Fiziološki odgovor odabranih vrsta morskih dijatomeja na ograničene koncentracije fosfora

Medić, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:399105

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Nikola Medić

Fiziološki odgovor odabranih vrsta morskih dijatomeja na ograničene koncentracije fosfora

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Institutu Ruđer Bošković, Centru za istraživanje mora, Laboratoriju za evolucijsku ekologiju i Zavodu za istraživanje mora i okoliša, Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere pod voditeljstvom dr.sc. Daniele Marić Pfannkuchen, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Danieli Marić Pfannkuchen na uloženom vremenu, strpljenju i savjetima oko pisanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem Vam što ste mi pokazali ljepotu planktonskog svijeta i rada za mikroskopom.

Zahvaljujem dr. sc. Zrinki Ljubešić na ispravljanju, strpljenju i savjetima kojima je pridonijela poboljšanju kvalitete ovog rada.

Zahvaljujem dr. sc. Mirti Smodlaka Tanković na ukazanom povjerenju i što mi je povjerila ovakvu temu za diplomski rad te što mi je pomogla savladati sve korake u eksperimentalnom djelu i obradi podataka.

Zahvaljujem dr.sc. Ani Baričević i dr. sc. Emini Pustijanac koje su mi pomogle savladati molekularne metode

Zahvaljujem dr. sc. Martinu Pfannkuchenu kao voditelju Laboratorija za evolucijsku ekologiju koji me naučio raditi na epifluorescentnom mikroskopu i pomogao oko interpretacije rezultata i diskusije.

Zahvaljujem dr. sc. Blaženki Gašparović kao voditeljici Laboratorija za biogeokemiju mora i atmosfere na strpljivosti i pomoći oko laboratorijskog djela rada, analizi i interpretaciji rezultata lipida. Zahvaljujem Vam što ste uvijek vjerovali u mene.

Zahvaljujem dr.sc. Ingrid Ivančić oko savjeta i pomoći izrade supstrata i standarda za mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze.

Zahvaljujem mag. Nataši Kužat koja je pripomogla kada god je bilo potrebno.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za evolucijsku ekologiju što ste me aktivirali i na drugim projektima, uključili me u terenski rad, te mi pokazali ljepotu posla morskog biologa. Zahvaljujem Vam na Vašem društvu, pomoći i predivnim trenutcima na terenu.

Za kraj zahvaljujem svojim roditeljima te široj obitelji, svim prijateljima i kolegama (pogotovo Victoru) što ste mi bili podrška tokom ovih godina studiranja.

Nikola

TEMELJNA DOKUMENTACIJASKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Fiziološki odgovor odabranih vrsta morskih dijatomeja na ograničene koncentracije fosfora

Nikola Medić

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom radu istražen je fiziološki odgovor morskih dijatomeja na ograničene koncentracije fosfora. U laboratorijskim eksperimentima korišteno je 6 vrsta morskih dijatomeja koje su redovito prisutne u fitoplanktonskoj zajednici sjevernog Jadrana: *Pleurosigma elongatum*, *Thalassiosira rotula*, *Paralia sulcata*, *Pseudosolenia calcaravis*, *Chaetoceros peruvianus* i *Chaetoceros contortus*. Svjetlosnom mikroskopijom i filogenetskom analizom potvrđena je taksonomska pripadnost vrsta. Fiziološki odgovor praćen je određivanjem stope rasta, mjerenjem aktivnost alkalne fosfataze, koncentracije fosfata i analizom lipida. Vrijednosti koncentracije fosfata ispod granice detekcije uzrokovale su promjene u stopi rasta, aktivaciju alkalne fosfataze i promjene u sastavu lipida. Rezultati ovog rada dokazuju da je fiziološki odgovor na ograničene koncentracije fosfora specifičan na razini vrste te da svaka od odabranih vrsta ima određene strategije za preživljavanje u uvjetima smanjene koncentracije fosfora. Ovakva istraživanja značajno doprinose razumijevanju kako pojedine vrste utječu na funkcioniranje ekosustava s ograničenim koncentracijama fosfata.

(47 stranice, 26 slika, 24 tablica, 55 bibliografskih referenci; izvornik na hrvatskom jeziku)

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

Ključne riječi: morske dijatomeje, alkalna fosfataza, sjeverni Jadran, ograničenje fosforom

Voditelj: dr. sc. Daniela Marić Pfannkuchen
Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Zrinka Ljubešić
Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Zrinka Ljubešić
2. izv. prof. dr. sc. Petar Kružić
3. prof. dr. sc. Vlasta Čosović
4. izv. prof. dr. sc. Danijel Orešić

Rad je prihvaćen: 01.02.2018

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

Physiological response to phosphorus stress of selected marine diatoms

Nikola Medić

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Physiological response of selected marine diatoms in phosphorus limited conditions was investigated. In laboratory experiments, we used six species of diatoms that are regularly present in the phytoplankton community of the northern Adriatic: *Pleurosigma elongatum*, *Thalassiosira rotula*, *Paralia sulcata*, *Pseudosolenia calcaravis*, *Chaetoceros peruvianus* and *Chaetoceros contortus*. All tested diatoms where identified to the species level by light microscopy and phylogenetic analysis. Physiological response of diatoms during the experiments was determined by growth rate, alkaline phosphatase activity, phosphate concentration and lipid composition. In phosphorus depleted conditions all diatoms species reduced their growth rates and have shown changes in lipid composition, and have activated the extracellular enzyme alkaline phosphatase. The results suggest that the diatoms develop species-specific adaptive strategies to phosphorus stress. Such investigations elucidate the diatom species specific response to the ecosystem functioning in the phosphorus limited conditions.

(47 pages, 26 figures, 24 tables, 55 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library, Roosveltov trg 6, Zagreb

Key words: diatoms, alkaline phosphatase, northern Adriatic, phosphorus limitation

Supervisor: dr. Daniela Marić Pfannkuchen
Co-supervisor: dr. Zrinka Ljubešić, assoc. prof

Reviewers:

1. dr. Zrinka Ljubešić, assoc. prof.
2. dr. Petar Kružić, assoc. prof.
3. dr. Vlasta Čosović, full. prof.
4. dr. Danijel Orešić, assoc. prof.

Thesis accepted: 01.02.2018

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1 Ciklus fosfora u moru 1
1.2 Ograničenje fosforom u moru 2
1.3 Sjeverni Jadran 2
1.4 Dijatomeje 3
1.4.1 Dijatomeje u sjevernom Jadranu 3
1.5 Utjecaj ograničenih koncentracija fosfora na fitoplankton 4
3. MATERIJALI I METODE 7
3.1 Istraživane vrste 7
3.2 Morfološka i molekularna identifikacija istraživanih vrsta 7
3.2.1 Morfološka identifikacija vrsta 7
3.2.2 Molekularna identifikacija vrsta 7
3.3 Priprema hranjivog medija za uzgoj dijatomeja 9
3.4 Eksperimentalni dizajn 10
3.5 Određivanje abundancije stanica u kulturama 10
3.6 Mjerenje enzimske aktivnosti 10
3.7 Određivanje koncentracije fosfata 11
3.9 Lokalizacija alkalne fosfataze na površini stanice 11
3.10 Ekstrakcija i analiza lipida u fitoplanktonskim kulturama 11
3.11 Obrada podataka 13
4. REZULTATI 14
4.1 Fiziološki odgovor vrste *Pleurosigma elongatum* W. Smith 14
4.2 Fiziološki odgovor vrste *Thalasiosira rotula* Meunier 17
4.3 Fiziološki odgovor vrste *Pseudosolenia calcaravis* (Schultze) B. G. Sundström 20
4.4 Fiziološki odgovor vrste *Paralia sulcata* (Ehrenberg) Cleve 24
4.5 Fiziološki odgovor vrste *Chaetoceros peruvianus* Brightwell 27
4.6 Fiziološki odgovor *Chaetoceros contortus* F. Schutt 31
4.7 Sažeti prikaz rezultata za istraživane dijatomeje 34
5 RASPRAVA 35
6 ZAKLJUČAK 40
7 LITERATURA 41

1. UVOD

Fitoplankton obuhvaća heterogenu skupinu autotrofnih i miksotrofnih, jednostaničnih i kolonijalnih organizama koji lebde u vodenom stupcu, te su pasivno nošeni morskim strujama. Živi u eufotičkoj zoni gdje je dostupna dovoljna količina svjetlosti za fotosintezu, te je zaslužan 42% ukupne svjetske neto primarne proizvodnje na Zemlji (Falkowski 1994). S obzirom na raspon veličina stanica, dijeli se na tri veličinske frakcije: (i) mikroplankton (stanice > 20 μm), (ii) nanoplankton (stanice 2 – 20 μm) i (iii) pikoplankton (stanice 0,2 μm- 2 μm) (Sieburth i sur. 1978).

Mikrofitoplankton ima važnu ulogu u biogeokemijskom ciklusu ugljika poznatom kao "biološka pumpa" u kojem fiksira ugljični dioksid iz atmosfere i tako smanjuje njegovu koncentraciju u atmosferi i omogućuje protok ugljika u dublje dijelove oceana (Falkowski 2012.). Glavni predstavnici mikrofitoplanktonske zajednice su: dijatomeje, dinoflagelati i kokolitoforidi.

Dinamika i fiziologija mikrofitoplanktona ovisi o kemijsko fizikalnim svojstvima oceana u kojem dolazi do promjene svjetla, temperature, saliniteta i dostupnosti hranjivih soli. U ovom radu naglasak je stavljen na dijatomeje i fiziologiju prilagodbe na nedostatak fosfora kao jednog od ključnih hranjivih soli za rast i razvoj primarne proizvodnje.

1.1 Ciklus fosfora u moru

Fitoplankton koristi fosfor (P) i dušik (N) kao ključne hranjive soli za rast i metabolizam. Fosfor je biogeni element sa strukturnom i funkcionalnom ulogom u sintezi nukleinskih kiselina (DNA i RNA), fosfolipida u staničnim membranama i staničnog goriva u obliku ATP-a (Paytan i McLaughlin 2007). Jedini značajan unos fosfora u morski ekosustav je trošenje stijena i unos rijekama (Tyrrell 1999). Fosfor dospijeva rijekama u more u dvije frakcije: otopljenoj i partikularnoj. Otopljena frakcija obuhvaća: anorganski, organski i koloidni oblik fosfora. Partikularna frakcija obuhvaća: žive i mrtve planktonske organizme, precipitati fosfornih minerala i amorfne faze fosfora (Paytan i McLaughlin 2007). Otopljena i partikularna frakcija fosfora prisutne su u obliku anorganskih spojeva kao što su ortofosfati, pirofosfati, polifosfati i organskih spojeva kao fosforni esteri i fosforni diesteri. Koncentracije organskog i anorganskog oblika fosfora ovise o procesima asimilacije i remineralizacije u vodenom stupcu. Fitoplankton za svoje fiziološke potrebe unosi u stanicu anorganski fosfor u obliku ortofosfata (PO_4^{3-}) i ugrađuje ga u vlastitu biomasu bez prethodne hidrolize (Cembella i sur. 1984). Proces asimilacije ortofosfata odvija se u eufotičkoj zoni oceana gdje primarni proizvođači imaju

dovoljno svjetlosti za fotosintezu i proizvodnju organske tvari koja ulazi u hranidbeni lanac. Koncentracija ortofosfata raste od eufotičke zone prema većim dubinama gdje prevladavaju procesi razgradnje i remineralizacije organske tvari za koje su većim dijelom zaslužne heterotrofne bakterije (Cotner i Biddanda 2002). Za održavanje primarne proizvodnje potrebno je da se nadoknade asimilirani oblici ortofosfata u eufotičkom sloju. Najefikasniji fizički mehanizam nadoknade hranjivih soli u eufotičkom sloju je uzdizanje duboke vode bogate remineraliziranim hranjivim solima ili donosom rijekama. U posljednje vrijeme velika pažnja posvećena je istraživanju povezanosti dostupnosti fosfora i fitoplanktonske proizvodnje budući da je sve više dokaza o ograničenju fosfora u priobalnim morima.

