dijeli na sjeverni, srednji i južni Jadran a transverzalno na istočnu i zapadnu obalu. Zone se međusobno razlikuju po hidrografskim obilježjima (Franco i Michelato, 1992, Jeffries i Lee, 2007, Orlić i sur., 1992, Polimene i sur., 2007), te distribuciji planktona (Smodlaka, 1986, Viličić, 1991). Sjeverni Jadran je kao područje šelfa najplići s maksimalnom dubinom od 60 m a njegova oceanografska svojstva oblikuju brojni slatkovodni dotoci rijeka te vjetrovi (Mosetti i Lavenia, 1969) od kojih se najviše ističu utjecaj rijeke Po (Chiaudani i sur., 1980, Degobbis i Gilmartin, 1990) i bure (Poulain i Raicich, 2001).

## 1.2. Kruženje nutrijenata u Jadranu

Ulijevanjem rijeke Po uz zapadnu obalu nastaje zapadno jadranska struja koja nosi nutrijente u smjeru juga, stvarajući pritom ciklonalno strujanje (Poulain i Raicich, 2001). S druge, istočne strane teče slaba i oligotrofna istočnojadranska struja u smjeru sjevera koja se na 50 m izobate poprečno spaja sa zapadno jadranskom strujom (Poulain i Raicich, 2001) (Slika 1). Veliki nutritivni unosi se događaju u proljeće i jesen kada je vodostaj rijeke Po viši uslijed otapanja snijega u Alpama i Apeninima te povećane precipitacije dok zimi bura dubokim miješanjem izdiže pridnene vodene mase remineralizirane nutrijentima i homogenizira cijeli vodeni stupac (Giani i sur., 2012). Zbog navedenih procesa se od proljeća do zime stvara nutritivni gradijent (od zapada u smjeru istoka) kojeg prati fitoplanktonska zajednica (Smodlaka, 1986, Viličić, 1991, Polimene i sur., 2007) dok se na istočnoj strani zbog navedenog gradijenta primarna proizvodnja oslanja na proces remineralizacije (Giani i sur., 2012) ali i na krške rijeke koje u more otpuste oko 12% ukupnog dušika i 5% ukupnog fosfora (Cozzi i Giani, 2011).



Slika 1- Prikaz Istočnojadranske struje (*Eastern Adriatic current, EAC*), zapadnojadranske struje (*Western Adriatic current, WAC*) te istarske obalne protustruje (*Istrian coastal counter current, ICCC*) u sjevernom Jadranu (preuzeto iz Giani i sur., 2012).

### 1.3. Ograničenje fosforom u moru i sjevernom Jadranu

Fosfor je element koji je kao sastavnica DNA, RNA, ATP-a te drugih važnih struktura esencijalan za odvijanje života (Ruttenberg, 2003). Izvori fosfora na zemlji su stijene, zemlja i sedimenti, međutim u takvom obliku on nije dostupan organizmima za korištenje. Geološkim procesima i biokemijskim reakcijama se takav fosfor pretvara u ortofosfat kojeg

organizmi već mogu iskoristiti. Fosfor se u more doprema u otopljenom i čestičnom obliku primarno putem rijeka potom preko aerosola, vulkanskog pepela i mineralne prašine. Potonji izvori su važniji za udaljene dijelove otvorenog oceana s obzirom da se čestični fosfor dopremljen rijekama zadrži na području šelfa (Beusen i sur., 2005; Seitzinger i sur., 2005). Nakon što dospije u vodeni ekosustav, otopljeni fosfor bude konzumiran od strane fitoplanktona, a bakterijskom razgradnjom organske tvari se on regenerira. Proces regeneracije se odvija u vodenom stupcu a u plitkim područjima poput estuarija i šelfa veliku ulogu u procesu ima sediment (Cozzi i sur., 2020; Fisher i sur., 1982). Iako je u morima generalno dušik ograničavajući faktor fotosinteze (Tyrell, 1999), u nekim estuarijima ali i morima poput Jadrana je to fosfor (Fisher i sur., 1982; Ivančić i sur., 2016). Iako Dinaridi godišnje zaprime više od 1000 mm oborina (Gajić-Čapka i sur., 2003), krške su rijeke i vrulje siromašne hranjivim tvarima. Usprkos tome što distribucija i dostupnost fosfora utječu na primarnu proizvodnju ali i na strukturu ekosustava, primarna proizvodnja sjevernog Jadrana je i dalje aktivna a razlog tomu su razne prilagodbe fitoplanktona.

#### 1.4. Fitoplankton

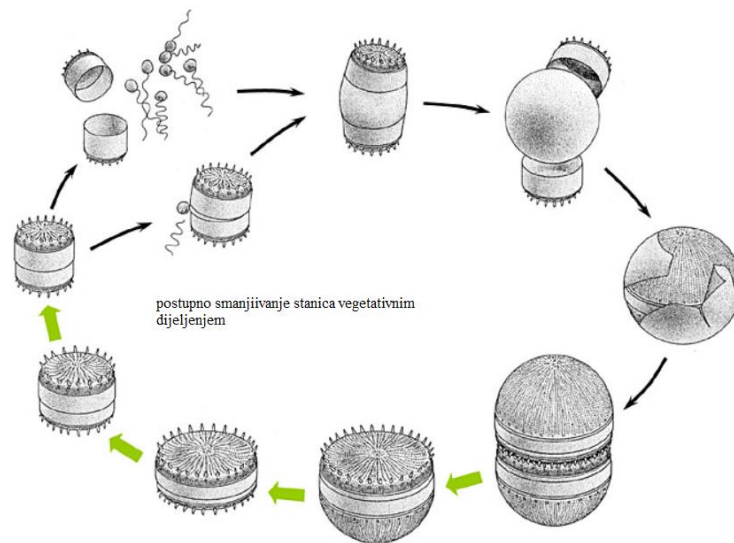
Termin fitoplankton obuhvaća slobodno plutajuće jednostanične ili kolonijalne alge a najvažniji predstavnici su dijatomeje, dinoflagelati i kokolitoforidi. Dijatomeje preferiraju visoku koncentraciju nutrijenata i homogenizirani vodeni stupac dok dinoflagelatima pogoduje stratificirani vodeni stupac i niža koncentracija nutrijenata. Kokolitoforidi se po preferencijama nalaze između dijatomeja i dinoflagelata. Prema veličini zauzimaju slijedeće kategorije: pikofitoplankton (0,2-2  $\mu\text{m}$ ), nanofitoplankton (2-20  $\mu\text{m}$ ), mikrofotoplankton (20-200  $\mu\text{m}$ ), mezofitoplankton (0,2-20 mm) i makrofotoplankton (2-20 cm) (Sieburth i sur., 1978). Obitavaju u eufotičkoj zoni (do 200 m), odnosno u zoni do koje dopire najviše sunčeve svjetlosti a zasjenjenu dijatomejsku floru možemo pronaći i u afotičkoj zoni na dubinama od 400 m (Bosak i sur., 2016). Pronalazimo ih u vodenom stupcu ili morskom dnu, a život mogu provesti kao neritičke ili pelagijalne. Kao fotosintetski organizmi imaju veliku ulogu u globalnom ciklusu ugljika putem biološke pumpe (protok  $\text{CO}_2$  iz atmosfere u vodu). Fitoplankton fiksira  $\text{CO}_2$  u eufotičkoj zoni i preko trofičke mreže ga prenosi u dublje dijelove mora uklanjajući tako 75%  $\text{CO}_2$  s površine. No, ne dospije sav  $\text{CO}_2$  s površine na dno već samo jedan mali dio jer se  $\text{CO}_2$  u najvećem dijelu reciklira unutar mikrobne hranidbene mreže. To je hranidbena mreža koja uključuje primarne proizvođače, zooplankton, heterotrofne bakterije i cilijate. Većim fitoplanktonom i cilijatima se hrani zooplankton dok se bakterije hrane partikularnim (particulate organic carbon, POC) i otopljenim organskim

ugljikom (dissolved organic carbon, DOC) koji u okoliš dopijeva fitoplanktonskom proizvodnjom i razgradnjom. Struktura trofičke mreže kao i abundancija pojedinih komponenti determinira efikasnost biološke pumpe (Chisholm, 1995). Dostupnost fosfora utječe na fitoplanktonsku proizvodnju pa samim time može snažno utjecati i na ciklus ugljika odnosno na sekvestraciju atmosferskog ugljičnog dioksida čime se smanjuje efikasnost pohrane viška globalnog CO<sub>2</sub> u mora i oceane. Osim toga, može utjecati i na sastav fitoplanktona što mijenja dinamiku mikrobnog kruga. Ekološki najvažnija skupina fitoplanktona su dijatomeje, odgovorne za 40% primarne proizvodnje u moru i gotovo jednu četvrtinu primarne proizvodnje na Zemlji (Falkowski i sur., 1998).

#### 1.4.1. Dijatomeje

Dijatomeje pripadaju u supergrupu SAR (akronim dolazi od skupina Stramenopila, Alveolata i Rhizaria), skupinu Heterokontophyta, razred Bacillariophyceae. Nekadašnja gruba morfološka podjela na centrice i penate se izmijenila nakon molekularnih filogenetskih analiza. Danas ih dijelimo na tri grane: radijalne centrice (Coscinodiscophyceae), bi/multipolarne centrice (Mediophyceae) i penate (Fragillariophyceae i Bacillariophyceae). Penatne dijatomeje se dijele u odnosu na rafu, centralni žljeb na ljušturici u koji se luči sluz koja omogućuje dijatomeji da klizi po površini, pa tako imamo one koje ne posjeduju rafu – arafidne (Fragillariophyceae), i one koje ju posjeduju – rafidne (Bacillariophyceae). Posebna karakteristika dijatomeja je da stvaraju staklenu ljušturicu, frustulu, deponiranjem SiO<sub>2</sub> u vakuole. Ljušturica se sastoji od dva dijela, veće epiteke i manje hipoteke koje su povezane pojasom (cingulum). Kod svake vrste je specifična pa se izgled pojedinih struktura na ljušturici koristi kao identifikacijski ključ. Većim dijelom životnog ciklusa se razmnožavaju mitotičkom diobom (Slika 2) pa se veličina stanice smanjuje sve do kritične veličine kada se uključuje spolno razmnožavanje i putem auksospore obnavlja prvotna veličina. Povećanje frustule u vegetativnoj fazi zabilježeno je tek kod nekoliko centrica i penata. Spolno razmnožavanje mogu inducirati i specifična temperatura i duljina dana, nedostatak ključnog nutrijenta ili pojava spolnog partnera. Pojava mirujućih stanica (engl. resting cells) je uobičajena dok samo neki taksoni stvaraju mirujuće spore (engl. resting spores) koje se morfološki razlikuju od vegetativnih stanica (Kooistra i sur., 2007). Kao rezervnu tvar pohranjuju ulje i krizolaminarin. Od pigmenata posjeduju klorofil *a*, klorofil *c*, betakaroten, fukoksantin, diatoksantin, diadinoksantin (Round i sur., 1992). Mogu biti kolonijalne ili

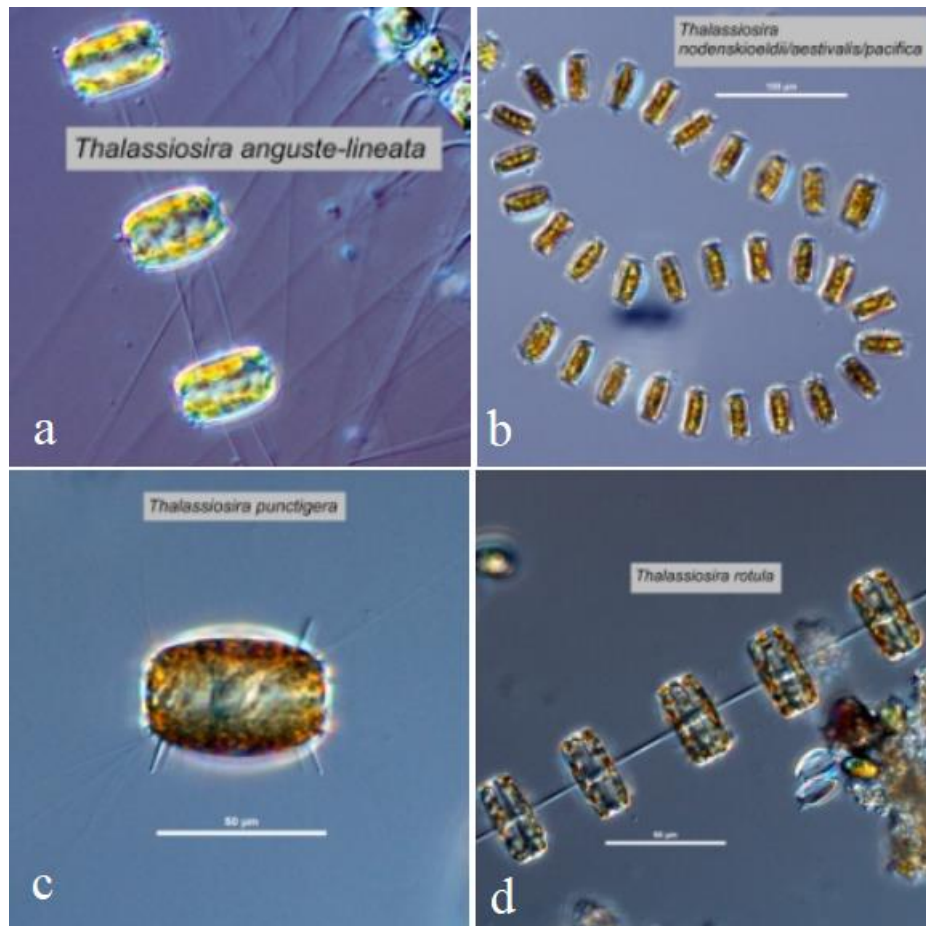
solitarne. Neke mogu stvarati i lančaste strukture a prema stilu života ih dijelimo na pelagičke ili bentičke.



Slika 2 - Ilustracija vegetativnog razmnožavanja i nastanak aoksospore (spolno razmnožavanje) na primjeru centrica (preuzeto iz Round i sur., 1992).

#### 1.4.1.1. *Thalassiosira*

Centrične dijatomeje cilindričnog, diskoidnog oblika iz razreda Coscinodiscophyceae reda Thalassiosirales. Nakon roda *Chaetoceros*, rod s najvećom vrsnom raznolikošću od otprilike 100 vrsta. Filogenetska rekonstrukcija rodoslovnog stabla analizom 18S rDNA markera je pokazala da vrste roda ne stvaraju jedinstvenu skupinu već se dijele u tri grupe. Osim po karakterističnim strukturama na frustuli, vrste se međusobno mogu razlikovati po obliku stanice i po prisutnosti odnosno izostanku lanaca (Slika 3) ili kolonija – stanice povezane želatinoznom amorfnom masom (Hoppenrath i sur., 2007). Prisutno je spolno i nespolno razmnožavanje. Kod nekih vrsta su prisutne mirujuće spore (engl. resting spores) (Cupp, 1943). Obitava u neritiku umjerenih i hladnih mora. Iako je rod prisutan tokom cijele godine, najznačajniji je doprinos proljetnom cvjetanju fitoplanktona u Sjevernom moru (Hoppenrath i sur., 2007).

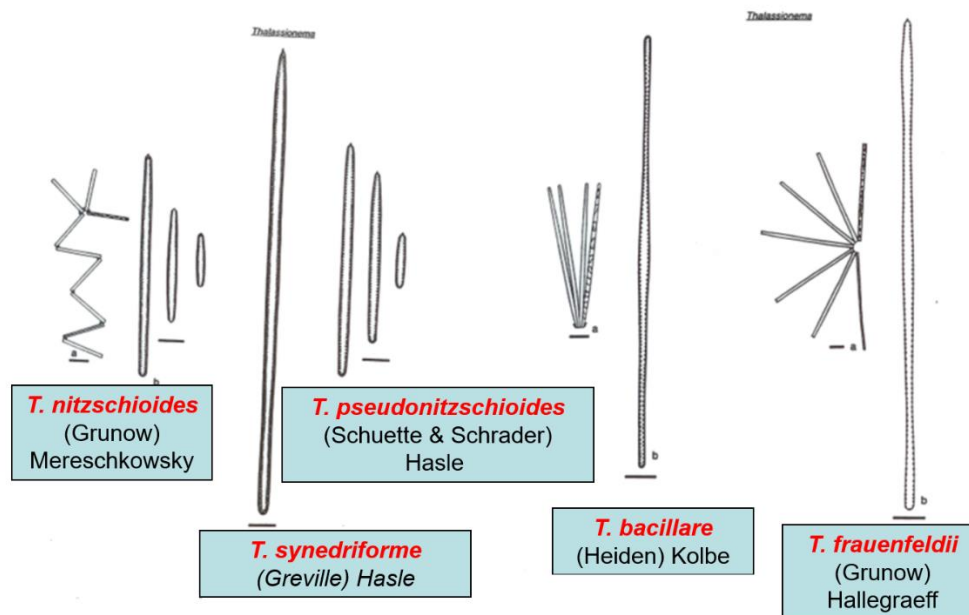


Slika 3 - Prikaz vrsta roda *Thalassiosira* koje stvaraju lance: *Thalassiosira anguste-lineata* (a), *T. nordenskiöldii/aestivalis/pacifica*, *T. punctigera* (c) i *T. rotula* (d) ([www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/diatoms/centric/thalassiosira/thalassiosira\\_genus.html?fbclid=IwAR0G9AfayIHXDTtHOKiquBRoQ4cgXvIcgG6k6\\_XL3-1CVJG14bCjIg-OA\\_Q](http://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/diatoms/centric/thalassiosira/thalassiosira_genus.html?fbclid=IwAR0G9AfayIHXDTtHOKiquBRoQ4cgXvIcgG6k6_XL3-1CVJG14bCjIg-OA_Q)).