1.2 Ograničenje fosforom u moru

Morski ekosustav s obzirom na omjere dušika i fosfora može biti opisan kao dušikom ili fosforom ograničen ekosustav. Redfieldov omjer, omjer u kojem fitoplankton asimilira ugljik, dušik i fosfor u omjerima je 106:16:1 (Redfield i sur. 1963). Obzirom na specifičan omjer u kojemu fitoplankton asimilira hranjive soli, proces primarna proizvodnja određen je hranjivom soli koja je najmanje raspoloživa u ekosustavu. Kada je omjer N:P u vodi veći od 30, razvoj fitoplanktona ograničen je fosforom (Smith 1984). Iako su morski ekosustavi većinom ograničeni dušikom, istraživanja su pokazala da područja poput suptropskog djela Atlantika (Rivkin i Swift 1979, Wu 2000), Meksičkog zaljeva (Hardison sur. 2013) i Sredozemnog mora (Thingstad i sur. 2005) su ograničena fosforom. Koncentracija fosfora i ostalih hranjivih soli veća je u priobalnim vodama, nego u otvorenom oceanu, te je različita ovisno o izvorima nutrijenata. Zbog visokog antropogenog unosa dušikovih spojeva putem otpadnih voda, riječnim unosom dušičnih gnojiva i izgaranjem fosilnih goriva priobalni ekosustavi ograničeni su najčešće fosforom (Cloern 2001, Huang i sur. 2003).Visoki Redfieldov omjer u vodama sjevernog Jadranu ukazuje da je primarna proizvodnja ograničena fosforom (Cozzi i Giani 2011).

1.3 Sjeverni Jadran

Jadransko more najsjeverniji je dio Sredozemnog mora (45º ’N), te čini 4,6% njegove ukupne površine. S obzirom na fizičko-kemijska i biološka svojstva dijeli se na 3 dijela: sjeverni, srednji i južni Jadran. Sjeverni Jadran je plitki bazen, s dubinom manjom od 50 metara, te ga karakterizira dotok rijeke Po što potiče primarnu proizvodnju (Degobbis i sur. 1986, Degobbis i Gilmartin 1990). Sliv rijeke Po unosi 50% slatke vode u sjeverni Jadran, čineći tu rijeku najvažnijim izvorom organske tvari i hranjivih soli u Sredozemlju (Pettine i sur. 1998). Smatra se da je dolina rijeke Po jedna od najgušće naseljenih i poljoprivredno najproduktivnijih

područja u Europi. Zbog prekomjernog unosa dušikovih spojeva dolazi do narušavanja N:P omjera (84:1) što uzrokuje ograničenje primarne proizvodnje fosforom (Cozzi i Giani 2011). Koncentracija organskog fosfora nadmašuje koncentraciju ortofosfata što pogoduje rastu i razvoju mikrobne zajednice (Ivančić i Degobbis 1987). Unatoč niskim koncentracijama ortofosfata, sjeverni Jadran predstavlja jedno od najproduktivnijih područja Sredozemnog mora zbog niza prilagodbi koje je mikrofitoplankton razvio kako bi kompenzirao nedostatak tog elementa (Ivančić i sur. 2012, Ivančić i sur. 2016). U sjevernom Jadranu dijatomeje su dominantna taksonomska skupina mikrofitoplanktona. Dominiraju tijekom većeg dijela godine osim ljeti kada dominaciju preuzimanju dinoflagelati i nanoplanktonska frakcija fitoplanktona (Revelante 1976, Viličić i sur. 2009)

1.4 Dijatomeje

Dijatomeje su fotosintetske jednostanične eukariotske mikroalge, pripadaju odjelu Crysophyta, u carstvu Protista. Kozmopolitski su rasprostranjene i žive u kopnenim, slatkovodnim i morskim ekosustavima. Zaslužne su za oko 25% svjetske primarne proizvodnje, imaju bitnu ulogu u biogeokemijskom kruženju ugljika, fiksirajući ugljični dioksid i oslobađajući kisik (Smetacek 1999). Poznavanje biologije i ekologije dijatomeja od ključne je važnosti za shvaćanje globalnih biogeokemijskih ciklusa u moru i atmosferi. Glavna karakteristika je da nemaju staničnu stjenku već je stanica obavijena staklenom ljušturicom, frustulom, građenom od silicijevog dioksida. Frustulu, uz kremen, izgrađuju proteini, polisaharidi i lipidi. Frustula se sastoji od dvije polovice, veće gornje polovice koja se naziva epiteka i manje donje polovice koja se naziva hipoteka. S obzirom na simetriju stanice dijatomeje se dijele u dva reda: centrične, koje imaju radijalno simetričnu stanicu i prevladavaju u planktonu te penatne, koje su bilateralno simetrične i prevladavaju u bentosu. Razmnožavaju se spolno i nespolno, a u nepovoljnim uvjetima mogu stvarati i spore.

1.4.1 Dijatomeje u sjevernom Jadranu

Sjeverni Jadran karakteriziraju dva maksimuma razvoja fitoplanktona (Aubry i sur. 2012). Dijatomeje dominiraju fitoplanktonskom zajednicom u veljači, srpnju i rujnu dok u svibnju prevladavaju dinoflagelati (Marić i sur. 2012, Aubry i sur. 2012). U površinskom sloju dijatomeje postižu visoku abundanciju (veću od 5×10^6 stanica/L) (Viličić i sur. 2002a). Dominanacija dijatomeja često je praćena sa pojavom sluzavih agregata koji se pojavljuju u kasno proljeće i početak ljeta (Totti i sur 2005). U istraživanjima koja su proveli Viličić i sur. (2009) i Godrijan i sur. (2013) pokazalo se da su glavni predstavnici zajednice dijatomeja rodovi: *Chaetoceros, Pseudo-nitzschia, Proboscia, Rhizosolenia, Pseudosolenia, Cerataulina,*

Leptocylindrus i *Thalassionema*. Vrijednosti abundancije stanica dijatomeja *Cerataulina pelagica*, *Chaetoceros socialis*, *Chaetoceros vixvisibilis* i *Pseudo-nitzschia* sp. u periodu istraživanja od 2002. do 2007. bile su veće od 10^6 stanica/L (Viličić 2009). Karakteristične proljetne vrste dijatomeja su *Leptocylindrus minimus*, *Chaetoceros throndsenii* koje uspijevaju kod niskih vrijednosti saliniteta i većeg dotoka rijeke Po (Godrijan i sur. 2013). Ljetne vrste *Chaetoceros vixvisibilis* i *Proboscia alata* preferiraju topliju vodu i niske koncentracije silikata i nitrata (Godrijan i sur. 2013). Jesensku zajednicu karakteriziraju vrste *Asterionellopsis glacialis*, *Chaetoceros socialis* i *Lioloma pacificum* koje su povezane s uvjetima visokih koncentracija hranjivih soli (Godrijan i sur. 2013). U jesenskom razdoblju *Pseudo-nitzschia* ima najveću abundanciju među potencijalno toksičnim vrstama dijatomeja u sjevernom Jadranu (Marić i sur. 2011, Godrijan i sur. 2013). Zimi prevladavaju velike dijatomeje poput *Neocalyptrella robusta*, *Thalassiosira rotula* i *Pseudosolenia calcaravis* koje preferiraju hladnu vodu i dobro izmiješan vodeni stupac (Godrijan i sur 2013). Osim sezonskih vrsta također utvrđene su vrste koje su prisutne tokom cijele godine: *Cerataulina pelagica*, *Thalassionema nitzschioides*, *Guinardia flaccida*, *Rhizosolenia imbricata*, *Guinardia striata* i *Dactyliosolen fragilissimus* (Godrijan i sur. 2013).

1.5 Utjecaj ograničenih koncentracija fosfora na fitoplankton

Glavni biokemijski rezervoari fosfora u morskom planktonu su nukleinske kiseline i fosfolipidi (Van Mooy i sur. 2006). Ograničenost fosforom inducira fiziološke odgovore u fitoplanktonskim stanicama aktiviranjem hidrolitičkih enzima i smanjenjem fizioloških potreba za fosforom (Van Mooy i sur. 2006, Dyhrman i Ruttenberg 2006). Alkalna fosfataza fitoplanktona je membranski enzim koji hidrolizira fosfodiestersku vezu u organskim spojevima i omogućuje korištenje organske tvari kao izvore fosfora (Labry i sur. 2005). Aktivnost alkalne fosfataze korištena je kao indikator fosfor limitacije u mnogim morskim ekosustavima (Hoppe 2003). U nedostatku ortofosfata može doći do promjene u lipidnom dvosloju stanične membrane kako bi se održale normalne funkcije u unutrašnjosti stanice (Guschina i Harwood 2006). Neke vrste mikroalga zbog nedostatka fosfora mogu udvostručiti sadržaj lipida u stanici (Thompson 1996). U morima sa smanjenom koncentracijom fosfata fitoplankton zamjenjuje fosfolipidnu membranu ne-fosfolipidnom (Van Mooy i sur. 2009).

U sjevernom Jadranu za vrijeme ljetne stratifikacije vodenog stupca, unatoč niskoj koncentraciji ortofosfata, produktivnost je visoka. Niske koncentracije ortofosfata induciraju aktivaciju alkalne fosfataze kod fitoplanktona i povećanu sintezu ne-fosfornih lipida kao mehanizme preživljavanja (Ivančić i sur. 2012). Dokazano je da kod fitoplanktona dolazi do veće sinteze

glikolipida umjesto fosfolipida kao mehanizam skladištenja fosfata (Gašparović i sur. 2013). Mikrofitoplankton s velikom doprinosom zajednice dijatomeja aktivira alkalnu fosfatazu kao fiziološki odgovor na ograničene koncentracije fosfata (Ivančić i sur. 2016). Aktivacija alkalne fosfataze regulirana je dostupnošću ortofosfata te ima značajnu ulogu u regeneraciji anorganskog fosfora u sjevernom Jadranu (Ivančić i sur. 2016).

2. CILJEVI RADA

Poznavanje ekologije mikrofitoplanktona bitno je za razumijevanje funkcioniranja morskog ekosustava. Mikrofitoplankton po svojoj biomasi je dominantna grupa fitoplanktonske zajednice u sjevernom Jadranu. Cilj ovog rada je istražiti fiziološke odgovore odabranih vrsta dijatomeja unutar mikrofitoplanktonske zajednice na ograničene koncentracije fosfora s nizom eksperimenata.

Ciljevi:

1. utvrditi koje vrste aktiviraju alkalnu fosfatazu u uvjetima ograničene koncentracije fosfora i usporediti enzimsku aktivnost u obogaćenom mediju i mediju s ograničenom koncentracijom fosfora.
2. usporediti promjene stope rasta u obogaćenom mediju i mediju s ograničenom koncentracijom fosfora.
3. usporediti dinamiku unosa fosfata u kulturama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Istraživane vrste

U laboratorijskim eksperimentima korištene su monoklonalne kulture dijatomeja (Tablica 1.) iz zbirke Centra za istraživanje mora, Rovinj.

Tablica 1. Vrste morskih dijatomeja korištene u laboratorijskim eksperimentima

Vrsta	Soj	Datum uzorkovanja	Postaja
Pleurosigma elongatum	CIM 860	1.3.2015	M300
Thalassiosira rotula	CIM 861	27.1.2017	SJ107
Pseudosolenia calcaravis	CIM 862	27.1.2017	SJ108
Chaetoceros peruvianus	CIM 863	4.11.2016	LIM01
Chaetoceros contortus	CIM 864	28.3.2017	RV001
Paralia sulcata	CIM 865	16.11.2016	RV001

3.2 Morfološka i molekularna identifikacija istraživanih vrsta

Sve istraživane vrste identificirane su pomoću svjetlosnog mikroskopa a njihova taksonomska pripadnost potvrđena je molekularnim metodama.

3.2.1 Morfološka identifikacija vrsta

Morfološka identifikacija vrsta provedena je na invertnom svjetlosnom mikroskopu Zeiss Axiovert 200. Kapljica svježe kulture dodana je na predmetno stakalce i pokrivena je pokrovnicom. Stanice su slikane s kamerom Zeiss Axiovert. Da bi se morfološki odredile korišteni su standardni ključevi za identifikaciju morskog fitoplanktona (Tomas 1997, Viličič 2002b).

3.2.2 Molekularna identifikacija vrsta

Za genetsku analizu filtrirano je 30 mL kulture na GF/F filterima promjera 3µm. Pomoću komercijalnog DNeasy® Plant Mini kita (Qiagen) prema uputama proizvođača izolirana je genomska DNA. Čistoća i koncentracija izolirane genomske DNA provjerena je spektrometrijski na Nanophotometer® P-Class (Implen). Reakcijom lančane reakcije

polimeraze (PCR) umnoženi su 18S i 28S rRNA molekularni markeri sa specifičnim početnicama (Tablica 2.).

Tablica 2. Početnice korištene u PCR reakcijama za 18S rRNA i 28S rRNA.

Molekularni markeri	**Naziv**	**Sekvenca početnice 5'-3'**	**Literatura**
18S rRNA	M13R-D978	GACTACGATGGTATCTAATC	(Zimmermann i sur. 2011)
	M13F-D512	ATTCCAGCTCCAATAGCG	(Zimmermann i sur. 2011)
28S rRNA	D1R	ACCCGCTGAATTTAAGCATA	(Amato i sur. 2007)
	D3Ca	ACGAACGATTTGCACGTCAG	(Amato i sur. 2007)

Reakcijska smjesa (Tablica 3.) i PCR uvjeti prilagođeni su za pojedini molekularni marker (Tablica 4.). Prilikom svake PCR reakcije korištena je i negativna kontrola, bez DNA kalupa, kao provjerila čistoće pojedinih reagensa i pribora.

Tablica 3. Reakcijska smjesa reagensa za PCR

Reagens	**Volumen za jednu reakciju (µL)**
dH_2O	7,5
Reakcijska smjesa ($MgCl_2$, pufer/ dNTP /*Taq* polimeraza)	12,5
Početnica F	1,5
Početnica R	1,5
Genomska DNA	2

Tablica 4. PCR uvjeti za molekularne markere 18S rRNA i 28S rRNA.

Korak reakcije	18S rRNA (temperatura/ trajanje)	28S rRNA (temperatura/trajanje)
Inicijalna denaturacija	95 ºC / 5 min	95 ºC /3 min
Denaturacija	95º C / 30 s	95 ºC /50 s
Sparivanje početnica	50 ºC /40 s	50 ºC / 50 s
Produljivanje lanca DNA	72 ºC / 1 min	72 ºC /1,5 min
Završno produljivanje lanca DNA	72 ºC /5 min	72 ºC /7 min
Hlađenje	4 ºC / ∞	4 ºC / ∞

Produkti i uspješnost PCR reakcije provjerena je elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. PCR produkti pročišćeni pomoću kita su prema uputama proizvođača (MINELUT, PCR Purification kit, Quiagen) i poslani na sekvenciranje u tvrtku Macrogen Inc. (Nizozemska). Dobivene sekvence provjerene su mrežnim alatom za lokalno sravnjenje BLAST (Basic Local Alignment Tool) (Altschul i sur. 1997.) te su uspoređene sa svim dostupnim sekvencama u bazi podataka GenBank, NCBI.

3.3 Priprema hranjivog medija za uzgoj dijatomeja

Za uzgoj morskih dijatomeja korišten je obogaćeni medij f/2 pripremljenom po Guillardu (1975). Medij se sastoji od sterilne morske vode, osnovnih hranjivih soli, metala u tragovima i vitamina. Morska voda korištena za izradu medija bila je stara najmanje 2 mjeseca i držana u mraku da se reducira aktivnost i broj živih organizama. Filtrirana je Millipore sustavom za filtraciju na membranskom filteru promjera pora 0,2 μm kako bi se odstranile slobodne bakterije a zatim kuhana je u mikrovalnoj pećnici 20 minuta na 100º C. U 1 L morske vode dodano je 1 mL hranjivih soli ($NaNO_3$, Na_2SiO_3 x $9H_20$, NaH_2PO_4 x H_20), mikronutrijenata (metali u tragovima) i 1 mL vitamina. Istim postupkom za eksperimentalne potrebe pripremljen je i medij s ograničenom koncentracijom fosfata (bez dodatka anorganskog oblika fosfora NaH_2PO_4 x H_20). U nastavku ovog rada koristiti će se izrazi f/2 za obogaćeni medij i P-limit za

medij s ograničenom koncentracijom fosfata. Kod izrade medija bilo je potrebno maksimalno paziti da ne dođe do kemijske ili biološke kontaminacije, određeni stupanj bakterijske kontaminacije često je prihvatljiv.

3.4 Eksperimentalni dizajn

Za laboratorijske eksperimente stanice su uzgajane u triplikatima u f/2 mediju i odnosno P-limit mediju. Iz matične kulture po 2 mL suspenzije stanica presađen je u bočice s volumenom medija 200 mL. Prilagodba stanica eksperimentalnim uvjetima trajala je 48 h u inkubacijskoj komori. Tijekom laboratorijskih eksperimenata kulture su bile u komorama pod kontroliranim uvjetima sa konstantnom temperaturom 16 ºC, sa fotoperiodom 12 h svijetla i 12 h tame i intenzitetom svjetlosti 4500 luxa. Svaki drugi dan praćena je promjena stope rasta, enzimska aktivnost i određivana je dinamika fosfata u kulturama ovisno o dostupnosti fosfora u mediju uzgoja. U posljednjem danu uzgoja određena je kinetika enzimske reakcije i prikupljeni su uzorci kulture za analizu lipida.

3.5 Određivanje abundancije stanica u kulturama

Abundancija stanica u kulturama određena je svaki drugi dan brojanjem stanica u Sedgewick Rafter komoricama za brojanje na invertnom mikroskopu Zeiss Axiovert 200. Prije uzorkovanja stanica kulture su pažljivo i dobro homogenizirane. Stanice su brojane u 1 mL metodom nasumično odabranih polja pod povećanjem 200 x. Dobivene vrijednosti stanica u µL preračunate su u broj stanica po litri (stanica/L).

3.6 Mjerenje enzimske aktivnosti

Za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze (APA) korišteni je florogeni supstrat, metilumbeliferil fosfat (MUF-P) prema proceduri opisanoj u Hoppe i sur. (2003). MUF-P je otopljen u organskom otapalu 2-Metoksietanolu i razrijeđen u deioniziranoj vodi prije korištenja. Kulture stanica lagano su homogenizirane, 200 µL kulture svakog triplikata dodano je u triplikatu u mikrotitarske ploče. Kao kontrole korišteni su f/2 medij, P-limit medij, prethodno filtrirana i prokuhana morska voda i destilirana voda. U sve jažice dodano je 50 µL MUF-P koncentracije 50 µM i odmah je mjerena fluorescencija na spektrofluorimetru za mikroploče Infinite M200 PRO (Tecan Trading AG, Švicarska) pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 375 nm i emisijskoj valnoj duljini od 405 nm. Reakcija je inkubirana na 16°C u mraku te je aktivnost alkalne fosfataze mjerena je u intervalima od 10, 30 i 60 minuta. Za izradu standardne krivulje korištena je rastuća koncentracija produkata MUF (0-1500 µM) koji nastaje razgradnjom supstrata MUF-P.

3.7 Određivanje koncentracije fosfata

Fosfati su određeni kolorimetrijskom metodom prema proceduri Strickland-a i Parsons-a (1972). U prozirne mikrotitarske ploče dodano je 200 µL kulture. Kao kontrole korišteni su f/2 medij, P-limit medij, prethodno filtrirana i prokuhana morska voda i destilirana voda. U svaku jažicu s uzorkom, uključujući i standarde, dodano je po 20 µL supstrata (molibdat-sumporna kiselina-askorbat-tartarat u omjeru 1:2.5:1:0.5). Inkubacija reakcije je trajala 1 h na sobnoj temperaturi. Koncentracija fosfata određena je u spektrofluorimetru za mikroploče Tecan Infinite M200 PRO (TECAN, Švicarska) pri valnoj duljini od 690 nm. Za izradu standardne krivulje korišten je padajući niz koncentracija (0.1 - 40 µM) standarda (KH_2PO_4).

3.8 Određivanje kinetike

Kinetički parametar aktivnosti alkalne fosfataze određivan je za sve vrste koje su aktivirale alkalnu fosfatazu. Određivanje kinetike provedeno je po proceduri Labry i sur. (2005). U mikrotitarske ploče dodano je 200 µL kulture i 50 µL supstrata različitih koncentracija supstrata MUF-P (0.5 - 50 µM). Fluorescencija je mjerena na spektrofluorimetru za mikroploče Infinite® M200 PRO (Tecan Trading AG, Švicarska) pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 375 nm i emisijskoj valnoj duljini od 405 nm. Reakcija je inkubirana na 16°C u mraku te je aktivnost alkalne fosfataze mjerena je u intervalima od 0, 10, 30 i 60 minuta. Za izradu standardne krivulje korištena je rastuća koncentracija produkata MUF (0-1500 µM) koji nastaje razgradnjom supstrata MUF-P.

3.9 Lokalizacija alkalne fosfataze na površini stanice

Za lokalizaciju alkalne fosfataze na površini stanica korišten je fosfomonoesterski supstrat ELF®97 (Endogenous Phosphatase Detection Kit, E6601, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Na pokrovno stakalce dodano je 10 µl kulture iz P-limit medija i 50 µL supstrata. ELF signal je lokaliziran na površini stanice na epifluorescentnom mikroskpu Zeiss (Njemačka) pri valnoj duljini 405 nm eksitacije po metodi koju su predložili Dyhrman i Palenik (1999).

3.10 Ekstrakcija i analiza lipida u fitoplanktonskim kulturama

Lipidi su uzorkovani filtriranjem 80 mL kulture na GF/F filterima promjera pora 0,7 µm. Za ekstrakciju partikularnih lipida homogenizirani su GF/F filteri dodatkom monofazne smjese (metanol-diklormetan-voda) i točno određene količine n-heksadekanona koji služi kao unutarnji standard za određivanje konačne koncentracije lipida. Ekstrahirani su diklormetanom, metanolom, vodom i otopinom natrijevog klorida po postupku koji su predložili Bligh i Dyer (1959). Ekstrakti su upareni do suha strujom dušika i pohranjeni u staklene inserte do daljnje

analize. Suhim ekstraktima dodana je točno određena količina diklormetana, nakon čega je alikvot uzorka nanešen na staklene štapiće obložene silikagelom (kromarode) poluautomatskim uzorkivačem (model SES 3202/IS-02; Analysesystem, Bechemheim, Njemačka). Kromarode su provedene kroz sustav otapala rastuće polarnosti (Tablica 5.), gdje u svakoj kupelji dolazi do razdvajanja određenih klasa lipida. Uzorci su snimljeni na tankoslojnom kromatografu IATROSCAN MK-6 (TLC/FID-FPD) (Mitsubishi Kagaku Iatron, INC, Tokyo, Japan) a sve klase lipida su analizirane po metodi koju su predložili Gašparović i sur. (2015). Kromatogrami dobiveni snimanjem pripisani su pojedinoj klasi lipida na osnovu usporedbe sa standardima. Određivanjem površine svakog pika i pomoću kalibracijskih krivulja određene su točne količine pojedinih lipidnih klasa u analiziranim uzorcima.