#### 1.4.1.2. *Thalassionema*

Vrste roda *Thalassionema* su penatne dijatomeje igličastog oblika. Pripadaju razredu Bacillariophyceae, redu Thalassionematales. Raspon veličine stanica od nekoliko  $\mu\text{m}$  sve do nekoliko milimetara. Kloroplasti su im mali i brojni. Žuto smeđe boje, solitarne ali češće stvaraju „cik - cak” lance međusobno povezane organskom tvari (Slika 4). Kolonije su prisutne kod svih porodica ali ne i svake vrste. Polovi stanica mogu biti istog oblika (izoplolarni) ili se međusobno razlikuju (heteropolarni). Prisutno je spolno i nesporno razmnožavanje. Isključivo su morske i planktonske, prisutne u svim morima. Zabilježene su velike abundancije porodica *Thalassiothrix* i *Trichotoxon* u subpolarnim i polarnim morima a u subtropskim morima porodice *Lioloma*. Pretpostavlja se da je rod prisutan svugdje u velikim abundancijama (Hasle, 2001).

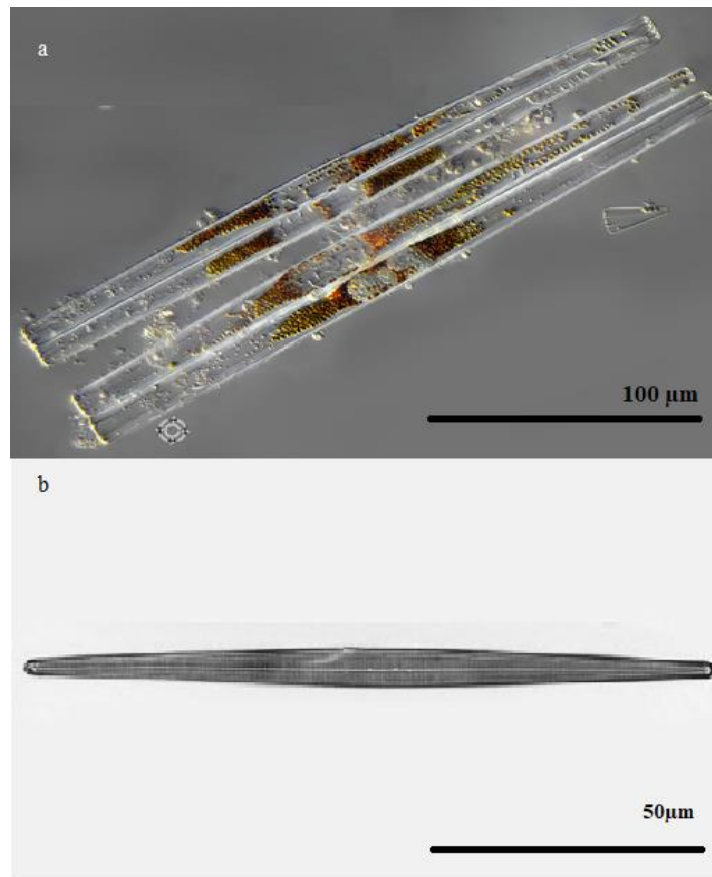




Slika 4 - Prikaz veličinskih odnosa i tipičnih kolonijalnih formacija kod nekoliko vrsta roda *Thalassionema* (preuzeto iz Thomas, 1997).

#### 1.4.1.3. *Synedra*

Penatne dijatomeje, izduženog oblika (Slika 5) iz razreda Bacillariophyceae reda Fragilariales. Vrste ne posjeduju rafu. Mogu stvarati kolonije tako da su stanice radijalno povezane a rijede da su povezane cijelom površinom valve (Round i sur., 1992). Slatkovodne su i morske. Vrste su većinom velike i mogu dosegnuti dužinu od 430  $\mu\text{m}$  (Guiry i Guiry, 2021). Od zabilježenih 363 vrsta smatra se validnim njih 153 (Guiry i Guiry, 2021).



Slika 5 - (a) Primjer karakterističnog izduženog oblika i veličine kod vrste *Synedra fulgens* (Greville) W.Smith 1853 (b) *Synedra laevigata* Grunow 1877 (preuzeto iz: <https://planktonnet.awi.de>; Guiry i Guiry, 2021).

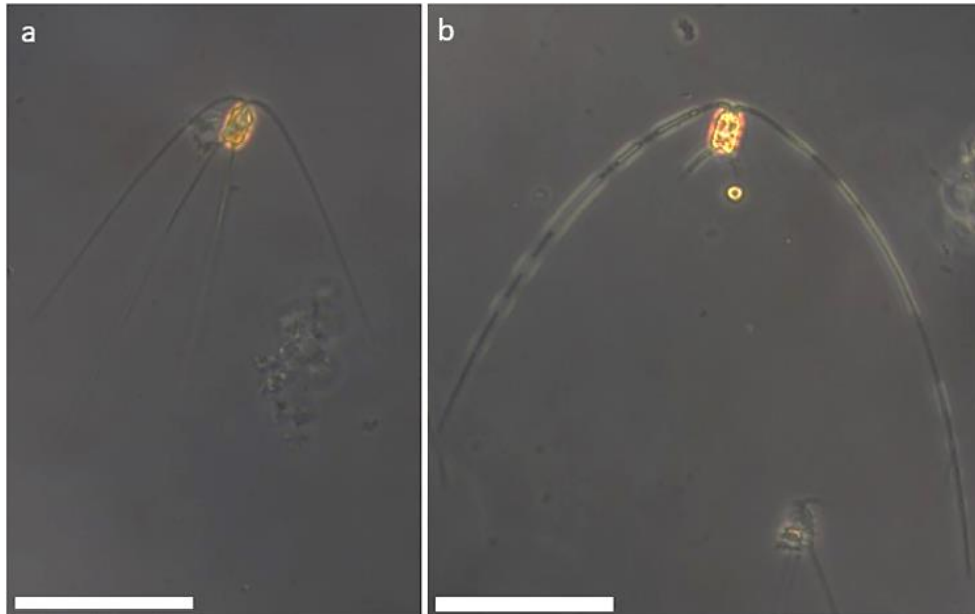
#### 1.4.2. Struktura zajednice fitoplanktona u Sjevernom Jadranu

Rijeka Po značajno utječe na prostornu varijabilnost planktonske biomase i njegove abundancije sjeverozapadnog Jadrana (Bernardi Aubry i sur., 2006; Mangoni i sur., 2008) dok je na sjeveroistočnoj strani njen utjecaj slabiji a morski stupac homogeniji (Godrijan i sur., 2013). Posljedično, na istočnoj strani je i planktonski sastav drugačiji što je prema autorima Mangoni i sur., (2008) kompenzacija za nedostatak nutrijenata ali i posljedica drugačijih hidrografskih uvjeta. Sveukupna abundancija planktona za vrijeme istraživanja autora Godrijan i sur. (2013) pokazala se za red veličine manjom nego na ulazima u venecijansku lagunu (Bernardi Aubry i Acri, 2004) dok je u odnosu na srednji i južni Jadran (Totti i sur., 2000; Viličić i sur., 2009) abundancija slična. Područje je bogato vrstama a njihova prisutnost se mijenja gotovo na mjesečnoj bazi, ovisno o njihovim nutritivnim i okolišnim preferencijama koje se razlikuju od vrste do vrste. Prema istraživanju autora

Viličić i sur., (2009) fitoplanktonskom zajednicom sjeveroistočnog Jadrana dominiraju dijatomeje rodova *Chaetoceros*, *Pseudo-nitzschia*, *Proboscia*, *Rhizosolenia*, *Pseudosolenia*, *Cerataulina*, *Leptocylindrus* i *Thalassionema*, dok su od dinoflagelata najviše prisutni rodovi *Ceratium*, *Dinophysis* i *Prorocentrum*. Iako je za umjerena mora karakteristična bimodalna fitoplanktonska cvatnja u proljeće i jesen (Legendre, 1990) za sjeverni Jadran su zabilježene čak četiri velike cvatnje i to u veljači, svibnju, lipnju i rujnu (Bernardi Aubry i sur., 2012). U svim cvatnjama dominiraju dijatomeje (Marić i sur., 2012) pa čak i ljeti pri stratificiranom morskom stupcu (Varela i sur., 2008). U svibnju doduše kodominiraju s nanoflagelatima (Bernardi Aubry i sur., 2012; Mozetič i sur., 2012). Dinoflagelati dosežu ljetni maksimum na otvorenom moru (Totti i sur., 2000), dok su u obalnim vodama venecijanske lagune ipak dijatomeje brojnije (Bernardi Aubry i Acri, 2004). Prema Revelante i Gilmartin (1976) proljetni maksimum sjeveroistočnog Jadrana je slabije izražen od onog na sjeverozapadnoj strani što se može povezati sa smanjenjem broja dijatomeja koje je dovelo do pomaka proljetnog maksimuma na ljeto (Marić i sur., 2012; Mozetič i sur., 2012). Proljetne vrste najbolje uspijevaju pri niskom salinitetu i miješanom vodenom stupcu. Od dinoflagelata je prevladavao rod *Ceratium*, i vrsta *Prorocentrum micans* a od dijatomeja *Leptocylindrus minimus* koja je značajno korelirala s niskom koncentracijom silikata (Godrijan i sur., 2013). Ljetne vrste preferiraju toplije more s niskom koncentracijom nitrata i silikata dok jesenskim vrstama najviše paše visoka koncentracija nutrijenata. Predstavnici ljetnih kokolitoforida su *Rhabdosphaera clavigera* i *Syracosphaera pulchra* dok ljetne dijatomeje predstavlja *Chaetoceros vixvisibilis*. Jesenske kokolitoforide *Asterionellopsis glacialis* i *Calciosolenia murrayi* a dijatomeje *Pseudo-nitzschia*, *Paralia sulcata*, *Ophiaster hydroideus* i *Dictyocha fibula*. Zimske vrste karakteristične su po tome što vole hladne temperature mora i ne smeta im miješanje stupca vode a dominiraju velike dijatomeje: *Thalassiosira rotula*, *Neocalyptrella robusta* i *Skeletonema marinoi* i kokolitoforid *Emiliania Huxley* koja je tada imala najveću abundanciju (Godrijan i sur., 2013) a prisutna je tokom cijele godine (Bernardi Aubry i sur., 2006). Prema Bernardi Aubry i sur. (2006) se sezonalni fitoplanktonski sastav sjevernog Jadrana nije značajno promijenio tokom godina. *Thalassionema nitzschioides* je jedna od sveprisutnih vrsta koja pozitivno korelira sa svim nutrijentima pa ne iznenađuje što dominira u područjima izranjanja (Bode i sur., 2005). Osim vrsta roda *Thalassionema*, tokom cijele godine možemo naići i na *Dactyliosolen fragilissimus*, *Cerataulina pelagica* i *Guinardia striata*.

## 1.5. Prilagodbe fitoplanktona na ograničenje fosfora

U fitoplanktonskoj zajednici Jadranskog mora dominiraju dijatomeje (Aubry i sur., 2012) a s obzirom na okoliš nedostaje im anorganskog fosfora. Brojne studije pokazuju da je sjeverni Jadran limitiran fosforom čija je koncentracija rijetko veća od 0,1 mol/l (Buljan i Zore-Armada, 1976) no dodatno je obogaćen nutrijentima koji pristižu rijekom Po čiji su ukupni fosfor (TP) i ukupni dušik (TN) za red veličine veći nego u sjevernom Jadranu (Ivančić i sur., 2012). Međutim, koncentracije anorganskog dušika i fosfora koje unese Po, u omjeru 84:1 (Cozzi i Giani, 2011), nepovoljne su za fitoplanktonsku zajednicu čiji je idealan omjer N : P = 16 : 1 (Redfield i sur., 1963). Nepovoljni omjeri N:P u okolišu kod nekih dijatomeja aktiviraju enzim alkalne fosfataze (APA) čime one uspiju sebi stvoriti dovoljno anorganskog fosfata za preživljavanje, međutim kako ta pojava nije zabilježena kod svih vrsta, pretpostavlja se da se takve vrste okoriste produktima APA enzima drugih dijatomeja ili bakterija (Ivančić i sur., 2016). Neke dijatomejske vrste su se ipak prilagodile na način da smanje volumen stanice čime se odnos volumena i površine stanice povećava u korist površine što omogućuje veću produkciju APA enzima (Ivančić i sur., 2012). Osim smanjenja volumena, neke mogu i povećati površinu stanice i na taj način stvoriti više prostora za enzim kao što je to slučaj kod vrste *Chaetoceros peruvianus* Brightwell prikazane na Slici 6 (Smodlaka Tanković i sur., 2018) Također može doći do metaboličkih promjena gdje se fitoplankton prilagođava nestašici anorganskog fosfora promjenom sastava membrana na način da se umjesto fosfolipida ugrađuju nefosfolipidi radi povećanja biomase u kombinaciji s APA enzimom koji stanicu snabdijeva s dovoljno fosfata za primarnu proizvodnju (Ivančić i sur., 2012). Zabilježene su i promjene u ekspresiji proteina (Brembu i sur.2017; Feng i sur 2015) te smanjen omjer ATP-a i klorofila (Culture, 1976; Science, 2013). Biokemijski sastav dakle utječe na stopu rasta što odražava fiziološki potencijal primarne proizvodnje. Iako molekule klorofila ne sadrže fosfor, redukcija fotosinteze se događa uslijed smanjene dostupnosti anorganskog fosfora koji je potreban za sintezu ATP-a. Manjak ATP-a uzrokuje smanjenu apsorpciju fotona od strane klorofila i dovodi do potiskivanja sinteze klorofila (Alipanah i sur., 2018). Dakle, smanjena fluorescencija klorofila je jedna od prilagodbi koja upućuje na nedostatak anorganskog fosfora u stanici. Bilo koja od navedenih prilagodbi rezultira obično smanjenom abundancijom fitoplanktona u okolišu sa smanjenom koncentracijom anorganskog fosfora što nam potvrđuje njegovu važnost u oblikovanju ekosustava u morskom okolišu (Ivančić i sur., 2016).



Slika 6 - Stanice *Chetoceros peruvianus* u mediju f/2 s fosforom (a) i mediju bez fosfora (P-limit) (b). Veličina seta je vidljivo veća u P-limit mediju. Skala 20  $\mu\text{m}$  (preuzeto iz: Smodlaka Tanković i sur., 2018).

#### 1.6. Alkalna fosfataza

Enzimi alkalne fosfataze (APA) su skupina enzima (Boavida, 1990) koji kataliziraju reakciju cijepanja fosfodieterske veze u organskim spojevima i na taj način iz organskog fosfora stvaraju anorganski fosfor (Ivančić i sur., 2012). Zajedničko im je da se većinu vremena ponašaju po pravilima Michaelis-Mentenove kinetike a međusobno se razlikuju u konstantama poluzasićenja te optimalnoj temperaturi djelovanja i pH vrijednosti (Hoppe, 2003). Oni su vanstanični enzimi koji mogu biti vezani na stanicu ili pak slobodno plutati u moru. Kod dijatomeja, aktivnost enzima je regulirana unutarstaničnim omjerom dušika i fosfata (najpovoljniji omjer N:P= 16:1) (Myklestad i Sakshaug, 1983) ili koncentracijom dostupnog anorganskog fosfora (Ivančić i sur., 2016) što ovisi o godišnjem dobu (Huang i Hong, 1999) i taksonomskoj skupini (Casey i sur., 2009). Dakle, posjedovanje enzima alkalne fosfataze dijatomejama omogućuje preživljavanje u uvjetima nedostatka anorganskog fosfora čime se podržava velika primarna proizvodnja i u razdobljima smanjene koncentracije anorganskog fosfora a poznavanjem njegove koncentracije mogli bi predvidjeti i sastav fitoplanktonske zajednice koji uvelike utječe na mikrobnu hranidbenu mrežu, odnosno na biološku pumpu (Herndl i Reinthaler, 2013). Limitacija fosforom se prema autorima Ivančić i sur. (2016) ističe kao ključni faktor oblikovanja ekosustava u moru.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je promotriti i zabilježiti utjecaj ograničene koncentracije anorganskog fosfora u laboratorijskim uvjetima na različite razine prilagodbi dijatomeja vrsta *Thalassionema* sp., *Thalassiosira* sp. te *Synedra* sp.