Tablica 5. Prikaz sastava otapala rastuće polarnosti za odjeljivanje lipidnih klasa

Otapala	**Volumni omjeri**	**Vrijeme razvijanja/min**	**Lipidna klasa**
n-heksan: dietileter:mravlja kiselina	97:3:0,2	28	HC, WE, ME, KET
heksan:dietileter:mravlja kiselina	80:20:0,1	30	TG i FFA
heksan:dietileter:mravlja kiselina	80:20:0,1	20	ALC, 1,3 DG, ST i 1,2 DG
kloroform:aceton:mravlja kiselina	95:5:0,6	32	PIG i MG
kloroform:aceton	28:72	30	MGDG i DGDG
aceton:kloroform:metanol:mravlja kiselina	33:33:33:0,6	40	SQDG i PG
kloroform:metanol:amonijev hidroksid	50:50:5	30	PE i PC

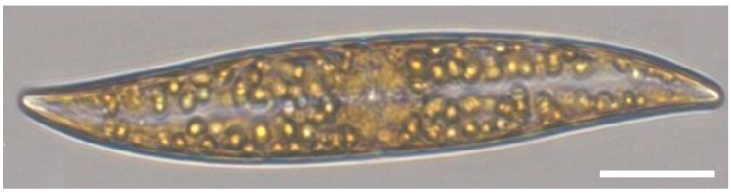
3.11 Obrada podataka

Svi rezultati u ovom radu obrađeni su i prikazani korištenjem programa Microsoft Excel (Microsoft Office 2016.). Podaci su obrađeni u programu R studio (R: A Language and Environment for Statistical Computing 2015.). Generacijsko vrijeme stanica, maksimalni doseg generacijskog vremena i kinetički parametri izračunati su R paketom po predlošku Ritza i sur. (2015).

4. REZULTATI

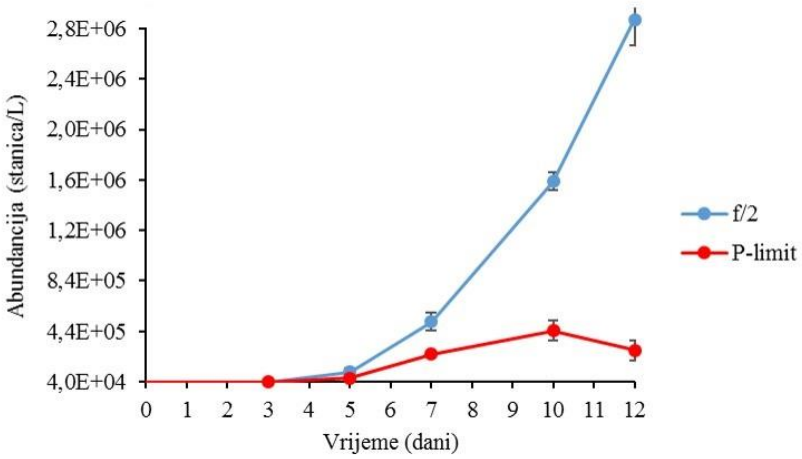
4.1 Fiziološki odgovor vrste *Pleurosigma elongatum* W. Smith

Slika 1 prikazuje stanicu *P. elongatum* CIM 860 na svjetlosnom mikroskopu. Taksonomska pripadnost potvrđena je sekvenciranjem 18S i 28S molekularnih markera. Vrsta *P. elongatum* je penatna dijatomeja, veličine od 120-130 μm. Vrsta je uglavnom bentička i rijetko je nalazimo u planktonu. Stanice ne formiraju kolonije.



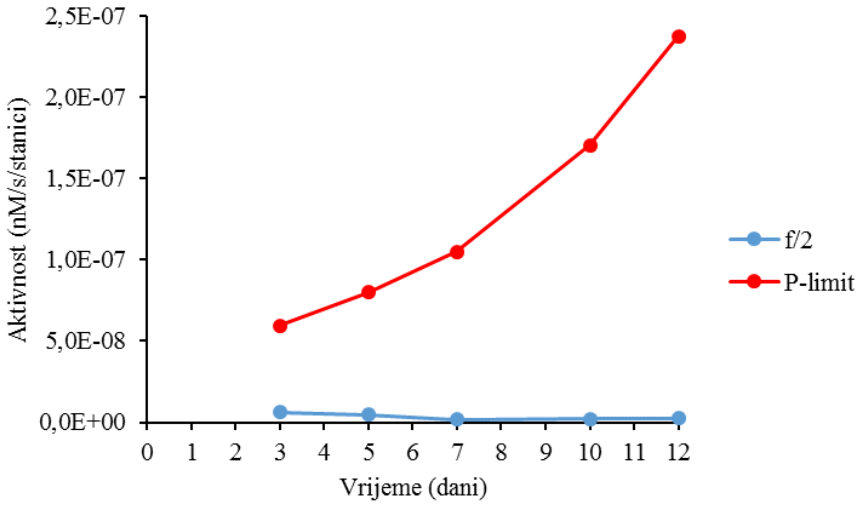
Slika 1. Stanica *Pleurosigma elongatum* CIM 860 na svjetlosnom mikroskopu (skala 50 μm, kontrast Nomarski)

Krivulja rasta (Slika 2.) prikazuje porast abundancije stanica *P. elongatum* u 12-o dnevnom eksperimentu. U f/2 mediju stanice su rasle od 4.94×10^4 do 2.91×10^6 stanica/L. U P-limit mediju abundancija stanica porasla od 3.94×10^4 do 2.89×10^5 stanica/L. U posljednjem danu eksperimenta u f/2 mediju stanice su i dalje bile u eksponencijalnom rastu. U P-limit mediju nastupila je stacionarna faza u osmom danu eksperimenta. U desetom danu postignut je maksimum abundancije (4.45×10^5stanica/L), a u posljednjem danu eksperimenta abundancija opada. Generacijsko vrijeme stanica u f/2 mediju bilo je 1.24 dana dok u P-limit mediju 0.43 dana. U f/2 mediju najbrže generacijsko vrijeme bilo je u 11-om danu eksperimenta dok u P-limit mediju u sedmom danu.



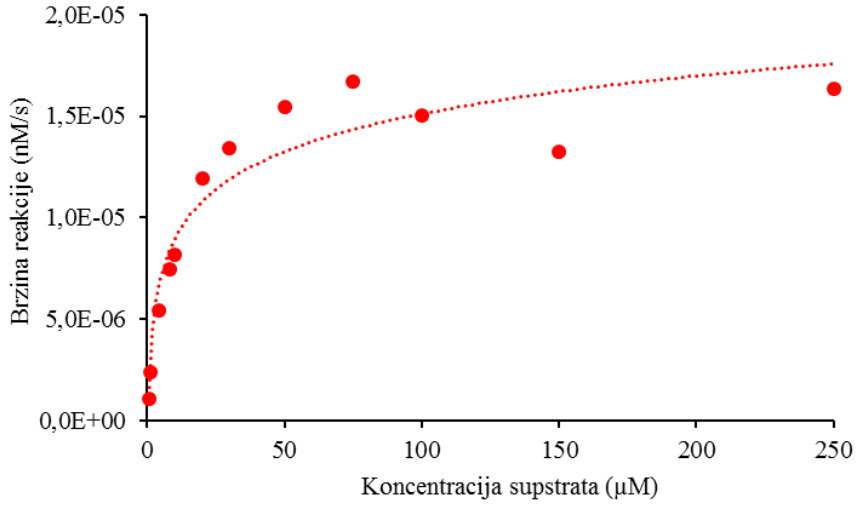
Slika 2. Krivulja rasta *Pleurosigma elongatum* u f/2 i P-limit mediju kroz 12 dana eksperimenta

U P-limit mediju stanice *P. elongatum* aktivirale su alkalnu fosfatazu (Slika 3.). Specifična aktivnost rasla je kroz 12 dana, najveća je bila u posljednjem danu eksperimenta.



Slika 3. Porast specifične aktivnosti alkalne fosfataze *Pleurosigma elongatum* u P-limit mediju kroz 12 dana eksperimenta

Za bolje opisivanje svojstava enzima, izmjerena je aktivnost pri različitim koncentracijama supstrata (Slika 4.). Pomoću Michaelis-Menten-ovog modela enzimski katalizirane reakcije određena je Michaelis-Menten-ova konstanta (Km) i maksimalna brzina reakcije (Vm) za određenu abundanciju stanica (2.89×10^5 stanica/L). Vrijednosti kinetičkih parametara prikazane su u Tablici 6.



Slika 4. Michaelis-Mentenova krivulja alkalne fosfataze kod vrste *Pleurosigma elongatum* u P-limit mediju

Tablica 6. Kinetički parametri alkalne fosfataze kod vrste *P. elongatum* u P-limit mediju

Michaelis-Mentenova konstanta (Km)	8.464 μM
Maksimalna brzina reakcije (Vm)	1.664×10^{-5} nM/s

Analizom fosfata u f/2 mediju na početku i na kraju eksperimenta (Tablica 7.) utvrdilo se da su stanice *P. elongatum* potrošile 6.1 μM fosfata dok je u P-limit mediju koncentracija bila ispod granice detekcije. U f/2 mediju stanice su dnevno koristile 0.61 μM fosfata.

Tablica 7. Koncentracije fosfata u f/2 i P-limit mediju na početku i na kraju 12-o dnevnog eksperimenta s vrstom *P. elongatum*

Koncentracija PO_4 (μM/L)	**Početak eksperimenta**	**Kraj eksperimenta**
f/2	38.95	32.85
P-limit	<0.05	<0.05

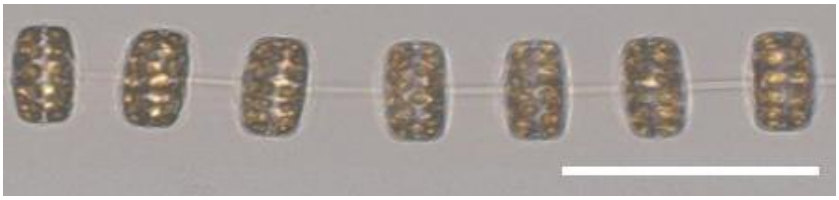
Rezultati lipida prikazani su kao promjena udjela (%) lipida s obzirom na dostupnost fosfata (Tablica 8.). Osnovne značajne promjene sastava lipida (podebljane brojke) u ovom eksperimentu su porast lipida koji predstavljaju indikatore razgradnje (zbroj slobodnih masnih kiselina, masnih alkohola, monoglicerida i diglicerida) i lipida s ulogom energetske rezerve, triglicerida u P-limit mediju. Razlike u glikolipidima i fosfolipidima za ovu vrstu bile su neznatne između dva medija.

Tablica 8. Postotak lipidnih klasa i indikatora razgradnje u f/2 i P-limit mediju na kraju eksperimenta s vrstom *P. elongatum*

Medij	**Indikator razgradnje (%)**	**Trigliceridi (%)**	**Glikolipidi (%)**	**Fosfolipidi (%)**
f/2	20	16	17	19
P-limit	**28**	**27**	15	21

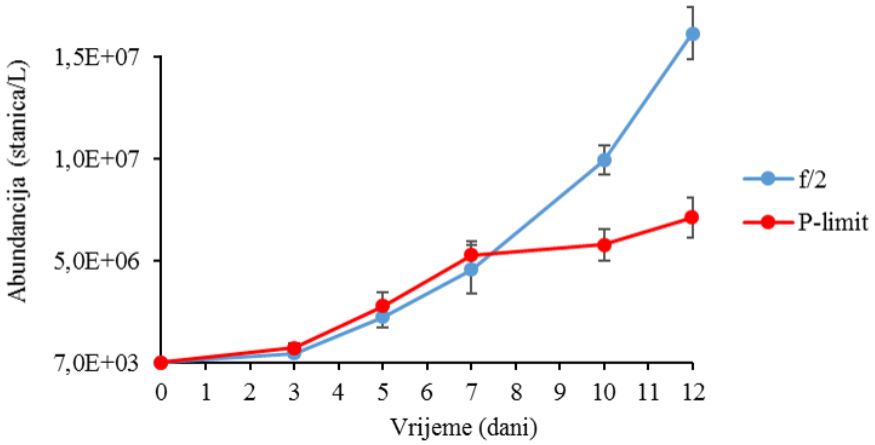
4.2 Fiziološki odgovor vrste *Thalasiosira rotula* Meunier

Slika 5. prikazuje lanac stanica vrste *T. rotula* CIM 861 slikan na svjetlosnom mikroskopu. Taksonomska pripadnost potvrđena je sekvenciranjem 18S i 28S molekularnih markera. *T. rotula* je centrična dijatomeja s radijalnom simetrijom. Ovo je tipična planktonska vrsta. Jedno od obilježja vrste je da radi duge kolonije koje su međusobno povezane organskim nitima. Veličina stanice od 8 do 55 µm u promjeru.



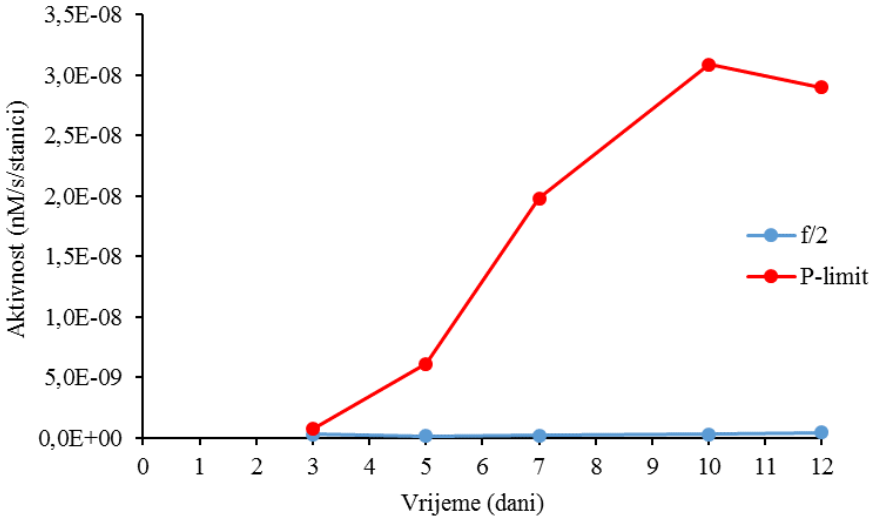
Slika 5. Lanac stanica *Thalasiosira rotula* CIM 861 na svjetlosnom mikroskopu (skala 50 µm, kontrast Nomarski)

Krivulja rasta (Slika 6.) prikazuje porast abundancije stanica *T. rotula* u 12-o dnevnom eksperimentu. U f/2 mediju stanice su rasle od 7.33 $\times 10^3$ do 1.62 $\times 10^7$ stanica/L dok je u P-limit mediju abundancija porasla od 7.33 $\times 10^3$ do 7.14 $\times 10^6$ stanica/L. U f/2 mediju izostala je stacionarna faza dok u P-limit mediju stanice su ušle u stacionarnu fazu u sedmom danu eksperimenta. Tijekom uzgoja u oba medija maksimalna abundancija postignuta je u posljednjem danu eksperimenta. Generacijsko vrijeme stanica u f/2 mediju bilo je 1.83 dana dok u P-limit mediju 0.84 dana. U f/2 mediju najbrže generacijsko vrijeme bilo je u 12-om danu dok u P-limit mediju u petom danu eksperimenta.



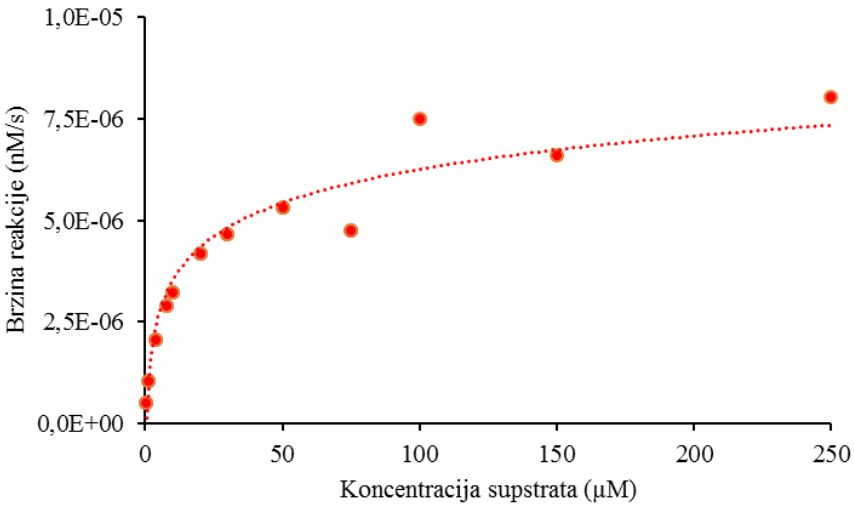
Slika 6. Krivulja rasta *Thalasiosira rotula* u f/2 i P-limit mediju kroz 12 dana eksperimenta

U P-limit mediju stanice vrste *T. rotula* aktivirale su alkalnu fosfatazu (Slika 7.). Specifična aktivnost rasla je kroz dane eksperimenta. Najveća specifična aktivnost bila je u desetom danu eksperimenta, dok je u posljednjem danu došlo do pada aktivnosti.



Slika 7. Porast specifične aktivnosti alkalne fosfataze *Thalasiosira rotula* u P-limit mediju kroz 12 dana eksperimenta

Za bolje opisivanje svojstava enzima, izmjerena je aktivnost pri različitim koncentracijama supstrata (Slika 8.). Pomoću Michaelis-Menten-ovog modela enzimski katalizirane reakcije određena je Michaelis-Menten-ova konstanta (Km) i maksimalna brzina reakcije (Vm) za određenu abundanciju stanica (7×10^6 stanica/L). Vrijednosti kinetičkih parametara prikazane su u Tablici 9.



Slika 8. Michaelis-Mentenova krivulja alkalne fosfataze kod vrste *Thalasiosira rotula* u P-limit mediju

Tablica 9. Kinetički parametri alkalne kod vrste *T. rotula* fosfataze u P-limit mediju

Michaelis-Mentenova konstanta (Km)	15.07 μM
Maksimalna brzina reakcije (Vm)	7.504×10^6 μM/s

Analizom fosfata u f/2 mediju na početku i na kraju eksperimenta (Tablica 10.) utvrdilo se da su stanice *T. rotula* potrošile 6.73 μM fosfata dok je u P-limit mediju koncentracija bila ispod granice detekcije. U f/2 mediju stanice su dnevno koristile 0.673 μM fosfata.

Tablica 10. Koncentracije fosfata u f/2 i P-limit mediju na početku i na kraju 12-o dnevnog eksperimenta s vrstom *T. rotula*

Koncentracija PO_4 (μM/L)	**Početak eksperimenta**	**Kraj eksperimenta**
f/2	38.97	32.23
P-limit	<0.05	<0.05

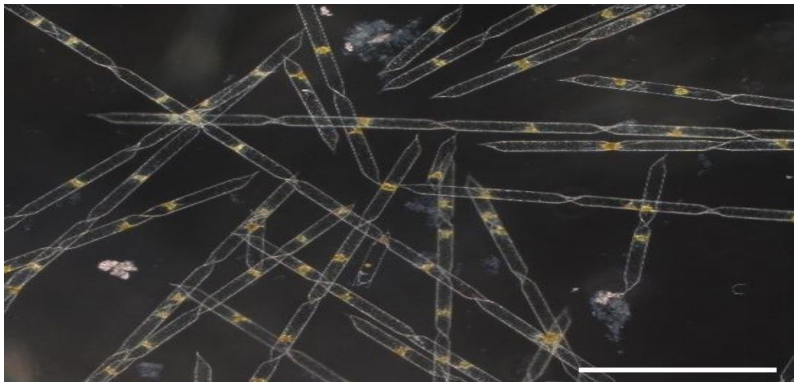
Rezultati lipida prikazani su kao promjena udjela (%) lipida s obzirom na dostupnost fosfora (Tablica 11.). Osnovne značajne promjene u sastavu lipida (podebljane brojke) u ovom eksperimentu bile su porast lipida s ulogom energetske rezerve (triglicerida) i manji postotak fosfolipida (zbroj fosfatidilglicerola, fosfatidiletanolamina i fosfatidilkolina) u P-limit mediju.

Tablica 11. Postotak lipidnih klasa i indikatora razgradnje u f/2 i P-limit mediju na kraju eksperimenta s vrstom *T. rotula*

Medij	**Indikator razgradnje (%)**	**Trigliceridi (%)**	**Glikolipidi (%)**	**Fosfolipidi (%)**
f/2	26	9	21	21
P-limit	21	**33**	18	**19**

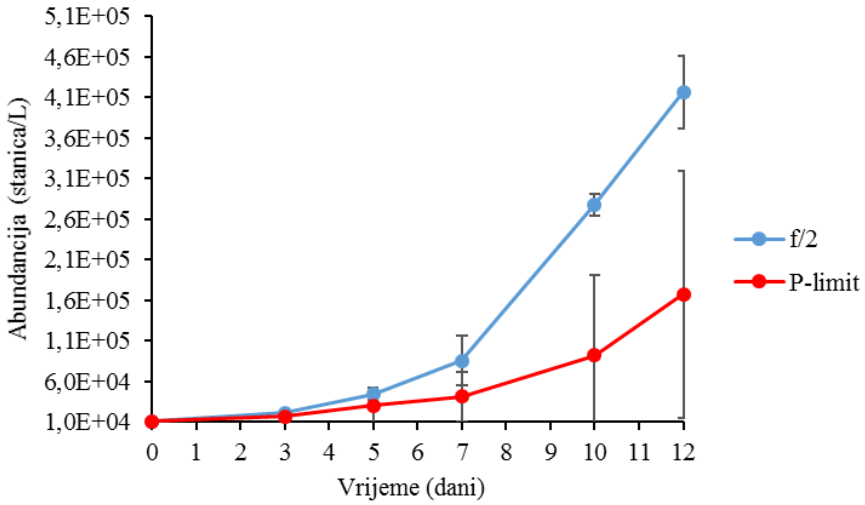
4.3 Fiziološki odgovor vrste *Pseudosolenia calcaravis* (Schultze) B. G. Sundström

Slika 9. prikazuje lance stanica *P. calcaravis* CIM 862 na svjetlosnom mikroskopu. Taksonomska pripadnost potvrđena je sekvenciranjem 18S i 28S molekularnih markera. *P. calcaravis* spada u dijatomeje s radijalnom simetrijom. Stanice mogu biti pojedinačne ili povezane u kolonije. Veličina stanice od 40-44 µm u promjeru dok dužina može biti do 1 mm. Prevladava u planktonu.



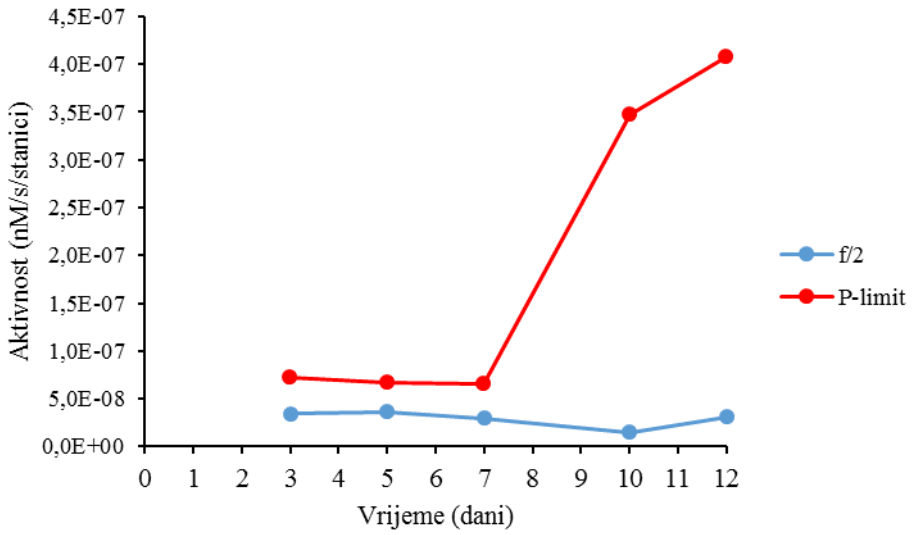
Slika 9. Monoklonalna kultura stanica *Pseudosolenia calcaravis* CIM 862 na svjetlosnom mikroskopu (skala 50 µm)

Krivulja rasta (Slika 10.) prikazuje porast abundancije stanica *P. calcaravis* u 12-o dnevnom eksperimentu. U f/2 mediju stanice su rasle od 1.08×10^4 do 4.17×10^5 stanica/L dok u P-limit mediju od 1.08×10^4 do 1.68×10^5 stanica/L. U oba medija izostala je stacionarna faza. Generacijsko vrijeme stanica u f/2 mediju bilo je 0.341 dana dok u P-limit mediju 0.382 dana. U f/2 mediju najbrže generacijsko vrijeme bilo je u devetom danu eksperimenta dok u P-limit mediju u 11-om danu.