Specifični ciljevi su:

1. Utvrditi koje vrste aktiviraju alkalnu fosfatazu u uvjetima ograničene koncentracije anorganskog fosfora i odrediti enzimatsku aktivnost alkalne fosfataze
2. Usporediti promjene stope rasta u uvjetima uzgoja obogaćenim i ograničenim s anorganskim fosforom
3. Usporediti promjene u intenzitetu fluorescencije klorofila u uvjetima uzgoja obogaćenim i ograničenim s anorganskim fosforom
4. Usporediti morfološke promjene u uvjetima uzgoja obogaćenim i ograničenim s anorganskim fosforom.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Odabrane dijatomejske vrste

Odabrane dijatomejske vrste korištene u laboratorijskim pokusima potječu iz Zbirke kultura Centra za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković, Rovinj, a navedene su u Tablici 1.

Tablica 1 - Vrste dijatomeja iz zbirke kultura Centra za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković, Rovinj, na kojima sam provodila eksperimente

Vrsta	Soj	Datum izolacije
<i>Thalassiosira</i> sp.	CIM920	26.11.2019.
<i>Thalassionema</i> sp.	CIM939	12.6.2020.
<i>Synedra</i> sp.	CIM938	14.5.2020.

Kulture su rasle u standardnom mediju f/2 za uzgoj morskih dijatomeja pripremljenom prema Guillardu (1975). Medij se priprema tako da se u steriliziranu morsku vodu dodaju određeni volumeni otopine silikata, teških metala, vitamina, nitrata i fosfata (Andersen, 2005).

#### 3.2. Identifikacija istraživanih vrsta

Sve odabrane vrste sam identificirala uz pomoć stručnog osoblja Centra za istraživanje mora prvo svjetlosnim mikroskopom i korištenjem stručne literature a potom ih i genski tipizirala metodom DNA barkodiranja.

##### 3.2.1. Morfološka identifikacija vrsta

Za klasičnu morfološku identifikaciju koristila sam invertni mikroskop Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss, Njemačka) opremljen s Nomarski diferencijalnim kontrastom (DIC), faznim kontrastom i optikom svijetlog polja uz pomoć ključeva koji pobliže opisuju morfološke karakteristike pojedinih vrsta (Round i sur., 1992; Berard-Therriault i Poulin, 1999; Thomas, 1996, 1997; Viličić, 2002). Za identifikaciju vrste iz roda *Thalassiosira* promatrao se oblik

valve (širina i visina). Stanice ovog roda su obično diskoidne, a valva može biti valovita. Stanice mogu biti u lancima povezanim polisaharidnim nitima ili pojedinačne. Za taksonomsku identifikaciju kod ovog roda važan je raspored nastavaka valve (fultoportula i rimoportula), veličina i pružanje areola, prisutnost središnjih aureola i anulus (karakteristike vidljive isključivo pomoću elektronskog mikroskopa). Kod određenih vrsta rubne fultoportule mogu također izlučiti polisaharidne niti, koje se šire radijalno što je često vidljivo i na svjetlosnom mikroskopu. (Hasle i Syvertsen, 1996).

Kod roda *Thalassionema* stanice su ravne i duge. U pleuralnom (bočnom) položaju su pravokutnog oblika. Ovaj rod često tvori kolonije cik cak ili perjastog oblika (Viličić, 2002). Uz rub valve je jedan red okruglih areola, a s unutarnje strane na rubu valve nalazi se rimoportula koja s vanjske strane valve prelazi u trnasti nastavak vidljiv na svjetlosnom mikroskopu. Kod roda *Synedra* stanice su pojedinačne, slobodne i izdužene u obliku igle. Valve su izdužene, valovite s proširenjem u središnjem djelu i na krajevima areole su razbacane po valvi. Kod morfoloških mjerenja mjerili smo dužinu valve i njezinu širinu u pleuralnom položaju.

### 3.2.2. DNA barkodiranje

Za taksonomsku identifikaciju vrsta koristila sam metodu DNA barkodiranja umnoženih odabranih regija gena ribosomske RNA (18S i 28S) i gena za veliku podjedinicu ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (*rbcL*). Podaci o početnicama i odabranim regijama DNA barkodiranja navedeni su u Tablici 2.



Tablica 2 - Početnice korištene za DNA barkodiranje 18S, 28S i ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaze (*rbcL*) regija dijatomeja korištenih u eksperimentu

AMPLIFICIRANA REGIJA	OZNAKA POČETNICE	SEKVENCA POČETNICE	VELIČINA FRAGMENTA (PB)	REFERENCA
18S rRNA	D978rev D512for	5'-GACTACGATGGTATCTAATC-3' 5'-ATTCCAGCTCCAATAGCG-3'	400	Zimmermann i sur., 2011
28S rRNA	D1R D3Ca	5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3' 5'-ACGAACGATTTGCACGTCAG-3'	800	Bruder i Medlin, 2007; Scholin i sur. 1994
<i>rbcL</i>	rbcL66+ DtrbcL3R	5'- TTAAGGAGAAATAAATGTCTCAATCTG- 3' 5'-ACACCWGACATACGCATCCA-3'	800	Alverson, 2008; MacGillivray i Kaczmarska, 2011

DNA vrste za metodu barkodiranja sam izolirala zadnji dan eksperimenta nakon što sam izmjerila kinetiku enzimske reakcije. DNA sam izolirala na način da sam prvo filtrirala po 40 mL (~1000 stanica/mL) dijatomejskih kultura na 1.2 µm celulozne filtere (Merck Millipore) a potom filtere zamrznu na -80 °C do vremena izolacije DNA. Genomsku DNA sam izolirala komercijalnim kitom DNeasy® Plant Mini kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Ukratko, postupak izolacije genomske DNA uključivao je sljedeće korake: razaranje stanica (talog kultura prikupljen na filterima) inkubacijom u puferu za lizu 1 h na 65 °C, specifično vezanje DNA za silikatni matriks kolonika kita, ispiranje vezane DNA te eluiranje DNA sa matriksa kolonice u 50 µL TE pufera (10 mM hidroksimetil aminometan hidroklorid (Tris-Cl), 0.5 mM etilendiamintetraacetata (EDTA), pH 9.0). Uz pomoć nanofotometra (Implen, NanoPhotometer® P/Class (P300/P330/P360) spektrofotometrijski sam odredila koncentraciju i čistoću izolirane genomske DNA. Regije sam umnožila reakcijom lančane polimeraze (PCR) u termocikleru marke C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany) prema programu iz Tablice 3.

Tablica 3 - Program amplifikacije lančanom reakcijom (PCR) po kojem su umnožene ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (*rbcL*), 18S i 28S regije svih vrsta dijatomeja

TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (minute)	BROJ CIKLUSA
95	5'	1
95	30''	33
50	40''	33
72	1'	33
72	7'	1
4	∞	

PCR reakcije su se odvijale u reakcijskom volumenu od 25  $\mu$ L sa svim sastavnicama navedenim u Tablici 4. Uspješnost PCR reakcija provjerila sam metodom elektroforeze u agaroznom gelu koja omogućava odvajanje DNA molekula primarno na osnovi njihove veličine. PCR produkti su bili veličine do 1 kb pa sam elektroforezu provela u 1% agaroznom gelu. Uspješno amplificirani PCR produkti (barkodovi) su pročišćeni pomoću komercijalnog kita NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) prema uputama proizvođača te poslani u MacroGen Europe (Nizozemska) na sekvenciranje Sangerovom metodom. Pročišćavanje PCR produkata uključivalo je korake: miješanje PCR reakcijske smjese sa puferom za uspješno vezanje PCR produkata na matriks kolonica kita, vezanje PCR produkata na matriks kolonica, ispiranje vezanih PCR produkata i njihovo eluiranje sa kolonica u 15  $\mu$ L Tris pufera (10 mM Tris-Cl). Svaki PCR produkt sekvenciran je iz oba smjera te su samo konsenzus sekvence visoke kvalitete (kvaliteta kromatograma određuje svaku nukleotidnu poziciju) i dužine (ukupna dužina barkoda) korištene u daljnjim analizama. Konsenzus sekvence obrađene su i analizirane koristeći bioinformatičke programe (MEGA7 i Geneious) (Kumar i sur., 2016, Kearse i sur., 2012) i javno dostupne baze podataka sekvenci (GenBank i Silva) (Clark i sur., 2016, Quast i sur., 2013).

Tablica 4 - Finalne koncentracije i volumeni komponenti reakcijske smjese koju sam koristila za amplifikaciju lančanom reakcijom polimeraze (PCR) veliku podjedinicu ribuloze 1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (*rbcL*), 18S i 28S regija.

KOMPONENTA	FINALNA KONCENTRACIJA	REAKCIJSKI VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )
10X PCR pufer	1x	2.5
dNTP smjesa (10 mM od svakoga)	0.2mM od svakog	0.5
početnica F (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{M}$	1.25
početnica R (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{M}$	1.25
Taq DNA polimeraza (5 U/ $\mu\text{L}$ )	2.5 U po reakciji	0.5
PCR H <sub>2</sub> O	2.5 U/ reakcija	13
Q otopina za stabilizaciju kalupa (5x)	1x	5
DNA kalup (gDNA)	$\leq 5$ ng	1
<b>KONAČNI VOLUMEN</b>		<b>25</b>

Višestruka sravnjenja sekvenci provela sam koristeći MAFFT program (Kato i Standley, 2013). Dobivena sravnjenja ručno sam editirala kako bi sve sekvence regije barkoda bile jednake duljine. Sravnjenja poznatih sekvenci iz baza podataka i sekvenci barkodova koje sam dobila u ovom radu provela sam odvojeno za svaku istraživanu vrstu i svaki korišteni barkod. Za konstrukciju filogenetskih stabala koristila sam metodu najveće vjerojatnosti (maximum likelihood - ML), supstitucijski model Kimura uz metodu samoučitavanja („bootstrap“) u 1000 ponavljanja i program PhyML (Guindon i sur., 2010). Pretraživanja

baza podataka i preuzimanja dostupnih sekvenci provedena su 15.12.2020. Bioinformatičku obradu sam napravila uz pomoć stručnog osoblja Centra za istraživanja mora.

### 3.3. Priprema medija za uzgoj kultura i eksperimentalni dizajn

Kulture sam uzgajala u dvije vrste medija:  $f/2$  i  $f/2$  bez dodatka fosfata,  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  (P-limit) prema Andersen (2005).  $f/2$  medij je standardni medij za uzgoj morskih dijatomeja pripremljen prema Guillardu (1975) a priprema se tako da se u steriliziranu morsku vodu dodaju određeni volumeni otopine silikata, teških metala, vitamina, nitrata i fosfata. P-limit medij sam pripremila po istoj recepturi kao i  $f/2$  medij samo što sam izostavila fosfor. Oba medija sam pripremila s morskom vodom sjevernog Jadrana koja je najmanje 2 mjeseca stajala u mraku, dva puta je bila filtrirana kroz sterilni filter veličine  $0.22 \mu\text{m}$  (Merck Milipore Ltd.) i prokuhana (Keller i sur., 1988). Za svaki medij sam postavila triplikate kulture i uzgojne bočice označila sa  $f/2$  I,  $f/2$  II,  $f/2$  III odnosno P-limit I, P-limit II i P-limit III. Svaki triplikat sam inokulirala s 2 mL početne kulture za svaku vrstu i određena je abundancija stanica za pojedinu kulturu. Stanice su uzgajane u 200 mL medija u ventilirane uzgojne bočice od 250 mL. Za vrijeme trajanja eksperimenta (u minimalnom trajanju od 15 dana po kulturi), kulture su se držale u inkubatoru na  $16 \text{ }^\circ\text{C}$ , na intenzitetu svjetlosti od  $75 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sa izmjenom dana i noći svakih 12 sati. Mjerenja aktivnosti enzima APA sam provodila tri puta tjedno na način da sam uzimala dio uzorka (po  $200 \mu\text{L}$  u triplikatu iz svake kulture) iz medija obogaćenim s fosforom ( $f/2$ ) i medija ograničenim fosforom (P-limit) dok sam koncentraciju fosfata i fluorescenciju klorofila *a* mjerila prvi i zadnji dan eksperimenta. Vrijednosti klorofila *a* i enzima APA mjerena su fluorimetrijski dok su fosfati mjereni spektrofotometrijski u mikrotitarskim pločama na spektrofluorimetru Infinite M200Pro, Tecan GmbH, Austrija. Aktivnost APA enzima mjerila sam u 4 vremena: nakon 0, 10, 30 i 60 minuta (ukupno vrijeme reakcije 100 minuta). Koncentraciju fosfata sam izmjerila u dva vremena: nakon 10 i 50 minuta (ukupno vrijeme 60 minuta). Nakon toga se pod invertnim mikroskopom pratio rast stanica i morfološke promjene. Zadnji dan eksperimenta se mjerila kinetika enzimatske reakcije APA enzima.

### 3.4. Određivanje abundancije stanica i praćenje morfoloških promjena

Rast stanica pratila sam brojanjem stanica u komoricama Sedgewick- Rafter od 1 mL ( $20 \times 50$  polja) na mikroskopu Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss, Njemačka). Abundanciju stanica u kulturama izrazila sam u stanicama po L. Slikanjem s digitalnom kamerom Zeiss AxioCam

pratila sam morfološke promjene a pomoću računalnog programa istog proizvođača, AxioVision 4.8 (Zeiss, Njemačka), mjerila sam dužinu i promjer/širinu stanica (valve i pojasa-cinguluma). Statistički značajnu razliku dužine i promjera/širine stanica testirala sam t- testom u Microsoft Excel-u (MS Office 2016). Stopu rasta stanica izračunala sam po jednadžbi (1) gdje je  $K'$ - stopa rasta,  $\ln$ - prirodni logaritam,  $N_2$ - konačni broj stanica,  $N_1$ - početni broj stanica,  $t_2$ - vrijeme eksperimenta u danima,  $t_1$ - vrijeme eksperimenta u danima.

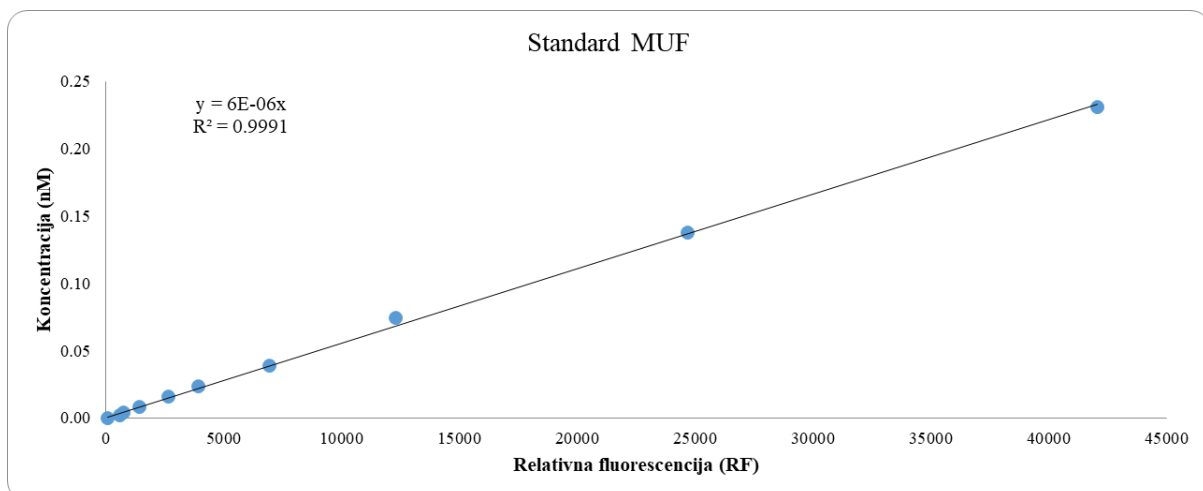
### 3.5. Mjerenje intenziteta fluorescencije klorofila

Intenzitet fluorescencije klorofila *a* mjerila sam u crnim mikrotitarskim pločama po 200  $\mu$ L kultura u triplikatu mjerenja za svaki pojedini triplikat kulture za oba uzgojna medija na spektrofluorimetru Infinite M200Pro, Tecan GmbH, Austrija. Fluorescencija je mjerena s ekscitacijskom valnom duljinom od 460 nm i emisijom na 685 nm a vrijednost je bila izražena u jedinici relativne fluorescencije (relative fluorescence unit, RFU). Konačna vrijednost fluorescencije je izračunata kao srednja vrijednost pojedinog triplikata kulture. Vrijednost fluorescencije po stanici je dobivena tako što je izračunat broj stanica u jažici koji je podijeljen sa srednjom vrijednosti pojedinog triplikata mjerenja za pojedinu kulturu. Broj stanica u jažici je dobiven na način da se broj stanica u litri (dobiven brojanjem u komoricama Sedgewick - Rafter od 1 mL) preračunao u broj stanica u 200  $\mu$ L. Mjerena je fluorescencija po stanici izražena je kao RF/stanici (relativna fluorescencija po stanici) i statistički značajna razlika u relativnoj fluorescenciji između dva uvjeta uzgoja u zadnjem danu.