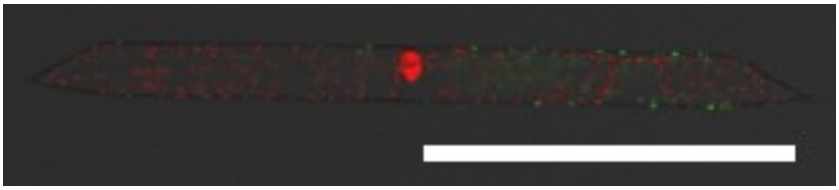
Slika 10. Krivulja rasta *Pseudosolenia calcaravis* u f/2 i P-limit mediju kroz 12 dana eksperimenta

U P-limit mediju došlo je do aktivacije alkalne fosfataze (Slika 11.). Specifična aktivnost rasla je do posljednjeg dana eksperimenta.



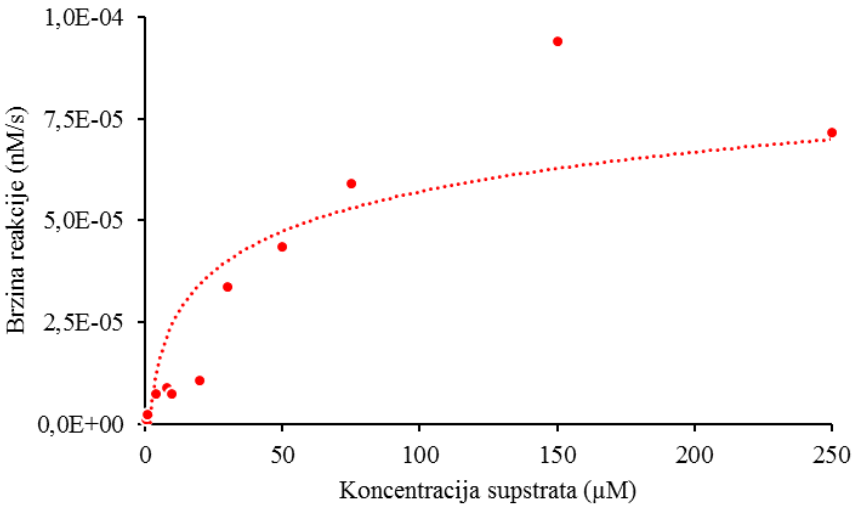
Slika 11. Porast specifične aktivnosti alkalne fosfataze *Pseudosolenia calcaravis* u P-limit mediju kroz 12 dana eksperimenta

U ovom eksperimentu na epifluorescentnom mikroskopu lokalizirana je alkalna fosfataza na površini stanice (Slika 12.). Zeleni signal na površini stanice označava aktivnost alkalne fosfataze.



Slika 12. Lokalizacija alkalne fosfataze na površini stanice *Pseudosolenia calcaravis* (skala 50 μm)

Za bolje opisivanje svojstava enzima, izmjerena je aktivnost pri različitim koncentracijama supstrata (Slika 13.). Pomoću Michaelis-Menten-ovog modela enzimski katalizirane reakcije određena je Michaelis-Menten-ova konstanta (Km) i maksimalna brzina reakcije (Vm) za određenu abundanciju stanica (1.68×10^5 stanica/L). Vrijednosti kinetičkih parametara prikazane su u tablici 12.



Slika 13. Michaelis-Mentenova krivulja alkalne fosfataze kod vrste *Pseudosolenia calcaravis* u P-limit mediju

Tablica 12. Kinetički parametri alkalne fosfataze kod vrste *P. calcaravis* u P-limit mediju

Michaelis-Mentenova konstanta (Km)	133.800 µM
Maksimalna brzina reakcije (Vm)	7.504×10^{-6} µM/s

Analizom fosfata u f/2 mediju na početku i na kraju eksperimenta (Tablica 13.) utvrđeno je da su stanice *P. calcaravis* potrošile 19.64 µM fosfata dok je u P-limit mediju koncentracija bila ispod granice detekcije. U f/2 stanice su dnevno trošile 1.964 µM fosfata.

Tablica 13. Koncentracije fosfata u f/2 i P-limit mediju na početku i na kraju 12-o dnevnog eksperimenta s vrstom *P. calcaravis*

Koncentracija PO_4 (µM/L)	**Početak eksperimenta**	**Kraj eksperimenta**
f/2	45.54	25.90
P-limit	<0.05	<0.05

Analiza pojedinih skupina lipida pokazala je da je došlo do promjena u sastavu lipida ovisno o dostupnosti fosfata (Tablica 14.). Osnovne značajne promjene u sastavu lipida (podebljane brojke) u ovom eksperimentu bile su veći udio glikolipida (monogalaktozildiglicerola, digalaktozildiglicerola i sulfoquinovosildiacilglicerol) u P-limit mediju. Postotak fosfolipida bio je jednak u f/2 i P-limit mediju

Tablica 14. Postotak lipidnih klasa i indikatora razgradnje u f/2 i P-limit mediju na kraju eksperimenta s vrstom *P. calcaravis*

Medij	**Indikator razgradnje (%)**	**Trigliceridi (%)**	**Glikolipidi (%)**	**Fosfolipidi (%)**
f/2	6	26	22	32
P-limit	8	17	**27**	**32**

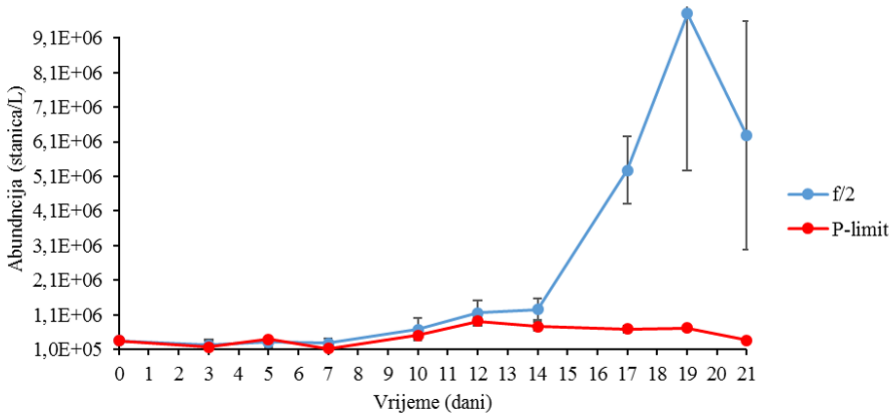
4.4 Fiziološki odgovor vrste *Paralia sulcata* (Ehrenberg) Cleve

Slika 14. prikazuje lanac stanica *P. sulcata* CIM 865 slikan na svjetlosnom mikroskopu. Taksonomska pripadnost potvrđena je sekvenciranjem 18S i 28S molekularnih markera. *P. sulcata* pripada u dijatomeje s radijalnom simetrijom, centrične dijatomeje. Stanice su međusobno povezane u duge trajne lance. Prisutne su u bentosu i pelagijalu. Veličina stanica od 18-20 µm.



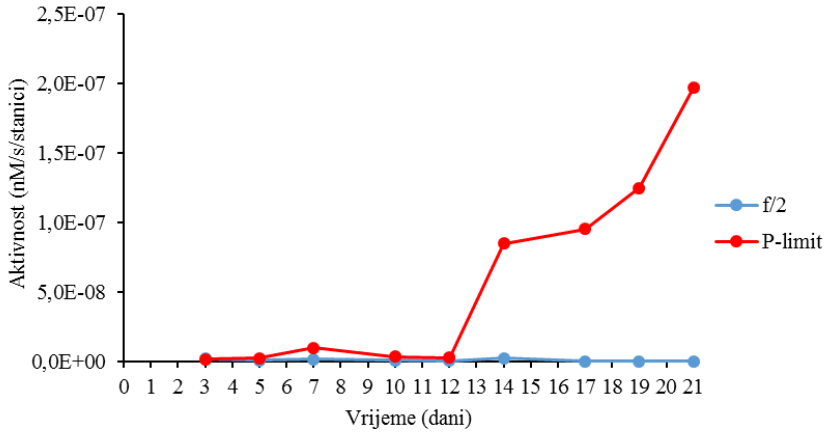
Slika 14. Lanac stanica *Paralia sulcata* CIM 860 (skala 50 µm, kontrast Nomarski)

Krivulja rasta (Slika 15.) prikazuje porast abundancije stanica *P. sulcata* CIM 865 u 21-o dnevnom eksperimentu. U f/2 mediju stanice su rasle od 3.47×10^5 do 6.28×10^6 stanica/L dok u P-limit mediju od 3.47×10^5 do 3.63×10^5 stanica/L. Stanice su ušle u stacionarnu fazu u f/2 mediju u 19-om danu eksperimenta dok u P-limit u 11-om danu. Generacijsko vrijeme stanica u f/2 mediju bilo je 0.608 dok u P-limit mediju 0.23 dana. U f/2 mediju najbrže generacijsko vrijeme bilo je u 17-om danu dok u P-limit mediju u desetom danu eksperimenta.



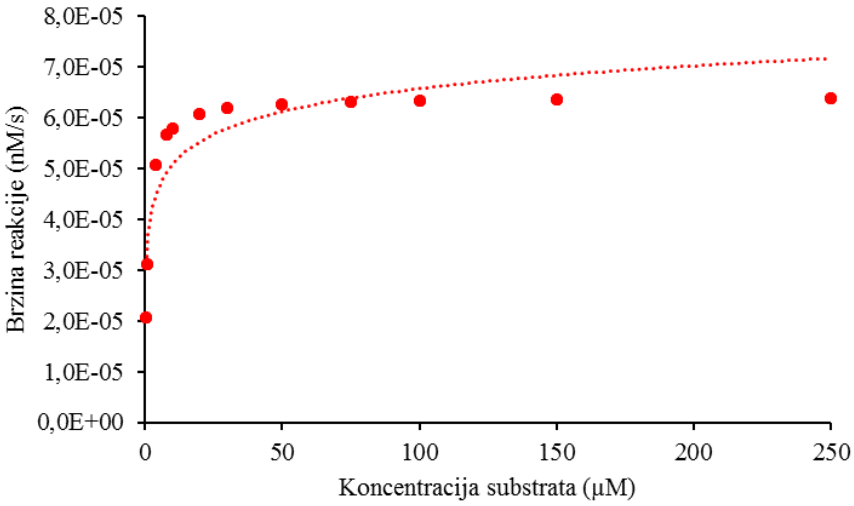
Slika 15. Krivulja rasta *Paralia sulcata* u f/2 i P-limit mediju kroz 21 dan eksperimenta

U P-limit mediju u 14-om danu eksperimenta došlo je do aktivacije alkalne fosfataze (Slika 16.). Maksimum specifične aktivnosti bio je u posljednjem danu eksperimenta.