### 3.6. Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze

Aktivnost APA mjerila sam u reakcijskom volumenu od 250  $\mu$ L (200  $\mu$ L kulture i 50  $\mu$ L substrata metilumbeliferil fosfata (MUF-P) koncentracije 50  $\mu$ M) u triplikatu mjerenja za svaki pojedini triplikat kulture za oba uzgojna medija. Prilikom svakog mjerenja upotrebljena je rastuća koncentracija produkata MUF (0-1500  $\mu$ M) koji nastaje razgradnjom supstrata MUF-P kao standard (Slika 7), opisano u radu Hoppe (1983). Standardna krivulja mi je potrebna za izračun koncentracije produkta razgradnje MUF-P u jažicama s uzorkom. Kao negativne kontrole koristili su se f/2 i P-limit čisti uzgojni medij, sterilizirana morska voda te deionizirana voda. Negativne kontrole su mjerene u triplikatima. Kao substrat za enzimatsku

reakciju se koristio MUF-P otopljen u 2-metoksietanolu i steriliziranoj morskoj vodi metodom po Hoppe-u (1983) finalne koncentracije 50  $\mu\text{L}$ . Fluorescencija je mjerena u relativnoj jedinici fluorescencije (RFU) na spektrofluorimetru s ekscitacijskom valnom duljinom od 375 nm i emisijom na 405 nm. Između svakog mjerenja, u vremenima 0, 10, 30, 60 minuta, pločice sam inkubirala na 16 °C u mraku kako bi se enzimatska reakcija odvija u uvjetima uzgoja. Rezultate sam izrazila u nM/s/stanici. Aktivnost po stanici u nM je dobivena tako što je izračunata srednja vrijednost relativne fluorescencije pojedinog triplikata mjerenja pojedine uzgojne kulture za oba uvjeta rasta i preračunata u nM po jažici pomoću standardne krivulje. Aktivnost APA enzima izražena je kao nagib enzimatske reakcije u vremenu od 100 minuta dok je broj stanica u jažici dobiven na način da se broj stanica u litri (dobiven brojanjem u komoricama Sedgewick - Rafter od 1 mL) preračunao u broj stanica u 200  $\mu\text{L}$ .



Slika 7- Standardna krivulja MUF standarda. Vrijednost standarda je izražena u relativnoj fluorescenciji (RF) za različite koncentracije MUF u nM.

### 3.7. Kinetika enzima alkalne fosfataze

Kinetiku alkalne fosfataze izmjerila sam kad su kulture ušle u stacionarnu fazu odnosno kada su najmanje dva puta za redom dosegle jednaku maksimalnu brzinu. Po proceduri iz rada od Labry i sur. (2005) pripremila sam reakcijsku smjesu od 200  $\mu\text{L}$  kulture i 50  $\mu\text{L}$  substata MUF-P različitih koncentracija (0.5 do 50  $\mu\text{M}$ ) koje sam ispipetirala na mikrotitarsku pločicu i aktivnost APA enzima mjerila u intervalima od 0, 10, 30 i 60 minuta. Za izradu standardne krivulje koristila sam rastuću koncentraciju produkata MUF (0-1500  $\mu\text{M}$ ) koji nastaje

razgradnjom supstrata MUF-P. Korištene su i negativne kontrole (F2 i P-limit medij, sterilna morska voda i deionizirana morska voda). Fluorescenciju sam mjerila na spektrofotometru za mikroploče Infinite® M200 PRO (Tecan Trading AG, Švicarska) pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 375 nm i emisijskoj valnoj duljini od 405 nm. Koncentraciju produkta enzimske reakcije u svakoj jažici sam izračunala pomoću standardne krivulje MUF.

### 3.8. Mjerenje koncentracije fosfata

Fosfate sam odredila kolorimetrijskom metodom prema proceduri Strickland-a i Parsons-a (1972) gdje sam u prozirne mikrotitarske ploče dodala po 200  $\mu\text{L}$  kulture i 20  $\mu\text{L}$  substrata (molibdat-sumporna kiselina-askorbat-tartarat u omjeru 1:2.5:5:0.5) pa je konačni volumen u jažicama iznosio 220  $\mu\text{L}$ . Koncentraciju fosfata sam mjerila prvi i zadnji dan eksperimenta a oba uvjeta uzgoja su odrađena u triplikatu za svaku pojedinu uzgojnu kulturu. Za kalibraciju sam koristila rastuće koncentracije  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u rasponu od 0.1  $\mu\text{M}$  pa do 40  $\mu\text{M}$ . Kao negativne kontrole koristila sam čiste uzgojne medije, sterilnu morsku vodu i deioniziranu vodu. Absorbanciju sam mjerila spektrofotometrijski na uređaju Tecan Infinite M200 PRO (TECAN, Švicarska) pri valnoj duljini od 690 nm. Koncentracija fosfata u jažicama izračunata je pomoću standardne krivulje na osnovu srednje vrijednost svih mjerenja za pojedinu kulturu. Najniža mjerljiva vrijednost koncentracije fosfata je 0.05  $\mu\text{M}$ .

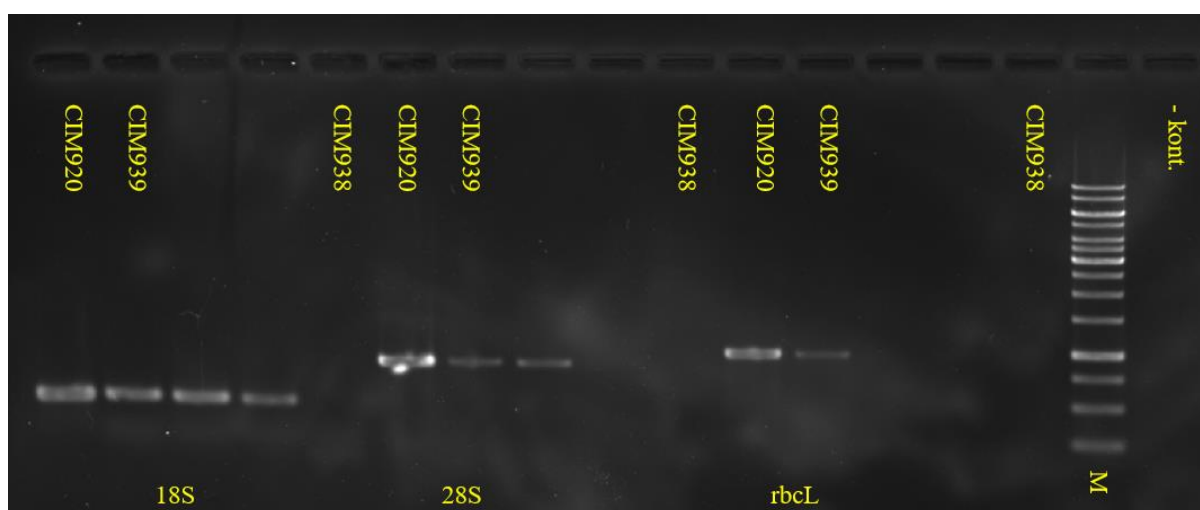
### 3.9. Obrada podataka

Za grafički prikaz podataka koristila sam se programima Microsoft Excel (Microsoft 2016) i R studio (R Core Team 2015). Podatke o dužini i promjeru/širini stanica te intenzitetu fluorescencije klorofila *a* sam statistički obradila t-testom u programu Microsoft Excel (Microsoft 2016) dok je kod drugih mjerenja vrijednost rezultata uspoređena samo između dva uvjeta bez korištenja statističkih testova uzimajući u obzir standardnu devijaciju pojedinih mjerenja. Svi podaci su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja (triplikata) s prikazom standardne devijacije.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Taksonomska identifikacija dijatomejskih vrsta (mikroskopija i barkodiranje)

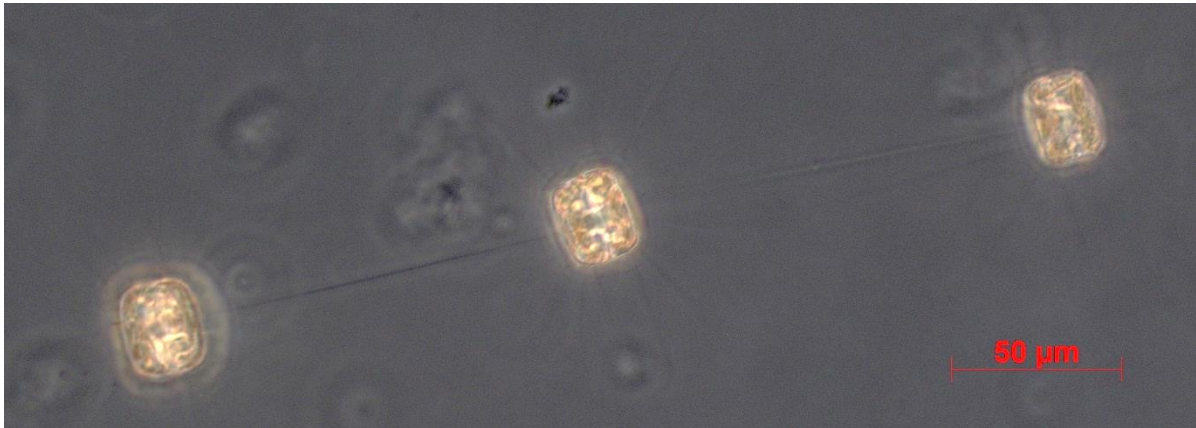
Taksonomska identifikacija dijatomeja molekularnim metodama (barkodiranjem) potvrdila je taksonomsku identifikaciju napravljenu do razine roda pomoću svjetlosnog mikroskopa. Dodatno, molekularne metode (barkodiranje) omogućile su pouzdanu identifikaciju kultura CIM939 (*Thalassionema* sp.) i CIM920 (*Thalassiosira* sp.) do razine vrste. Umnažanje barkodova je bilo uspješno samo za kulture CIM939 i CIM920 dok za CIM938 to nije bio slučaj (Slika 8). Iz tog razloga za kulturu CIM938 nije bila moguća molekularna identifikacija do razine vrste, kao ni svjetlosnim mikroskopom, pa za potrebe ovog diplomskog rada kulturu CIM938 opisujem kao *Synedra* sp.



Slika 8 - Agarozni gel nakon elektroforeze i bojanja u etidij-bromidu. Označene su jažice sa barkodovima (18S, 28S, ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (*rbcL*)) umnoženim lančanom reakcijom polimeraze (PCR) iznad kojih stoji oznaka kulture kojoj pripadaju (CIM920, CIM938 i CIM939) te DNA biljeg (M) i negativna kontrola (-kont.). Jažice koje nisu označene pripadaju uzorcima koji su usporedno obrađivali u laboratoriju.



Kultura CIM920 (*Thalassiosira* sp.) je, na osnovu filogenetske analize udaljenosti te varijabilnosti svih poznatih sekvenci za sva tri barkoda, identificirana kao *Thalassiosira* cf. *eccentrica* (Slika 9).



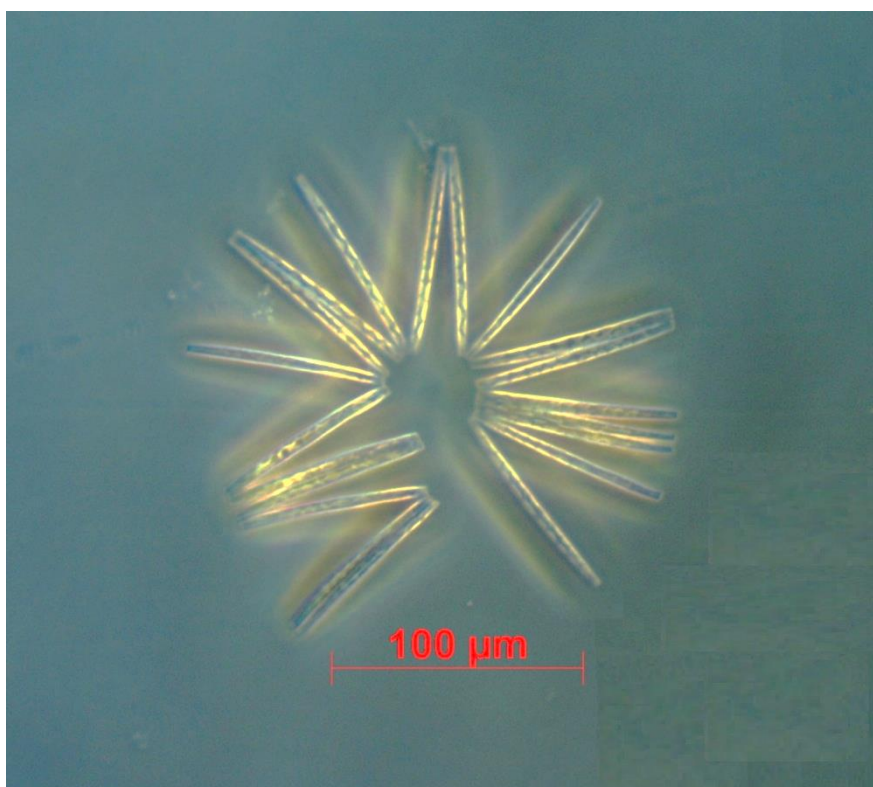
Slika 9 - Prikaz lanca vrste *Thalassiosira* sp. u pleuralnom (bočnom) položaju. Slikano Zeiss AxioCam digitalnom kamerom.

Molekularna srodnost s drugim vrstama u rodu je prikazana filogenetskim stablom na Slici 10 gdje se vidi srodnost ispitivanih sekvenci s podacima iz GenBank baze podataka koji odgovaraju vrsti *Thalassiosira* cf. *eccentrica*. Vrijednosti samoučitavanja (engl. Bootstrap values) su naznačene na čvorištima srodnosti.



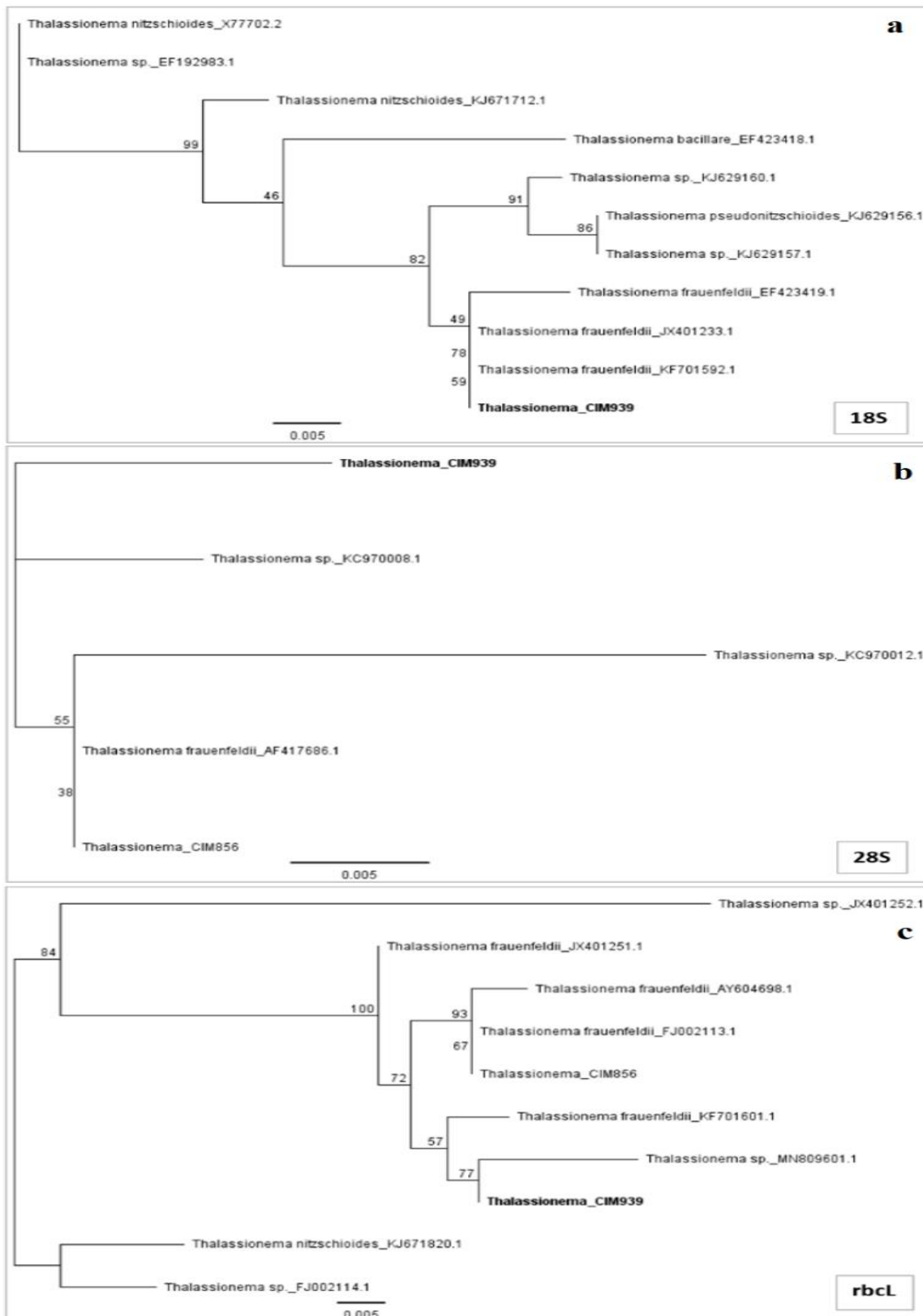
Slika 10 - Filogenetska rekonstrukcija roda *Thalassiosira* na osnovu sekvenci iz GenBank baze podataka i sekvenci dobivenih u ovom istraživanju za tri barkoda: 18S (a), 28S (b) i ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (*rbcL*) (c). Za GenBank sekvence je uz naziv vrste naveden i pripadajući GenBank pristupni broj, a nazivi sekvenci dobivenih u ovom radu su označeni podebljano. Uz pripadajuće čvorove filogenetskog stabla navedene su vrijednosti samoučitavanja (“bootstrap values”).

Kultura CIM939 (*Thalassionema* sp.) je, također na osnovu filogenetske analize udaljenosti te varijabilnosti svih poznatih sekvenci za sva tri barkoda, identificirana kao *Thalassionema* cf. *frauenfeldii* (Slika 11).



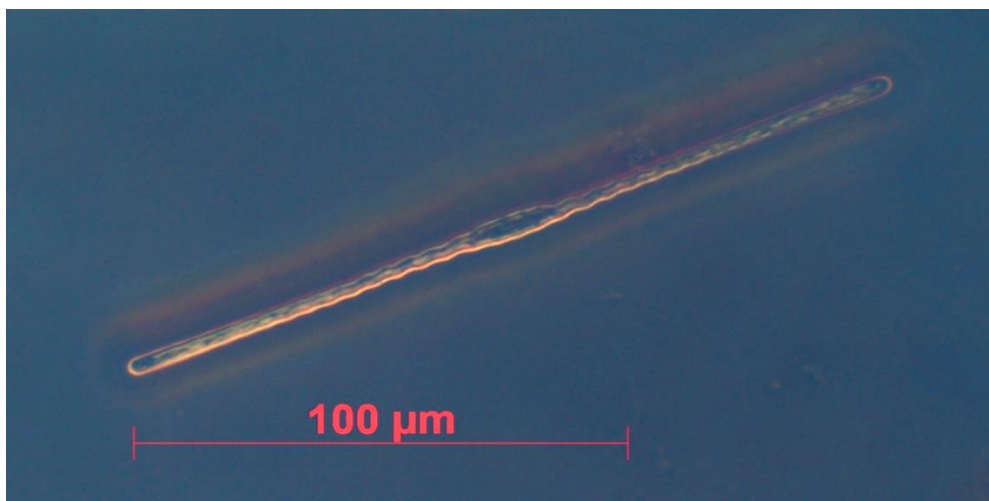
Slika 11 - Prikaz lanca vrste *Thalassionema* cf. *frauenfeldii*. Slikano digitalnom kamerom Zeiss AxioCam.

Barkodiranjem 18S, 28S i *rbcL* genskih markera te usporedbama dobivenih sekvenci sa sekvencama iz GeneBank baze podataka utvrđena je pripadnost vrsti *Thalassionema* cf. *frauenfeldii*. Filogenetska analiza udaljenosti i varijabilnosti svih poznatih sekvenci roda je prikazana filogenetskim stablom na Slici 12. Vrijednosti samoučitavanja (“Bootstrap” values) su naznačene na čvorištima srodnosti.



Slika 12 - Filogenetska rekonstrukcija roda *Thalassionema* na osnovu sekvenci iz GenBank baze podataka i sekvenci dobivenih u ovom istraživanju za tri barkoda: 18S (a), 28S (b) i ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza, *rbcL* (c). Za GenBank sekvence je uz naziv vrste naveden i pripadajući GenBank pristupni broj, a nazivi sekvenci dobivenih u ovom radu su označeni podebljano. Uz pripadajuće čvorove filogenetskog stabla navedene su vrijednosti samoučitavanja (“bootstrap values”).

Zbog neuspjelog umnažanja barkodova, kulturu CIM938 nije bilo moguće identificirati do razine vrste, već samo svjetlosnim mikroskopom do razine roda (Slika 13). Stoga, kulturu CIM938 opisujem kao *Synedra* sp.

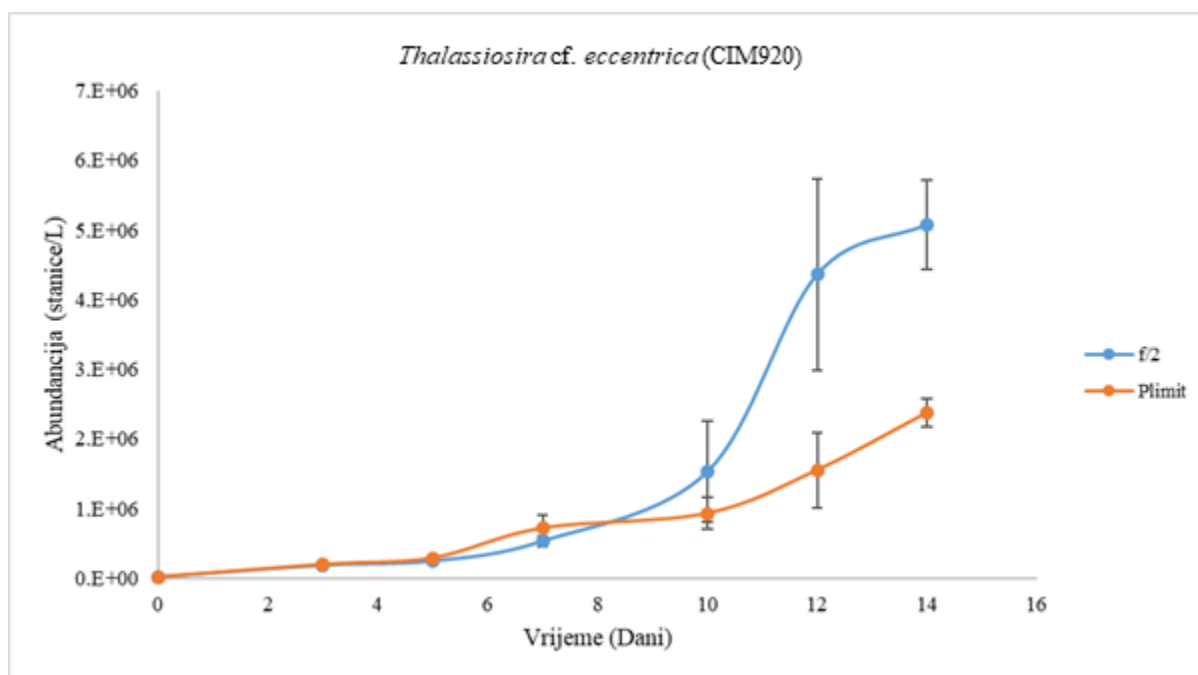


Slika 13 - *Synedra* sp. u kulturi. Slikano digitalnom kamerom Zeiss AxioCam.

## 4.2. Morfološki i fiziološki odgovor dijatomejskih vrsta

### 4.2.1. *Thalassiosira cf. eccentrica* (Ehrenberg) Cleve 1904

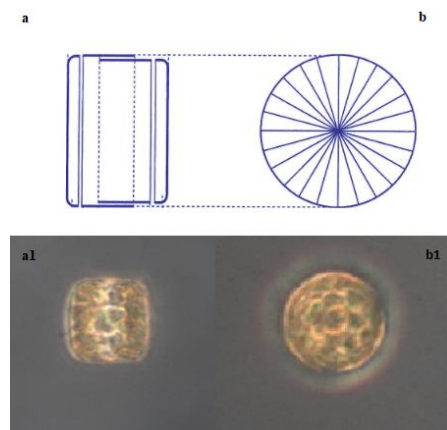
Krivulja rasta kulture (Slika 14) prikazuje najveću brojnost od  $5.08 \times 10^6$  stanica/L u f/2 mediju i  $2.38 \times 10^6$  stanica/L u uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) za vrstu *Thalassiosira cf. eccentrica*. f/2 kultura je s 14. danom ušla u stacionarnu fazu dok je P-limit kultura po završetku eksperimenta bila još u slabo izraženoj eksponencijalnoj fazi.



Slika 14 - Krivulja rasta vrste *Thalassiosira cf. eccentrica* u uvjetima obogaćenim s fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) kroz razdoblje od 14 dana. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost triplikata sa standardnim devijacijama.

Stopa rasta u f/2 mediju (izračunata po jednadžbi (1)) iznosila je 0.52 dok je u uvjetima ograničenim fosforom 0.23.

Uočene su i statistički značajne ( $p < 0.05$ ) morfološke razlike između stanica uzgajanih u dva medija (Tablica 5). Gledano iz pleuralnog (bočnog) položaja (Slika 15), dužina stanica se statistički značajno razlikuje što nam pokazuje p vrijednost od  $p < 0.0009$ . Izračunato je da je srednja vrijednost dužine stanica veća u uvjetima ograničenim fosforom ( $28.19 \mu\text{m}$ ) nego u f/2 mediju ( $25.89 \mu\text{m}$ ). Za promjer stanica nisu pronađene statističke značajne razlike.



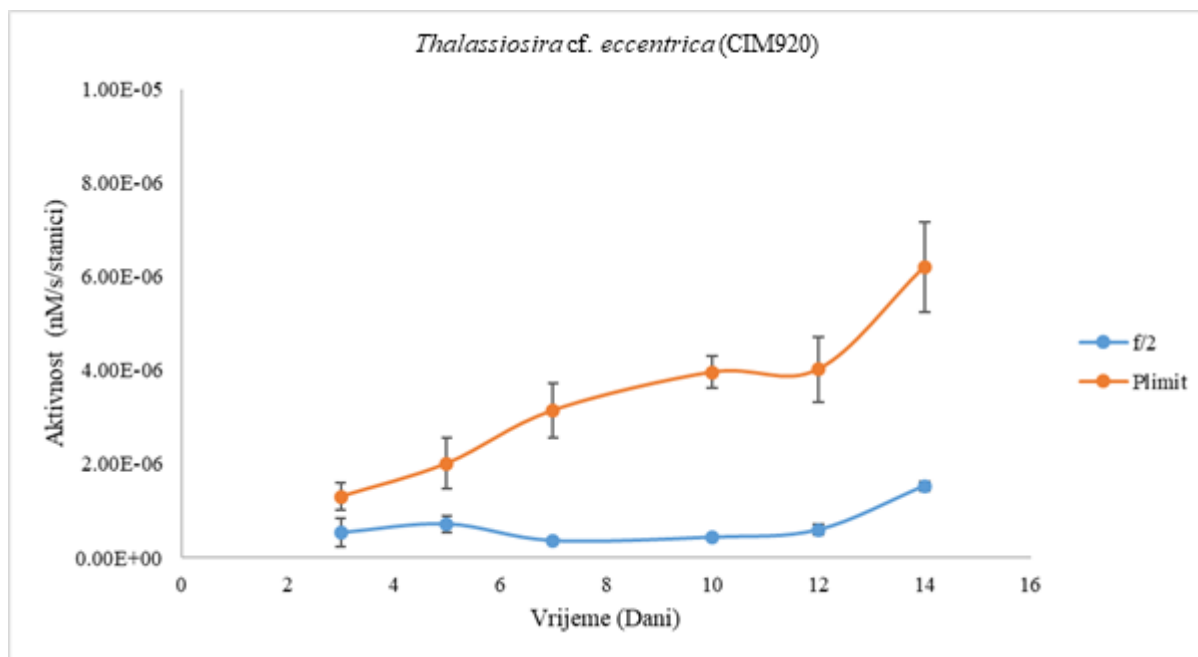
Slika 15 - Ilustracija i slika pleuralnog (bočnog) položaja pod a i a1 te valvarnog položaja pod b i b1 na primjeru *Thalassiosira cf. eccentrica*.

Intenzitet fluorescencije klorofila *a* po stanici kod vrste *Thalassiosira cf. eccentrica*, izražen u RF/stanici, prikazan je u Tablici 5 za oba uvjeta uzgoja u zadnjem danu. Statistički značajna razlika ( $p < 0.0025$ ) između intenziteta fluorescencije po stanici (RF/stanici) uočena je između dva uvjeta uzgoja u zadnjem danu eksperimenta, gdje je intenzitet fluorescencije bio niži u uvjetima uzgoja ograničenog fosfora.

Tablica 3 – Srednja vrijednost i standardna devijacija morfoloških mjerenja (uzorak od 30 jedinki) i mjerenja intenziteta fluorescencije klorofila *a* kod vrste *Thalassiosira cf. eccentrica* za uvjete uzgoja obogaćenim fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit). RF = relativna fluorescencija.

Mjerenje	f/2			P-limit		
	Pleuralni položaj		Valvarni položaj	Pleuralni položaj		Valvarni položaj
Morfološki parametri	Promjer (μm)	Dužina (μm)	Promjer (μm)	Promjer (μm)	Dužina (μm)	Promjer (μm)
		26.99±2.72	25.89±2.02	26.03±2.70	26.26±2.71	28.19±3.54
Fluorescencija klorofila <i>a</i>	2.52±0.26 RF/stanici			0.92±0.32 RF/stanici		

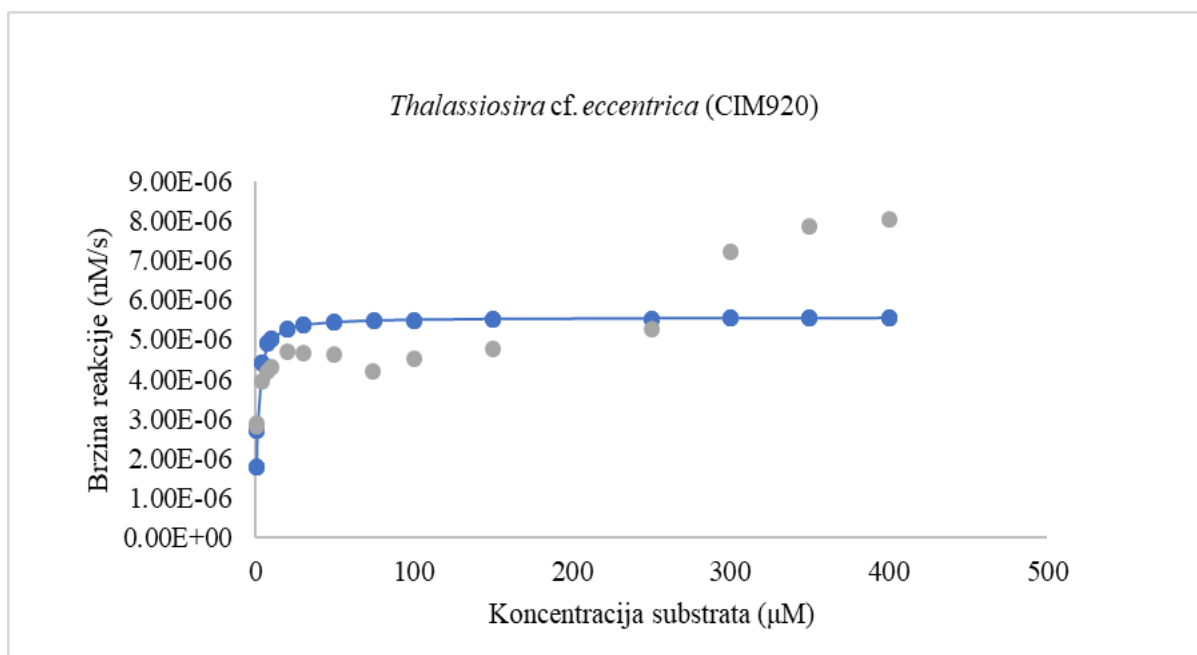
Stanice *Thalassiosira cf. eccentrica* aktivirale su alkalnu fosfatazu (Slika 16) u uvjetima ograničenim fosforom. Specifična aktivnost rasla je kroz 14 dana, a najveća je bila u posljednjem danu eksperimenta i iznosila je  $6.22 \times 10^{-6}$  nM/s/stanici.