Slika 16. Porast specifične aktivnosti alkalne fosfataze *Paralia sulcata* u P-limit mediju kroz 21 dan eksperimenta

Za bolje opisivanje svojstava enzima, izmjerena je aktivnost pri različitim koncentracijama supstrata (Slika 17.). Pomoću Michaelis-Menten-ovog modela enzimski katalizirane reakcije određena je Michaelis-Menten-ova konstanta (Km) i maksimalna brzina reakcije (Vm) za određenu abundanciju stanica (3.63×10^5stanica/L). Vrijednosti kinetičkih parametara prikazane su u Tablici 15.



Slika 17. Michaelis-Mentenova krivulja alkalne fosfataze vrste *Paralia sulcata* u P-limit mediju

Tablica 15. Kinetički parametri alkalne fosfataze kod vrste *P. sulcata* u P-limit mediju

Michaelis-Mentenova konstanta (Km)	0.7147 μM
Maksimalna brzina reakcije (Vm)	2.91×10^{-5} μM/s

Analizom fosfata u f/2 mediju na početku i na kraju eksperimenta (Tablica 16.) utvrdilo se da su *P. sulcata* stanice potrošile 19.64 μM fosfata dok je u P-limit mediju koncentracija bila ispod granice detekcije. U f/2 mediju stanice su dnevno koristile 1.03 μM fosfata.

Tablica 16. Koncentracije fosfata u f/2 i P-limit mediju na početku i na kraju 21-o dnevnog eksperimenta s vrstom *P. sulcata*

Koncentracija PO_4 (μM/L)	**Početak eksperimenta**	**Kraj eksperimenta**
f/2	56.06	45.80
P-limit	<0.05	<0.05

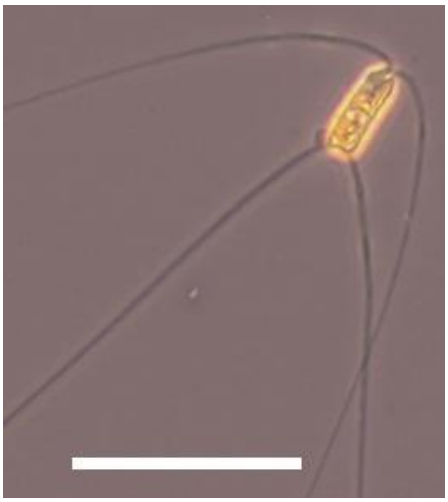
Kod vrste *P. sulcata* došlo je do promjena u sastavu lipida ovisno o dostupnosti fosfata (Tablica 17.). Osnovne značajne promjene u sastavu lipida (podebljane brojke) u ovom eksperimentu bile su veći udio triglicerida i glikolipida i manji udio fosfolipida u P-limit mediju.

Tablica 17. Postotak lipidnih klasa i indikatora razgradnje u f/2 i P-limit mediju na kraju eksperimenta s vrstom *P. sulcata*

Medij	**Indikator razgradnje (%)**	**Trigliceridi (%)**	**Glikolipidi (%)**	**Fosfolipidi (%)**
f/2	23	22	15	30
P-limit	8	**35**	**17**	**15**

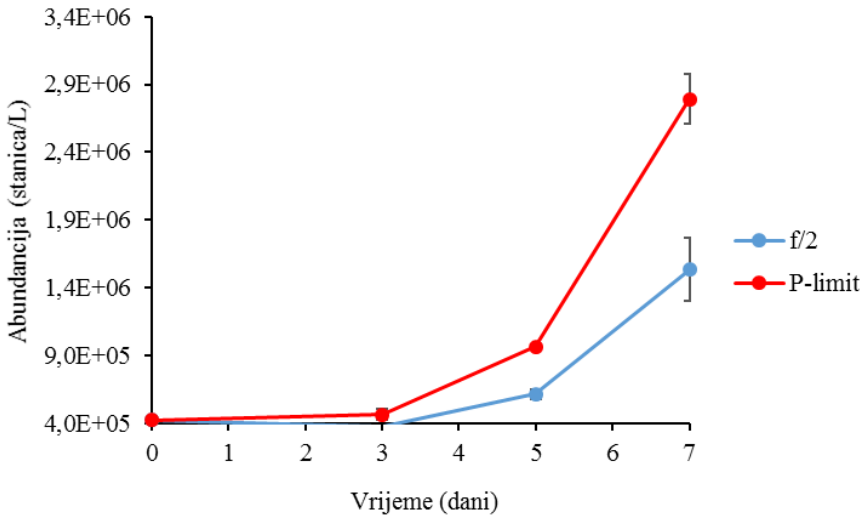
4.5 Fiziološki odgovor vrste *Chaetoceros peruvianus* Brightwell

Slika 18. prikazuje stanicu *C. peruvianus* CIM 863 slikanu na svjetlosnom mikroskopu. Taksonomska pripadnost potvrđena je sekvenciranjem rbcL molekularnog markera. Stanice vrste *C. peruvianus* su radijalno simetrične, veličine stanica su od 10 do 32 µm u promjeru. Ne tvori lance i živi u planktonu.



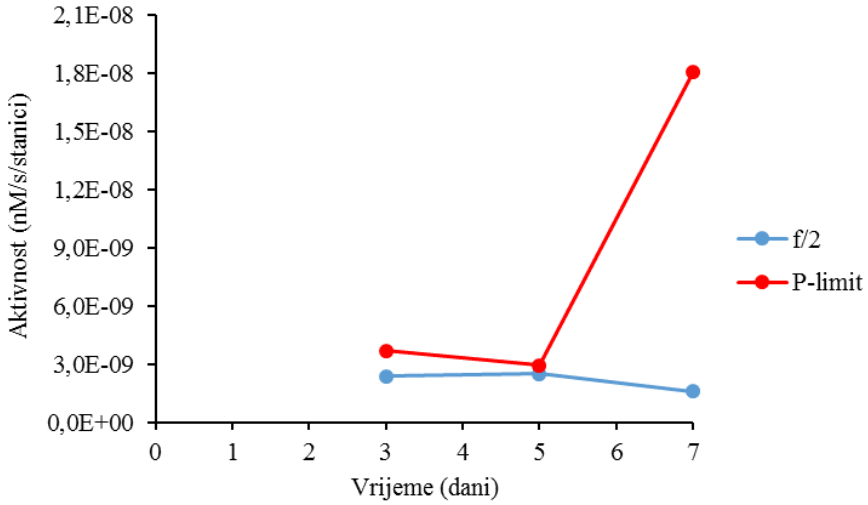
Slika 18. Stanica *Chaetoceros peruvianus* CIM 863 na svjetlosnom mikroskopu (skala 50 µm)

Krivulja rasta (Slika 19.) prikazuje porast abundancije stanica *C. peruvianus* CIM 863 u sedmodnevnom eksperimentu. U f/2 mediju stanice su rasle od 4.27×10^5 do 1.54×10^6 stanica/L dok u P-limit mediju od 4.27×10^5 do 2.79×10^6 stanica/L. U sedam dana, stanice su bolje rasle u P-limit mediju i nisu ušle u stacionarnu fazu. Generacijsko vrijeme stanica u f/2 mediju bilo je 0.254 dok u P-limit mediju 0.115 dana. U f/2 mediju najbrže generacijsko vrijeme bilo je u petom danu a u P-limit mediju u drugom danu eksperimenta.



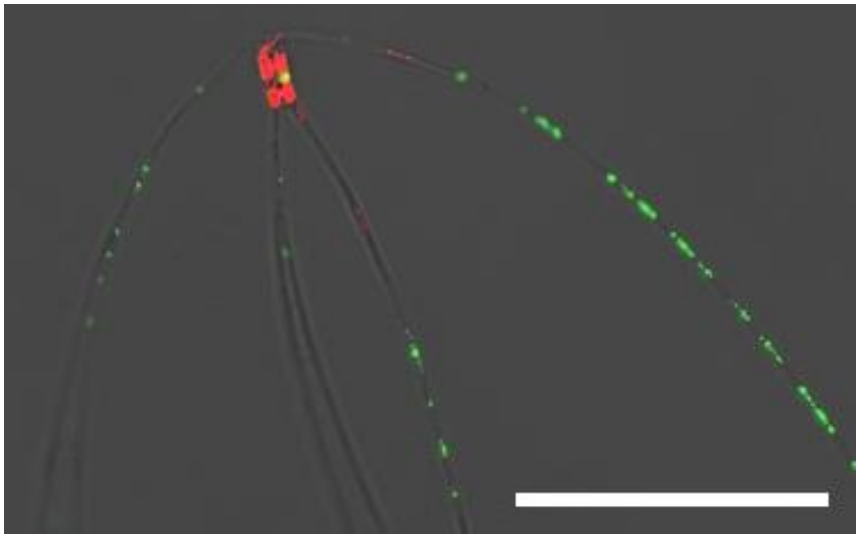
Slika 19. Krivulja rasta *Chaetoceros peruvianus* u f/2 i P-limit mediju kroz sedam dana eksperimenta

U P-limit mediju došlo je do aktivacije alkalne fosfataze, najveća specifična aktivnost bila je u posljednjem danu eksperimenta (Slika 20.).



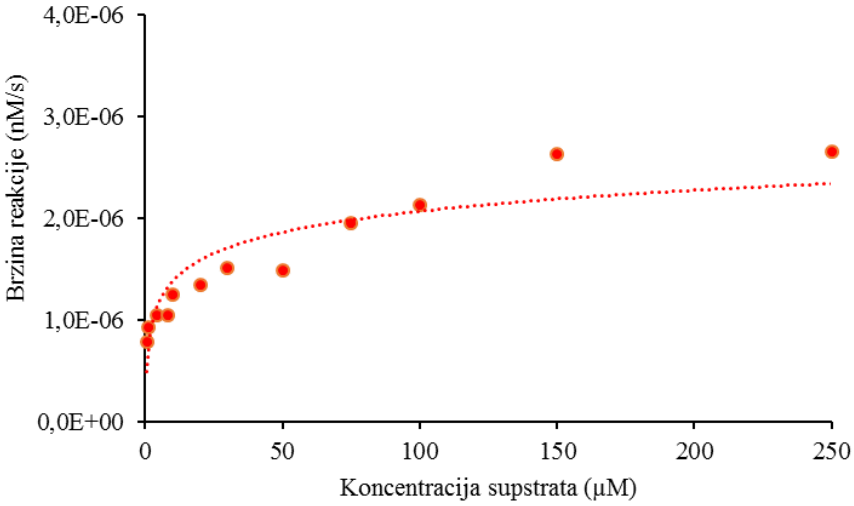
Slika 20. Porast specifične aktivnosti alkalne fosfataze *Chaetoceros peruvianus* u P-limit mediju kroz sedam dana eksperimenta

U ovom eksperimentu na epifluorescentnom mikroskopu lokalizirana je alkalna fosfataza na površini stanice (Slika 21.). Zeleni signal na površini stanice označava aktivnost alkalne fosfataze.



Slika 21. Lokalizacija alkalne fosfataze na površini stanice *Chaetoceros peruvianus* (skala 50 µm)

Za bolje opisivanje svojstava enzima, izmjerena je aktivnost pri različitim koncentracijama supstrata (Slika 22.). Pomoću Michaelis-Menten-ovog modela enzimski katalizirane reakcije određena je Michaelis-Menten-ova konstanta (Km) i maksimalna brzina reakcije (Vm) za određenu abundanciju stanica (2.79×10^6 stanica/L). Vrijednosti kinetičkih parametara prikazane su u tablici 18.



Slika 22. Michaelis-Mentenova krivulja alkalne fosfataze vrste *Chaetoceros* peruvianus u P-limit mediju

Tablica 18. Kinetički parametri alkalne fosfataze kod vrste *C. peruvianus* u P-limit mediju

Michaelis-Mentenova konstanta (Km)	64.59 µM
Maksimalna brzina reakcije (Vm)	4.241×10^{-6} µM/s

Analizom fosfata u f/2 mediju na početku i na kraju eksperimenta utvrdilo se da su stanice *C. peruvianus* potrošile 4.18 µM fosfata. U P-limit mediju koncentracije su bile ispod granice detekcije na početku i na kraju eksperimenta (Tablica 19.). Stanice su dnevno trošile 0.836 µM fosfata.