Slika 16 - Aktivnost enzima alkalne fosfataze po stanici za vrstu *Thalassiosira cf. eccentrica* u uvjetima obogaćenim fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) kroz razdoblje od 14 dana. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost triplikata sa standardnim devijacijama.

Pomoću Michaelis-Menten-ovog modela enzimski katalizirane reakcije određena je Michaelis-Menten-ova konstanta ( $K_m$ ) koja je iznosila  $1.1 \mu\text{M}$  i maksimalna brzina reakcije ( $V_m$ ) koja je bila  $5.57 \times 10^{-6}$  nM/s za određenu abundanciju stanica ( $2.4 \times 10^6$  stanica/L). Kinetika enzimatske reakcije prikazana je na Slici 17.





Slika 17 - Kinetika APA enzima aktiviranog na stanicama *Thalassiosira cf. eccentrica* u uvjetima ograničenim fosforom (P-limit). Sive točke prikazuju prosječnu ekperimentalnu brzinu po triplikatu a plava linija prikazuje teoretsku brzinu reakcije svih 15 triplikata.

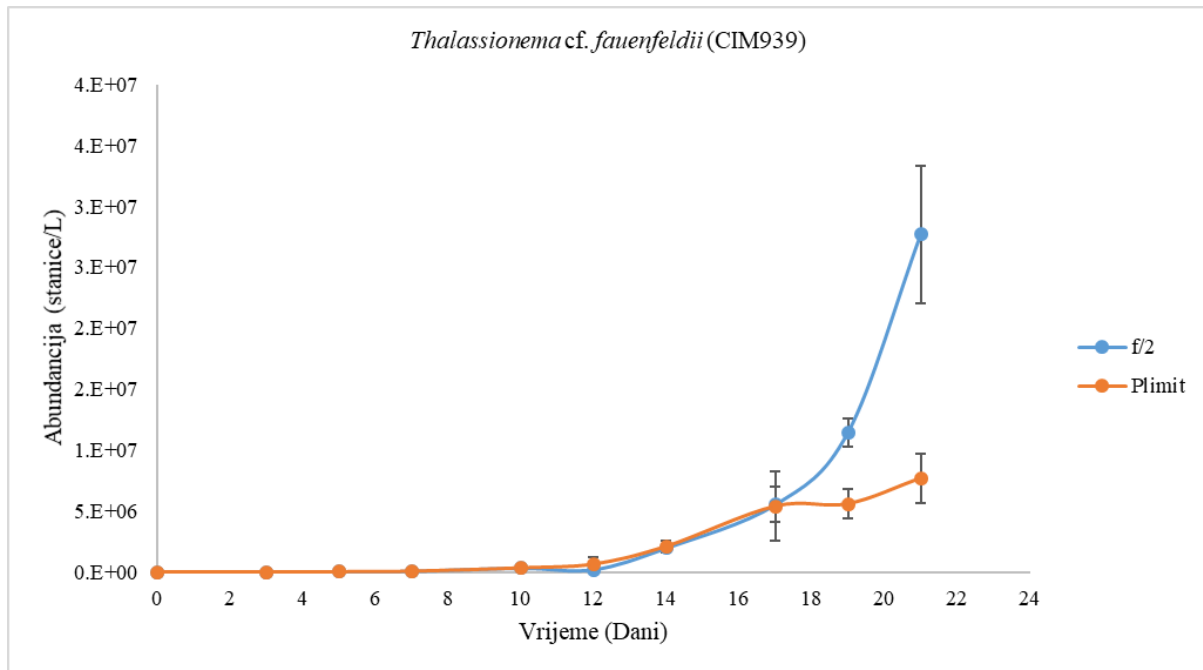
Analizom fosfata u f/2 mediju na početku i na kraju eksperimenta (Tablica 6) utvrdilo se da su stanice *Thalassiosira cf. eccentrica* potrošile 3.56 µM fosfata dok je u P-limit mediju koncentracija bila ispod granice detekcije (<0.05 µM/L ).

Tablica 6 - Koncentracije fosfata u mediju u uvjetima obogaćenim s fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) na početku i na kraju eksperimenta.

Koncentracija PO <sub>4</sub> (µM/L)	Početak eksperimenta	Kraj eksperimenta
f/2	40.32	36.82
P-limit	<0.05	<0.05

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

Kultura je svoj rast započela s manje od  $3 \times 10^3$  stanica/L u oba medija a po završetku eksperimenta je dostigla vrijednost od  $2.77 \times 10^7$  stanica/L u f/2 odnosno  $7.68 \times 10^6$  stanica/L u uvjetima ograničenim fosforom (P limit). Krivulja rasta je prikazana na grafu na Slici 18.



Slika 18 - Krivulja rasta vrste *Thalassionema cf. frauenfeldii* u uvjetima obogaćenim s fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) kroz razdoblje od 21 dan. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost triplikata sa standardnim devijacijama.

Stopa rasta za razdoblje od 21 dan u f/2 mediju (izračunata po jednadžbi (1)) iznosila je 0.35 dok je u uvjetima ograničenim fosforom bila 0.31.

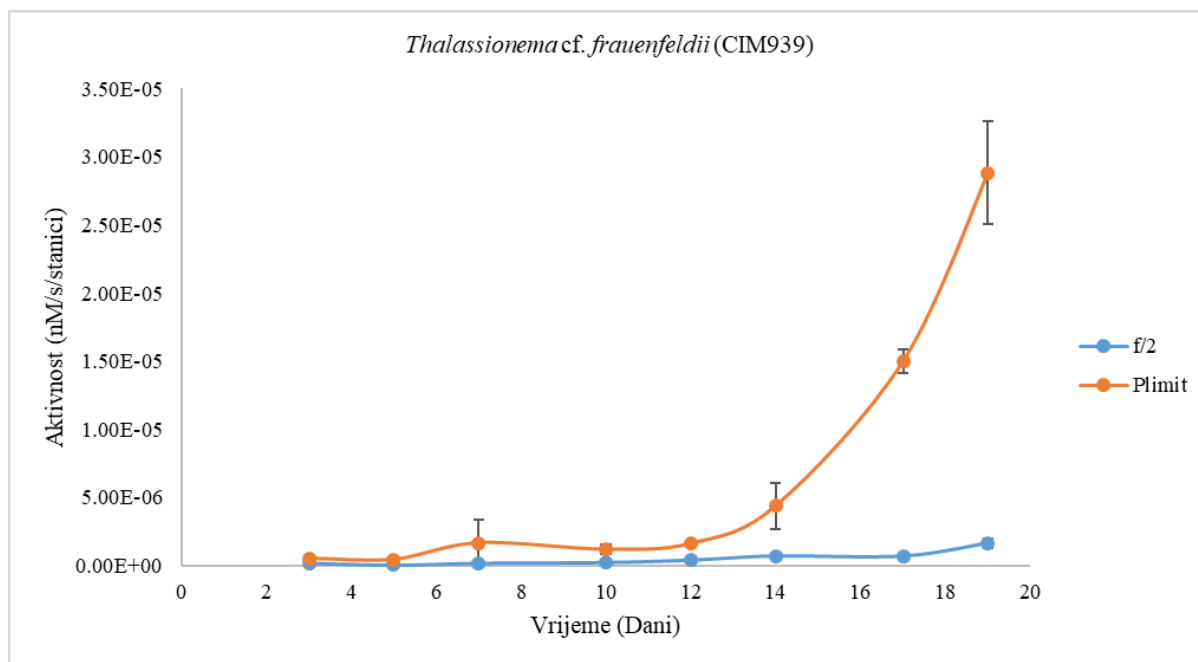
Nisu uočene statistički značajne ( $p > 0.05$ ) morfološke razlike između stanica uzgajanih u dva medija (Tablica 7).

Intenzitet fluorescencije klorofila *a* po stanici kod vrste *Thalassioneme cf. frauenfeldii*, izražen u RF/stanici, prikazan je u Tablici 7 za oba uvjeta uzgoja u zadnjem danu. Nije uočena statistički značajna razlika ( $p > 0.05$ ) između intenziteta fluorescencije klorofila po stanici (RF/stanici) između dva uvjeta uzgoja u zadnjem danu eksperimenta.

Tablica 7 – Srednja vrijednost i standardna devijacija morfoloških mjerenja (uzorak od 30 jedinki) i mjerenja intenziteta fluorescencije klorofila *a* kod vrste *Thalassiosira cf. frauenfeldii* za uvjete uzgoja obogaćenim fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit). RF = relativna fluorescencija.

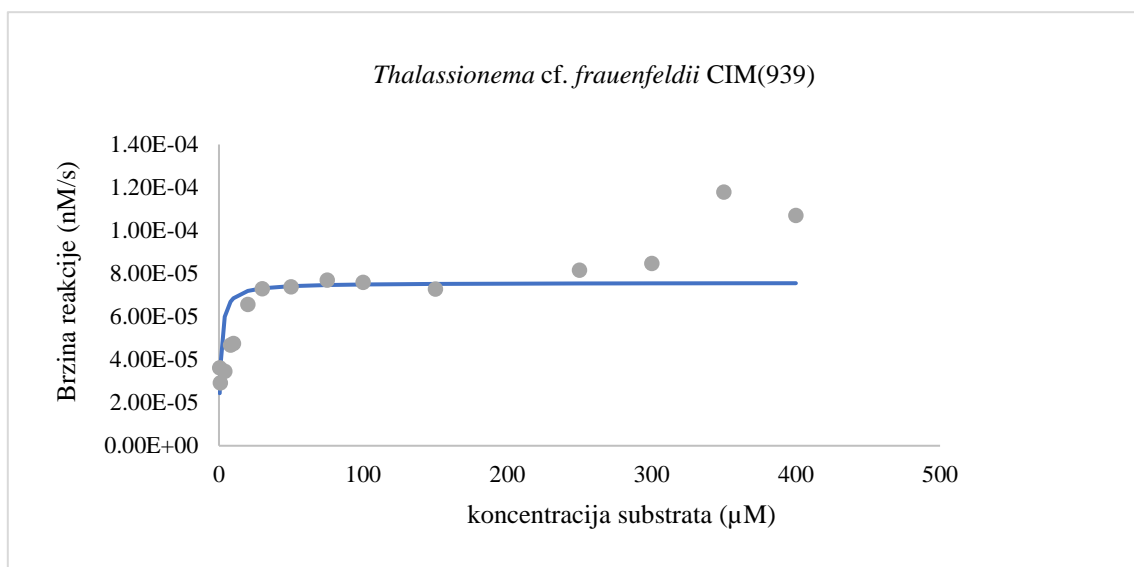
Mjerenje	f/2				P-limit			
	Pleuralni položaj		Valvarni položaj		Pleuralni položaj		Valvarni položaj	
	Širina (µm)	Dužina (µm)	Širina (µm)	Dužina (µm)	Širina (µm)	Dužina (µm)	Širina (µm)	Dužina (µm)
Morfološki parametri	9.42± 2.89	307.51± 1.61	7.02± 0.65	308.09± 3.54	9.42± 2.89	307.51± 1.61	7.02± 0.65	308.0± 3.54
Fluorescencija klorofila <i>a</i>	0.26±0.05 RF/stanici				0.22±0.08 RF/stanici			

Stanice *Thalassionema cf. frauenfeldii* aktivirale su alkalnu fosfatazu u uvjetima ograničenim fosforom (Slika 19). Specifična aktivnost rasla je kroz 19 dana, a najveća je bila u posljednjem danu eksperimenta i iznosila je  $2.88 \times 10^{-5}$  nM/s/stanici.



Slika 19 - Aktivnosti APA enzima po stanici za vrstu *Thalassionema cf. frauenfeldii* u uvjetima obogaćenim s fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) kroz razdoblje od 19 dana. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost triplikata sa standardnim devijacijama.

Eksperiment s ovom vrstom je završen mjerenjem enzimske kinetike u 23. danu eksperimenta. Rezultati su pokazali da se ravnoteža postiže tek sa koncentracijom substrata od 250  $\mu\text{M}$  uz  $K_m$  od 1.7  $\mu\text{M}$  i  $V_m$  od  $5.04 \times 10^{-5}$  nM/s. Graf s kinetičkom krivuljom je prikazan na Slici 20.



Slika 20 - Grafički prikaz kinetike APA enzima aktiviranog na stanicama u uvjetima ograničenim fosforom (P-limit). Sive točke prikazuju prosječnu eksperimentalnu brzinu po triplikatu a plava linija prikazuje teoretsku brzinu reakcije svih 15 triplikata.

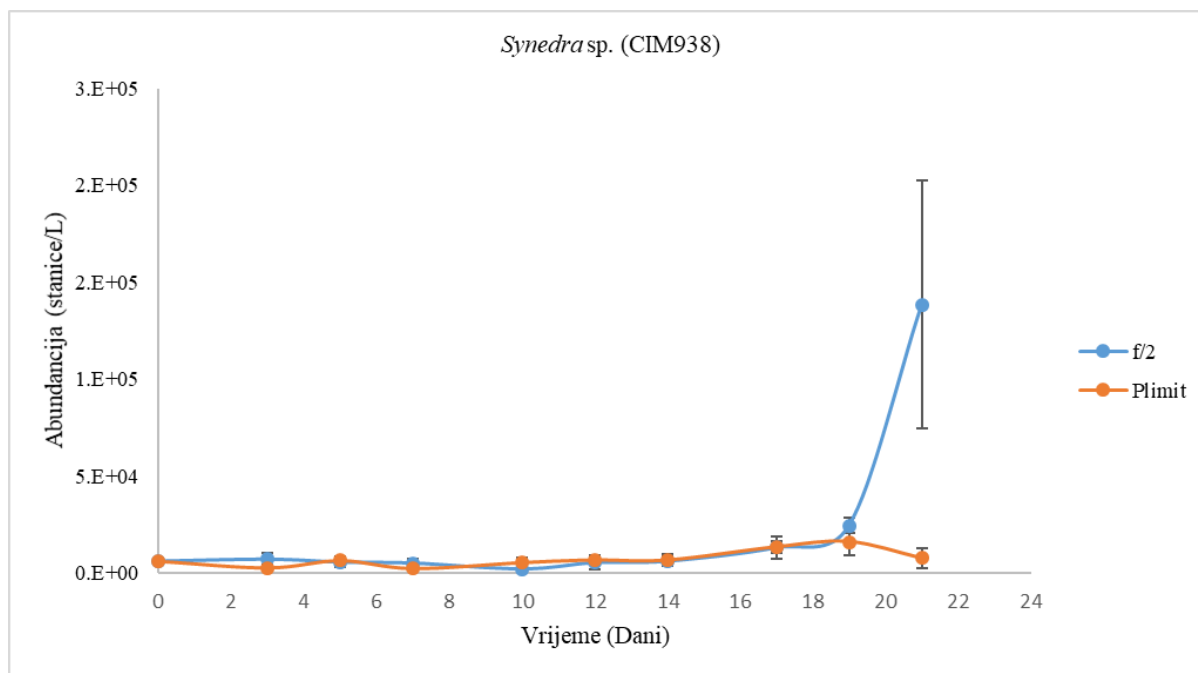
Analizom fosfata u f/2 mediju na početku i na kraju eksperimenta (Tablica 8) utvrdilo se da su stanice *Thalassionema cf. frauenfeldii* potrošile 1.42  $\mu\text{M}$  fosfata dok je u P-limit mediju koncentracija bila ispod granice detekcije ( $<0.05 \mu\text{M/L}$ ).

Tablica 8 - Koncentracije fosfata u uvjetima obogaćenim s fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) na početku i na kraju eksperimenta.

Koncentracija $\text{PO}_4$ ( $\mu\text{M/L}$ )	Početak eksperimenta	Kraj eksperimenta
f/2	39.44	37.97
P-limit	$<0.05$	$<0.05$

#### 4.2.3. *Synedra* sp.

Kultura je započela svoj rast s 6000 stanica/L u oba medija a eksperiment je završila s  $1.39 \times 10^5$  stanica/L u f/2 odnosno  $7.67 \times 10^3$  stanica/L u uvjetima ograničenim fosforom. Svakodnevni rast stanica u razdoblju od 21 dan je prikazan na Slici 21.



Slika 21- Krivulja rasta vrste *Synedra* sp. u uvjetima obogaćenim s fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) kroz razdoblje od 21 dan. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost triplikata sa standardnim devijacijama.

Stopa rasta za razdoblje od 21 dan u f/2 mediju (izračunata po jednadžbi (1)) iznosila je 0.87 dok je u uvjetima ograničenim fosforom 0.06.

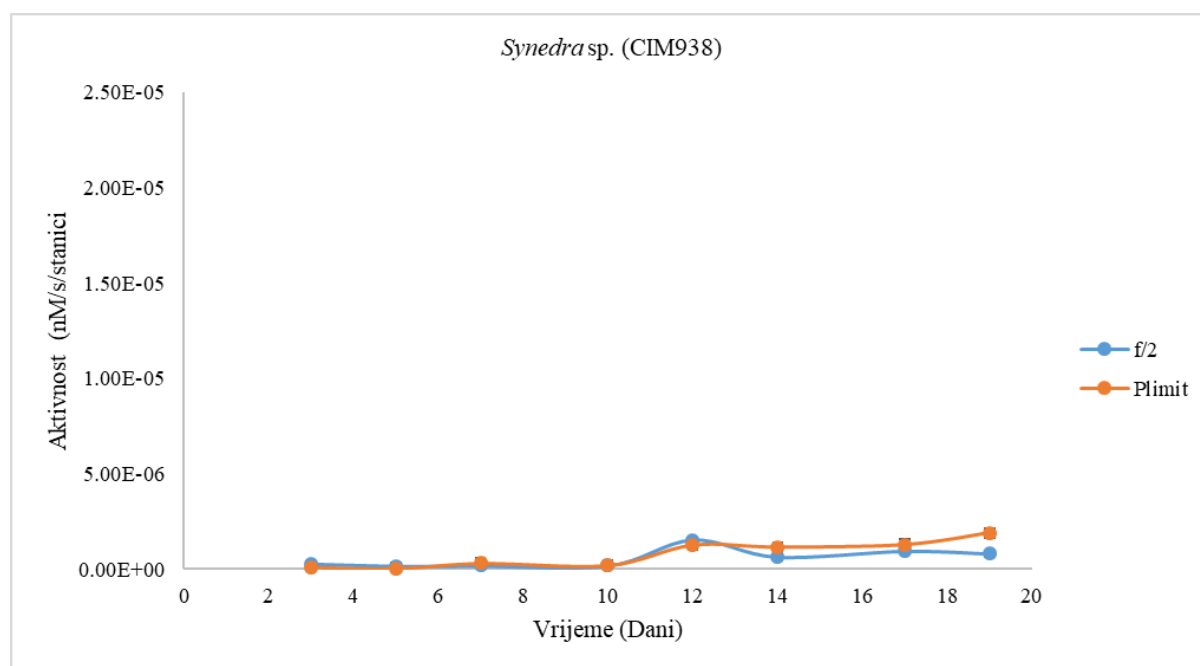
Nisu uočene statistički značajne morfološke razlike ( $p > 0.05$ ) između stanica uzgajanih u dva medija (Tablica 9).

Intenzitet fluorescencije klorofila *a* po stanici kod vrste *Synedra* sp., izražen u RF/stanici, prikazan je u Tablici 9 za oba uvjeta uzgoja u zadnjem danu. Nije uočena statistički značajna razlika ( $p > 0.05$ ) između intenziteta fluorescencije po stanici (RF/stanici) između dva uvjeta uzgoja u zadnjem danu eksperimenta jer je za uvjete ograničenog fosfora intenzitet fluorescencije klorofila bio ispod granice detekcije.

Tablica 94 - Srednja vrijednost i standardna devijacija morfoloških mjerenja (uzorak od 30 jedinki) i mjerenja intenziteta fluorescencije klorofila *a* kod vrste *Synedra* sp za uvjete uzgoja obogaćenim fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit). RF = relativna fluorescencija; NA = nema podatka.

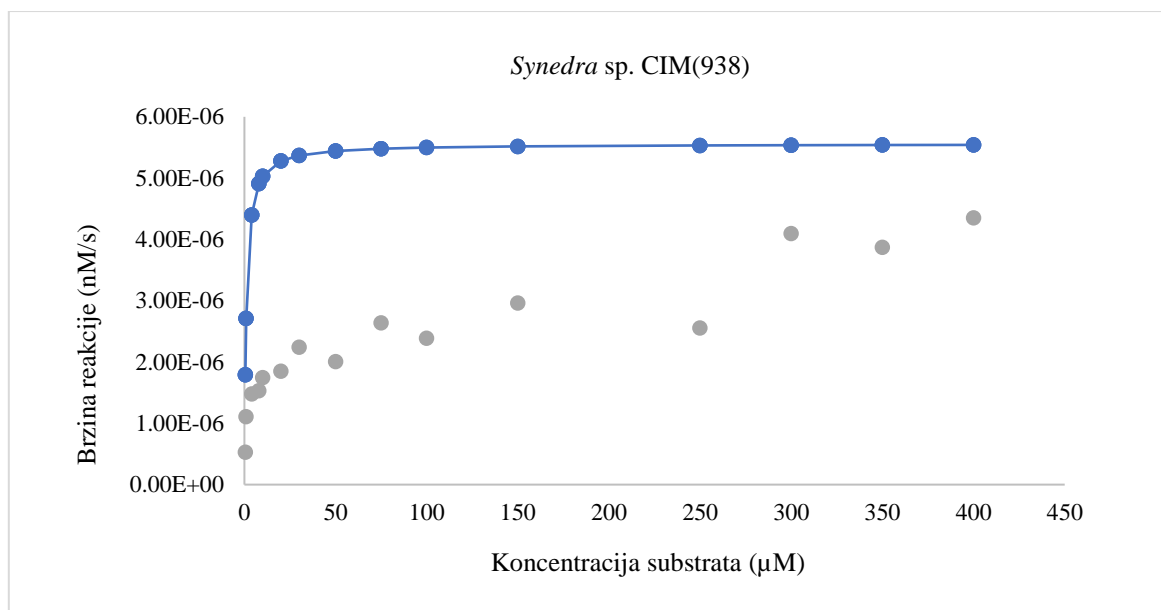
Mjerenje	f/2				P-limit			
	Pleuralni položaj		Valvarni položaj		Pleuralni položaj		Valvarni položaj	
Morfološki parametri	Širina (µm)	Dužina (µm)	Širina (µm)	Dužina (µm)	Širina (µm)	Dužina (µm)	Širina (µm)	Dužina (µm)
		4.60± 1.54	74.09± 10.07	3.36± 0.62	63.97± 7.74	3.62± 0.88	70.44± 11.06	3.05± 0.31
Fluorescencija klorofila <i>a</i>	0.91±0.38 RF/stanici				NA			

Stanice *Synedra* sp. nisu pokazale povišenje aktivnosti APA enzima. Rezultati aktivnosti za ovu vrstu prikazani su na Slici 22.



Slika 22- Aktivnosti APA enzima po stanici za vrstu *Synedra* sp. u uvjetima obogaćenim fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) kroz razdoblje od 19 dana.

Kinetika APA enzima je prikazana grafom na Slici 23. Reakcija dostiže ravnotežu nakon koncentracije substrata od 70 µM s maksimalnom brzinom  $V_m = 5.43 \times 10^{-6}$  nM/s, pri vrijednosti Michaelis Mentenove konstante poluzasićenja  $K_m = 8.2$  µM.



Slika 23 - Grafički prikaz kinetike APA enzima aktiviranog na stanicama u uvjetima ograničenim fosforom (P-limit). Sive točke prikazuju prosječnu eksperimentalnu brzinu po triplikatu a plava linija prikazuje teoretsku brzinu reakcije svih 15 triplikata.

Analizom fosfata u f/2 mediju na početku i na kraju eksperimenta (Tablica 10) utvrdilo se da su stanice *Synedra* sp. potrošile 2.64 µM fosfata dok je u P-limit mediju koncentracija bila ispod granice detekcije.

Tablica 10 - Koncentracije fosfata u mediju u uvjetima obogaćenim s fosforom (f/2) i uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) na početku i na kraju eksperimenta.

Koncentracija PO <sub>4</sub> (µM/L)	Početak eksperimenta	Kraj eksperimenta
f/2	42.63	39.99
P-limit	<0.05	<0.05

### 3. RASPRAVA

#### 5.1. *Thalassiosira cf. eccentrica*.

Što se tiče nutritivne preferencije, vrsta je pokazala značajno veću abundanciju u f/2 mediju gdje ima fosfora nego u uvjetima ograničenim fosforom. Dakle svoj maksimum vrsta zasigurno ne postiže u uvjetima nedostupnosti anorganskog fosfora već u zoni nutritivnog izobilja kao što su obala Perua i Argentine i to za vrijeme ljetnih mjeseci (Asmus, 1982; López-Cortés i sur., 2015). Pregledom literaturnih radova utvrđeno je da u Jadranu do sada nije zabilježen maksimum brojnosti što može korelirati s niskom koncentracijom dostupnog anorganskog fosfora. Relativna fluorescencija klorofila po stanici je na kraju eksperimenta bila značajno manja u uvjetima ograničenim fosforom. Iz toga možemo pretpostaviti da je nedostatak anorganskog fosfora u mediju utjecao na promjenu efikasnosti fotosinteze (Stehfest i sur., 2005) odnosno na sintezu ATP-a koji uzrokuje smanjenje sinteze klorofila. Što se tiče morfološke adaptacije, usporedbom duljine stanica dokazana je značajna razlika u dužini stanica između medija gdje vrsta više raste u dužinu u uvjetima ograničenim fosforom. Mogući razlog za to je povećanje površine jer bi na taj način povećala broj membranskih APA enzima (Smolaka Tanković i sur., 2018). Aktivnost APA enzima u uvjetima ograničenim fosforom upućuje na to da je vrsta adaptirana na okoliš u kojem nedostaje fosfora što potvrđuje i podatak o njenoj prisutnosti u Jadranskom moru iz rada od Viličić i sur. (2009). Dakle vrsta obitava u okolišu u kojem nedostaje fosfora no u takvom okolišu ne postiže značajno veliku brojnost odnosno maksimum. Enzim se ponaša po Michaelis - Mentenovoj kinetici, dakle brzina reakcije se nakon određene koncentracije substrata zasiti i dostiže ravnotežu. U usporedbi s vrijednostima Michaelis Mentenove konstante poluzasićenja ( $K_m$ ) iz Medić (2020), niska vrijednost  $K_m$  od 1.1 nam govori da je afinitet enzima prema substratu velik. S obzirom da je koncentracija anorganskog fosfora u stanici ključan okidač za aktivaciju APA enzima, konstanta dodatno potvrđuje da u mediju, a posljedično i u stanici zaista nema anorganskog fosfora.



## 5.2. *Thalassionema cf. frauenfeldii*

Kao i *T. cf. eccentrica* i ova vrsta je zabilježena u sjevernom, srednjem i južnom Jadranu (Viličić i sur., 2009). U južnojadranskoj kotlini zabilježena je na dubini većoj od 250 m u abundanciji od 380 stanica/L (Bosak i sur., 2016). Eksperiment je pokazao da vrsta uspješnije raste u uvjetima obogaćenim fosforom (f/2), no prema izračunu stope rasta u eksponencijalnoj fazi vidimo da u f/2 mediju nema značajne razlike u rastu naspram uvjeta ograničenim fosforom. Statistički značajne morfološke promjene stanica između dva medija nisu zabilježene što znači da vrsta u ovom slučaju nije povećavala svoju površinu radi povećanja broja enzima (Smodlaka Tanković i sur., 2018). APA enzim je membranski enzim pa se povećanjem površine stanice povećava i površina membrane što omogućuje veći broj enzima na stanici. Fluorescencija klorofila svih tripplikata kulture algi je u oba medija ostala nepromijenjena što znači da se efikasnost fotosinteze nije promijenila (Stehfest i sur., 2005). Aktivacija APA enzima koji katalizira cijepanje organskog fosfora čime se dobije anorganski fosfor se dogodila u prvom tjednu eksperimenta. To nam govori da je stanica potrošila sav unutarstanični anorganski fosfor odnosno da anorganskog fosfora nema u mediju. Ako se osvrnemo na kinetiku enzima,  $K_m$  od 1.7 nam kaže da je afinitet enzima prema substratu velik, a pri pogledu na ravnotežno stanje vidimo da ono nastupa tek pri koncentraciji substrata od 250  $\mu\text{M}$ . Ove vrijednosti upućuju na to da je vrsta osjetljiva na male količine anorganskog fosfata u okolišu i da ga pritom uzima u većim količinama. Dakle, prema navedenim karakteristikama, vrsta bi se mogla okarakterizirati kao oportunistička.

### 5.3. *Synedra* sp.

Značajno velika brojnost odnosno maksimum stanica roda *Synedra* u Jadranu još nije zabilježen. Abundancija vrste u eksperimentu je bila veća u uvjetima obogaćenim fosforom (f/2), dok je kultura u uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) ušla u stacionarnu fazu pri vrlo niskoj abundanciji. Dakle, abundancija vrste je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom anorganskog fosfora. Najveća zabilježena abundancija te vrste u Jadranu je bila količina od  $10^3 - 10^4$  stanica/L u srpnju 2000. u morskom jezeru Velika solina pokraj Šibenika pri maksimalnoj koncentraciji anorganskog fosfora od  $0.4 \mu\text{M}$  (Carić i sur., 2011). U ovom eksperimentu vrsta nije aktivirala APA enzim. Vrijednost  $K_m$  od 8.2 nam govori da u odnosu na prethodne vrste ima manji afinitet prema substratu što znači da je APA enzim osjetljiv tek na veće količine organskog fosfora što objašnjava razliku u abundanciji između medija. Statistički značajne morfološke promjene stanica između medija nisu zabilježene što nam govori da vrsta ne povećava broj APA enzima povećanjem površine stanice (Smodlaka Tanković i sur., 2018). Doduše, moguće je da se ova vrsta prilagođava na fosfolimitirajuće uvjete iskorištavanjem fosfatnih skupina iz fosfolipidnog dvosloja u membranama (Ivančić i sur., 2016) što bi uz visoku  $K_m$  objasnilo izostanak aktivacije APA enzima. Fluorescencija klorofila *a* se zadnjeg dana eksperimenta u uvjetima ograničenim fosforom nije mogla izmjeriti jer je bila ispod granice detekcije pa tako ne možemo reći je li došlo do promjene fluorescencije klorofila između medija. Prema navedenim podacima možemo pretpostaviti da se radi o ravnotežnoj vrsti koja se sporije razmnožava i ne doseže brojnost značajnih proporcija.

#### 5.4. Usporedba odgovora između vrsta

Adaptacija na fosfolimitirajući okoliš aktivacijom APA enzima dokazana je kod vrsta *Thalassiosira cf. eccentrica* i *Thalassionema cf. frauenfeldii* dok kod vrste *Synedra sp.* nije uočena značajna aktivacija. Izostanak veće aktivacije se može objasniti time što je vrsta prilagođena na fosfolimitirajuće uvjete na način da iskorištava membranske fosfolipide a uz to je i slabo osjetljiva na niske koncentracije organskog fosfora u okolišu. Na taj način se koncentracija anorganskog fosfora unutar stanice povećava što inhibira aktivnost enzima. Morfološka adaptacija (rast u dužinu) je opažena samo kod vrste *Thalassiosira cf. eccentrica*. Adaptacija smanjenjem fluorescencije klorofila je uočena kod vrste *T. cf. eccentrica* dok za vrstu *Synedra sp.* taj podatak nismo mogli izmjeriti jer je bila ispod granice detekcije. Abundancija je za sve 3 vrste veća u uvjetima obogaćenim fosforom (f/2 mediju). Zabilježena je i promjena u stopi rasta u eksponencijalnoj fazi koja je također za sve vrste veća u f/2 mediju nego u uvjetima ograničenim fosforom. Iako adaptirane, vrste u takvom okolišu ne stvaraju velike cvatnje već se održavaju u manjoj abundanciji. U Jadranu nema zabilježenih značajnih maksimuma niti jedne vrste iz eksperimenta, što se može objasniti pretpostavkom da su ravnotežne vrste kao *Synedra sp.* (s najvećom Michaelis – Mentenovom konstantom) prisutne uvijek u maloj brojnosti ili pak kompeticijske vrste kao *T. cf. eccentrica* i *T. cf. frauenfeldii* koje ne mogu konkurirati vrstama koje stvaraju velike cvatnje poput vrsta iz roda *Chaetoceros* i *Pseudo-nitzschia* već konkuriraju na nižoj razini. Dakle, poznavanjem koncentracije anorganskog fosfora u morskom ekosustavu odnosno ekologije pojedinih fitoplanktonskih vrsta, mogli bi predvidjeti i sastav fitoplanktonske zajednice čime bi dobili bolji uvid u mikrobni krug i samu biološku pumpu (Herndl i Reinthaler, 2013) danog područja.

## 4. ZAKLJUČAK

- U uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) dokazana je aktivacija enzima alkalne fosfataze (APA) za vrste *Thalassiosira cf. eccentrica* i *Thalassionema cf. frauenfeldii* dok je kod vrste *Synedra* sp. izostala.
- Potrošnja anorganskog fosfata je za sve tri vrste vidljiva u uvjetima obogaćenim fosforom (f/2 medij) dok je u uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) za sve tri vrste ispod granice detekcije na početku i na kraju eksperimenta.
- Kod vrste *T. cf. eccentrica* opažena je morfološka adaptacija (rast u dužinu) uvjetima ograničenim fosforom (P-limit).
- Abundancija je kao i promjena u stopi rasta u eksponencijalnoj fazi za sve 3 vrste veća u uvjetima obogaćenim fosforom (f/2 mediju).
- Fluorescencija klorofila se smanjila u uvjetima ograničenim fosforom (P-limit) kod vrste *T. cf. eccentrica* dok je kod vrste *T. cf. frauenfeldii* ostala nepromijenjena a za vrstu *Synedra* sp. taj podatak nije izmjereno zbog ograničenja metode

## 5. LITERATURA

Alipanah, L., Winge, P., Rohloff, J., Najafi, J., Brembu, T., & Bones, A. M. (2018). Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE*, 1–24.

Alverson, A. J. (2008). Molecular Systematics and the Diatom Species. *Protist*, 159(3), 339–353.

Andersen, A. R. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press.

Asmus R. (1982). Field measurements on seasonal variations of the activity of primary producers on a sandy tidal flat in the northern wadden sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, 16, 389–402.

Aubry, F. B., Cossarini, G., Acri, F., Bastianini, M., Bianchi, F., Camatti, E., De Lazzari, A., Pugnetti, A., Solidoro, C., & Socal, G. (2012). Plankton communities in the northern Adriatic Sea: Patterns and changes over the last 30 years. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 125–137.

Bernardi Aubry, F., Acri, F., Bastianini, M., Bianchi, F., Cassin, D., Pugnetti, A., Socal, G. (2006). Seasonal and interannual variations of phytoplankton in the Gulf of Venice (Northern Adriatic Sea). *Chemical Ecology*, 22, 71–91.

Bernardi Aubry, F., Acri, F. (2004). Phytoplankton seasonality and exchange at the inlets of the Lagoon of Venice (July 2001–June 2002). *Journal of Marine Systems*, 51, 65–76.

Beusen, A. H. W., Dekkers, A. L. M., Bouwman, A. F., Ludwig, W., & Harrison, J. (2005). Estimation of global river transport of sediments and associated particulate C, N, and P. *Global Biogeochemical Cycles*, 19(4).

Boavida, M. J. (1990). Natural plankton phosphatases and the recycling of phosphorus. *SIL Proceedings, 1922-2010*, 24(1), 258–259.

- Bode, A., Álvarez-Ossorio, M.T., González, N., Lorenzo, J., Rodríguez, C., Varela, M., Varela, M. M. (2005). Seasonal variability of plankton blooms in the Ria de Ferrol (NW Spain): II. Plankton abundance, composition and biomass. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 63, 285–300.
- Bosak, S., Bosnjak, I., Cetinic, I., Mejdandzic, M., Ljubescic, Z., Goddard, N., Flight, S., South, K., & Sea, A. (2016). Diatom community in the depths of the south Adriatic: an injection of carbon by biological pump. *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée. CIESM: Monaco*, 41, 274.
- Brembu T, MuÈhlroth A, Alipanah L, B. A. (2017). The effects of phosphorus limitation on carbon metabolism in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372.
- Bruder, K., & Medlin, L. K. (2007). Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*. *Nova Hedwigia*, 85(3–4), 331–352.
- Buljan, M. and Zore-Armanda, M. (1976). Oceanographical properties of the Adriatic Sea. *Oceanography and Marine Biology*, 14, 11–98.
- Carić, M., Jasprica, N., Čalić, M., & Č, M. B. (2011). Phytoplankton response to high salinity and nutrient limitation in the eastern Adriatic marine lakes. *Scientia marina*. 75(3), 493–505.
- Casey, J. R., Lomas, M. W., Michelou, V. K., Dyhrman, S. T., Orchard, E. D., Ammerman, J. W., & Sylvan, J. B. (2009). Phytoplankton taxon-specific orthophosphate (Pi) and ATP utilization in the western subtropical North Atlantic. *Aquatic Microbial Ecology*, 58(1), 31–44.
- Chiaudani, G., Marchetti, R., & Vighi, M. (1980). Eutrophication in Emilia-Romagna coastal waters (North Adriatic sea, Italy): A case history. *Progress in water technology*, 12(1), 185-192.
- Chisholm, S. W. (1995). The iron hypothesis: Basic research meets environmental policy. *Reviews of Geophysics*, 33(2 S), 1277–1286.

Cozzi, S., Cabrini, M., Kralj, M., De Vittor, C., Celio, M., & Giani, M. (2020). Climatic and anthropogenic impacts on environmental conditions and phytoplankton community in the gulf of trieste (Northern adriatic sea). *Water (Switzerland)*, 12(9).

Cozzi, S., & Giani, M. (2011). River water and nutrient discharges in the Northern Adriatic Sea: Current importance and long term changes. *Continental Shelf Research*, 31(18), 1881–1893.

Culture, P. M. (1976). Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in the oligotrophic waters of the central North Pacific. *Limnology and Oceanography*, 21, 88-107.

Cupp, E. E. (1943). Marine plankton diatoms of the west coast of North America. University of California press, Berkley and Los Angeles.

Degobbi, D., & Gilmartin, M. (1990). Nitrogen, phosphorus, and biogenic silicon budgets for the northern Adriatic Sea. *Oceanologica Acta*, 13(1), 31–45.

Falkowski, P. G., Barber, R. T., & Smetacek, V. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 281(5374), 200–206.

Round, F.E., Crawford R. M. Mann, D. G. (1992). *The Diatoms, Biology and Morphology Of The Genera*. Cambridge University Press.

Feng T-Y, Yang Z-K, Zheng J-W, Xie Y, Li D-W, Murugan SB, et al. (2015). Examination of metabolic Tricornutum., responses to phosphorus limitation via proteomic analyses in the marine diatom Phaeodactylum tricornutum. *Scientific Reports*, 5, 10373.

Fisher, T. R., Carlson, P. R., & Barber, R. T. (1982). Sediment nutrient regeneration in three North Carolina estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 14(1), 101–116.

Franco, P., & Michelato, A. (1992). Northern Adriatic Sea: Oceanography of the basin proper and of the western coastal zone. *Marine coastal eutrophication*, 35-62.

Gajić-Čapka, M., Tadić, M. P., & Patarčić, M. (2003). A digital annual precipitation map of Croatia | Digitalna godišnja oborinska karta Hrvatske. *Hrvatski Meteoroloski Casopis*, 38, 21–33.

Giani, M., Djakovac, T., Degobbis, D., Cozzi, S., Solidoro, C., & Umani, S. F. (2012). Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *115*, 1–13.

Godrijan, J., Marić, D., Tomažić, 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.

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, *59*(3), 307–321.

Hasle, G. R. (2001). The marine, planktonic diatom family thalassionemataceae: Morphology, taxonomy and distribution. *Diatom Research*, *16*(1), 1–82.

Herndl, G. J., & Reinthaler, T. (2013). Microbial control of the dark end of the biological pump. *Nature Geoscience*, *6*(9), 718–724.

Hoppe, H.-G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series*, *11*, 299–308.

Hoppe, H. G. (2003). Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia*, *493*, 187–200.

Hoppenrath, M., Beszteri, B., Drebes, G., Halliger, H., Van Beusekom, J. E. E., Janisch, S., & Wiltshire, K. H. (2007). Thalassiosira species (Bacillariophyceae, Thalassiosirales) in the North Sea at Helgoland (German Bight) and Sylt (North Frisian Wadden Sea) - A first approach to assessing diversity. *European Journal of Phycology*, *42*(3), 271–288.

<https://planktonnet.awi.de>. (2021). [https://planktonnet.awi.de/index.php?contenttype=image\\_details&itemid=60858#content](https://planktonnet.awi.de/index.php?contenttype=image_details&itemid=60858#content).

<https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton>. (bez dat.). Preuzeto 06. siječanj 2021., od [https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/diatoms/centric/thalassiosira/thalassiosira\\_genus.html?fbclid=IwAR0G9AfayIHXDTtHOKiquBRoQ4cgXvIcgG6k6\\_XL3-1CVJG14bCjIg-OA\\_Q](https://www.eoas.ubc.ca/research/phytoplankton/diatoms/centric/thalassiosira/thalassiosira_genus.html?fbclid=IwAR0G9AfayIHXDTtHOKiquBRoQ4cgXvIcgG6k6_XL3-1CVJG14bCjIg-OA_Q).



Huang, B., & Hong, H. (1999). Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorus by algae in subtropical coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 39(1–12), 205–211.

Ivančić, I., Godrijan, J., Pfannkuchen, M., Marić, D., Gašparović, B., Djakovac, T., & Najdek, M. (2012). Survival mechanisms of phytoplankton in conditions of stratification-induced deprivation of orthophosphate: Northern adriatic case study. *Limnology and Oceanography*, 57(6), 1721–1731.

Ivančić, I., Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Djakovac, T., Marić Pfannkuchen, D., Korlević, M., Gašparović, B., & Najdek, M. (2016). Alkaline phosphatase activity related to phosphorus stress of microphytoplankton in different trophic conditions. *Progress in Oceanography*, 146, 175–186.

Jeffries, M. A., & Lee, C. M. (2007). A climatology of the northern Adriatic Sea's response to bora and river forcing. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 112(3), 1–18.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.

Kooistra, W. H. C. F., Gersonde, R., Medlin, L. K., & Mann, D. G. (2007). The Origin and Evolution of the Diatoms. Their Adaptation to a Planktonic Existence. U: Falkowski P. G & Knoll A. H. (ur.) *Evolution of Primary Producers in the Sea*. Cambridge, Academic Press , str. 207-249.

-Labry, C. T., Delmas, D., & Herbland, A. (2005). *Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activities in relation to phosphate and DOP availability within the Gironde plume waters ( Bay of Biscay )*. 318, 213–225.

Legendre, L. (1990). The significance of microalgal bloom for fisheries and for the export of particulate organic carbon in oceans. *Journal of Plankton Research*, 12, 681–699.

López-cortés, D. J., Núñez-vázquez, E. J., Band-schmidt, C. J., Gárate-lizárraga, I., Hernández-sandoval, F. E., & Bustillos-guzmán, J. J. (2015). *Mass fish die-off during a diatom bloom in the Bahía de La Paz , Gulf of California Mortalidad masiva de peces durante un florecimiento de diatomeas en La Bahía de La Paz , Golfo de California*. 25(1), 39–48.

Lyse Berard-Therriault, Michel Poulin, L. B. (1999). *Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent incluant egalement certains protozoaires*. NRC Research Press.

M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G. M. (2021). *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*. <http://www.algaebase.org>; pristupljeno 02. ožujka 2021.

MacGillivray, M. L., & Kaczmarska, I. (2011). Survey of the efficacy of a short fragment of the rbcL gene as a supplemental DNA barcode for diatoms. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58(6), 529–536.

Mangoni, O., Modigh, M., Mozetič, P., Bergamasco, A., Rivaro, P., Saggiomo, V. (2008). Structure and photosynthetic properties of phytoplankton assemblages in a highly dynamic system, the Northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 77, 633–64.

Marić, D., Kraus, R., Godrijan, J., Supić, N., Djakovac, T., Precali, R. (2012). Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 98-112.

Medić, N. (2020). Fiziološki odgovor odabranih vrsta morskih dijatomeja na ograničene koncentracije fosfora. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Mosetti, F. and Lavenia, A. (1969). Recherche oceanografiche in Adriatico nel periodo 1966– 1968. *Bollettino di Geofisica Teorica ed Applicata*, 9, 191–218.

Mozetič, P., Francé, J., Kogovšek, T., Talaber, I., Malej, A. (2012). Plankton trends and

community changes in a coastal sea (northern Adriatic): Bottom-up vs. top-down control in relation to environmental drivers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 138-148.

Myklestad, S., & Sakshaug, E. (1983). Alkaline phosphatase activity of *Skeletonema costatum* populations in the Trondheimsfjord. *Journal of Plankton Research*, 5(4), 557–564.

Orlić, M., Gacic, M., & La Violette, P. E. (1992). The currents and circulation of the Adriatic Sea. *Oceanologica Acta*, 15(2), 109–124.

Polimene, L., Pinardi, N., Zavatarelli, M., & Colella, S. (2007). The Adriatic Sea ecosystem seasonal cycle: Validation of a three-dimensional numerical model. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 112(3).

Poulain, P.–M.; Raicich, F. (2001.). Forcings. U: Cushman-Roisin, B., Gačić, M., Poulain, P.–M., Artegiani, A. (ur.), *Physical oceanography of the Adriatic Sea*, 45–65. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Neederlands.

Redfield, A. C., Ketchum, B. H., Richards, F. A. (1963). The influence of organisms on the composition of seawater. U: Hill M. N. (Ur.) *The sea*. Interscience, str. 27–77.

Ruttenberg, K. C. (2003):The Global Phosphorus Cycle. U: Schlesinger, W. H. (ur.) *Biogeochemistry*. Oxford, Elsevier, str. 585-643.

Scholin, C.A., Herzog, M., Sogin, M. and Anderson, D. (1994). Identification of group and strain specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *Journal of Phycology*, 30, 999-1011.

Science, R. J. (2013). RNA function and phosphorus use by photosynthetic organisms. *Frontiers in Plant Science*, 4, 536.

Seitzinger, S. P., Harrison, J. A., Dumont, E., Beusen, A. H. W., & Bouwman, A. F. (2005). Sources and delivery of carbon, nitrogen, and phosphorus to the coastal zone: An overview of Global Nutrient Export from Watersheds (NEWS) models and their application. *Global Biogeochemical Cycles*, 19(4), 1–11.

Sieburth, John McN.; Smetacek, Victor; Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure :

Heterotrophic. *Limnology and Oceanography*, 23(6), 1256–1263.

Smodlaka, N. (1986). Primary production of the organic matter as an indicator of the eutrophication in the northern Adriatic sea. *Science of the Total Environment*, 56(C), 211–220.

Stehfest, K., Toepel, J., & Wilhelm, C. (2005). The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7), 717–726.

Strickland JDH, Parsons T. R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis: Fisheries research board of Canada*. 310.

Tanković, M. S., Baričević, A., Ivančić, I., Kužat, N., Medić, N., Pustijanac, E., Novak, T., Gašparović, B., Pfannkuchen, D. M., & Pfannkuchen, M. (2018). Insights into the life strategy of the common marine diatom *Chaetoceros peruvianus* Brightwell. *PLoS ONE*, 13(9), 1–21.

Thomas, Carmelo R. (1996). *Identifying marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press Limited, Cambridge

Thomas, Carmelo R. (1997). *Identifying marine phytoplankton*. Academic Press, Cambridge.

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.

Varela, M., Prego, R., Pazos, Y. (2008). Spatial and temporal variability of phytoplankton biomass, primary production and community structure in the Pontevedra Ria (NW Iberian Peninsula): oceanographic periods and possible response to environmental changes. *Marine Biology*, 154, 483–499.

Viličić, D. (2002). *Fitoplankton Jadranskog Mora*. Školska Knjiga, Zagreb.

Viličić, D. (2014). *Specifična oceanološka svojstva hrvatskog dijela Jadrana*. *Hrvatske*

Vode, 22(90), 297–314.

Viličić, D., Djakovac, T., Burić, Z., & Bosak, S. (2009). Composition and annual cycle of phytoplankton assemblages in the northeastern Adriatic Sea. *Botanica Marina*, 52(4), 291–305.

Viličić, D., Marasović, I., & Mioković, D. (2002). Checklist of phytoplankton in the eastern Adriatic Sea. *Acta Botanica Croatica*, 61(1), 57–91.

Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2011). Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11(3), 173–192.

## 6. ŽIVOTOPIS

Marija Fornažar, rođena 1991. godine u Puli, odrasla u Poreču. U biologiju sam se zaljubila još u osnovnoj školi iako nikad nisam mogla pretpostaviti gdje će me to odvesti. Prvotna ideja da studiram medicinu je prerasla u želju za studiranjem biologije pa sam preddiplomski studij iz biologije i ekologije mora završila 2018. godine u Splitu. Iste godine sam upisala diplomski studij iz ekologije i zaštite prirode, modul more na prirodoslovno matematičkom fakultetu u Zagrebu. Nakon završetka studija namjera mi je nastaviti se baviti biologijom mora.