Tablica 19. Koncentracije fosfata u f/2 i P-limit mediju na početku i na kraju sedmo dnevnog eksperimenta s vrstom *C. peruvianus*

Koncentracija PO_4 (µM/L)	**Početak eksperimenta**	**Kraj eksperimenta**
f/2	46.09	25.68
P-limit	<0.05	<0.05

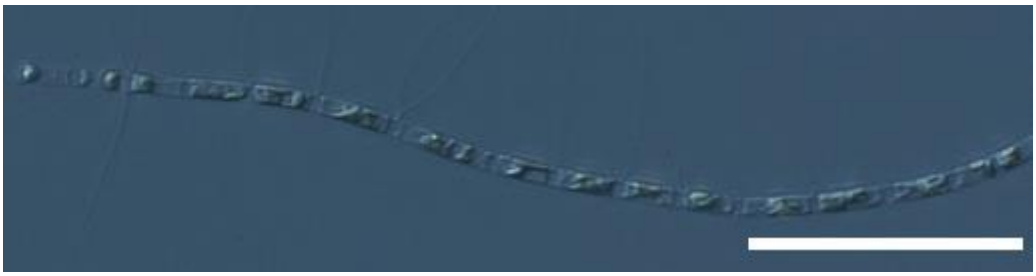
Analiza pojedinih skupina lipida pokazala je da je došlo do promjena u sastavu lipida ovisno o dostupnosti fosfata (Tablica 20.). Osnovne značajne promjene u sastavu lipida u ovom eksperimentu bile su veći udio fosfolipida u P-limit mediju.

Tablica 20. Postotak lipidnih klasa i indikatora razgradnje u f/2 i P-limit mediju na kraju eksperimenta s vrstom *C. peruvianus*

Medij	**Indikator razgradnje (%)**	**Trigliceridi (%)**	**Glikolipidi (%)**	**Fosfolipidi (%)**
f/2	11	25	20	33
P-limit	8	19	20	**42**

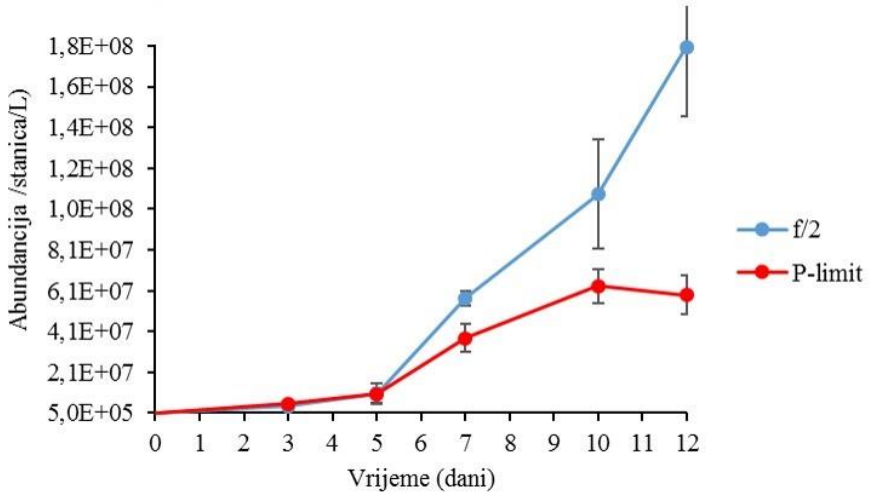
4.6 Fiziološki odgovor *Chaetoceros contortus* F. Schutt

Slika 23. prikazuje lanac stanica vrste *C. contortus* CIM 864 slikanu na svjetlosnom mikroskopu. Taksonomska pripadnost potvrđena je sekvenciranjem 18S i 28S genskih markera. *C. contortus* pripada radijalno simetričnim dijatomejama koje tvore jako duge lance. Stanice su u promjeru od 5-40 µm.



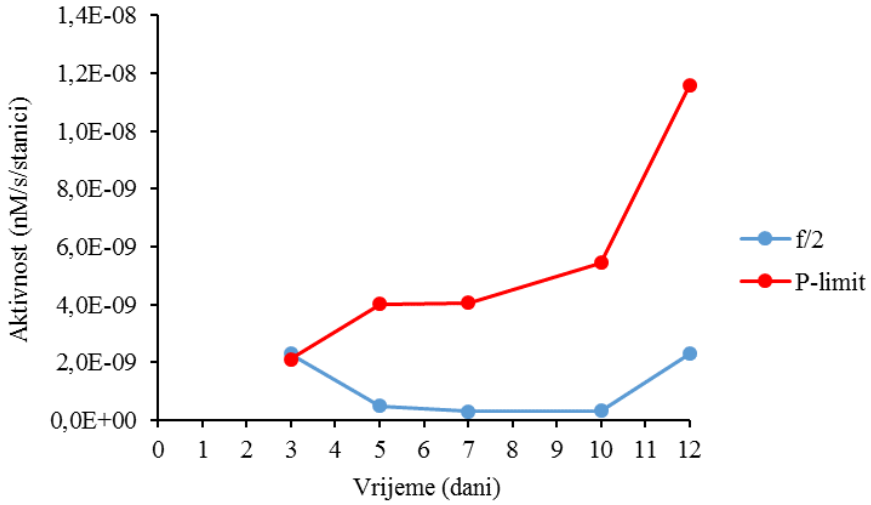
Slika 23. Stanica *Chaetoceros contortus* CIM 864 na svjetlosnom mikroskopu (skala 50 µm, kontrast Nomarski)

Krivulja rasta (Slika 24.) prikazuje porast abundancije stanica vrste *C. contortus* CIM 864 u 12-o dnevnom eksperimentu. U f/2 mediju stanice su rasle od 4.59×10^5 do 1.80×10^8 stanica/L dok je u P-limit mediju abundancija stanica porasla sa 4.59×10^5 do 5.84×10^7 stanica/L. U P-limit mediju stanice su ušle u stacionarnu fazu u 10-om danu eksperimenta. Generacijsko vrijeme stanica u f/2 mediju bilo je 2.71 dok je u P-limit mediju bilo 0.734 dana. U f/2 i P-limit mediju najbrže generacijsko vrijeme bilo je u šestom danu eksperimenta.



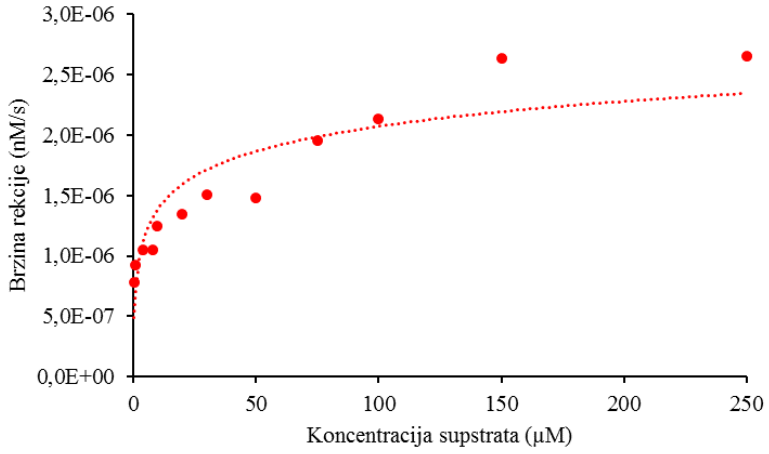
Slika 24. Krivulja rasta *Chaetoceros contortus* u f/2 i P-limit mediju kroz 12 dana eksperimenta

U P-limit mediju došlo je do aktivacije alkalne fosfataze, maksimum specifične aktivnosti postignut je u posljednjem danu eksperimenta (Slika 25.).



Slika 25. Porast specifične aktivnosti alkalne fosfataze vrste *Chaetoceros contortus* u P-limit mediju kroz 12 dana eksperimenta

Za bolje opisivanje svojstava enzima, izmjerena je aktivnost pri različitim koncentracijama supstrata (Slika 26.). Pomoću Michaelis-Menten-ovog modela enzimski katalizirane reakcije određena je Michaelis-Menten-ova konstanta (Km) i maksimalna brzina reakcije (Vm) za određenu abundanciju stanica (5.84×10^7 stanica/L). Vrijednosti kinetičkih parametara prikazane su u Tablici 21.



Slika 26. Michaelis-Mentenova krivulja alkalne fosfataze vrste *Chaetoceros contortus* u P-limit mediju

Tablica 21. Kinetički parametri alkalne fosfataze kod vrste *C. contortus* u P-limit mediju

Michaelis-Mentenova konstanta (Km)	3.489 μM
Maksimalna brzina reakcije (Vm)	1.054×10^{-6} μM/s

Analizom fosfata u f/2 mediju na početku i na kraju eksperimenta (Tablica 22.) utvrđeno je da su stanice vrste *C. contortus* potrošile 10.6 μM fosfata dok je u P-limit mediju koncentracija bila ispod granice detekcije. Stanice su dnevno trošile 1.06 μM fosfata.

Tablica 22. Koncentracije fosfata u f/2 i P-limit mediju na početku i na kraju 12-o dnevnog eksperimenta s vrstom *C. contortus*

Koncentracija PO_4 (μM/L)	**Početak eksperimenta**	**Kraj eksperimenta**
f/2	57.57	47.51
P-limit	<0.05	<0.05

Analiza pojedinih skupina lipida pokazala je da je došlo do promjena u sastavu lipida ovisno o dostupnosti fosfata (Tablica 23.). Osnovne značajne promjene u sastavu lipida (podebljane brojke) u ovom eksperimentu bile su niži postotak fosfolipida u P-limit mediju.

Tablica 23. Postotak lipidnih klasa i indikatora razgradnje u f/2 i P-limit mediju

Medij	**Indikator razgradnje (%)**	**Trigliceridi (%)**	**Glikolipidi (%)**	**Fosfolipidi (%)**
f/2	12	28	23	25
P-limit	12	25	22	**24**

4.7 Sažeti prikaz rezultata za istraživane dijatomeje

U tablici 24. prikazani su rezultati istraživanja za pojedine vrste

Tablica 24. Sažeti prikaz rezultata istraživanih vrsta

	Ime vrste	*P. elongatum*	*T. rotula*	*P. calcaravis*	*P. sulcata*	*C. peruvianus*	*C. contortus*
f/2 medij	Abundancija na početku eksperimenta (stanica/L)	4.94×10^{4}	7.33×10^{3}	1.08×10^{4}	3.47×10^{5}	4.27×10^{5}	4.59×10^{5}
	Abundancija na kraju eksperimenta (stanica/L)	2.91×10^{6}	1.62×10^{7}	4.17×10^{5}	6.28×10^{6}	1.54×10^{6}	1.80×10^{8}
	Generacijsko vrijeme (dan)	1.24	1.83	0.341	0.608	0.254	2.71
	Maksimalno generacijsko vrijeme (dan)	11	12	9	17	5	6
	Unos fosfata (μM)	0.61	0.673	1.964	1.03	0.836	1.06
	Indikator razgradnje (%)	20	26	6	23	11	12
	Trigliceridi (%)	16	9	26	22	25	28
	Glikolipidi (%)	17	21	22	15	20	23
	Fosfolipidi (%)	19	21	32	30	33	25
P-limit medij	Abundancija na početku eksperimenta (stanica/L)	3.94×10^{4}	7.33×10^{3}	1.08×10^{4}	3.47×10^{5}	4.27×10^{5}	4.59×10^{5}
	Abundancija na kraju eksperimenta (stanica/L)	2.89×10^{5}	7.14×10^{6}	1.68×10^{5}	3.63×10^{5}	2.79×10^{6}	5.84×10^{7}
	Generacijsko vrijeme (dan)	0.43	0.84	0.382	0.23	0.115	2.71
	Maksimalno generacijsko vrijeme (dan)	7	5	11	10	2	6
	Unos fosfata (μM)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	Specifična aktivnost (nM/s/stanici)	$2{,}38\times10^{-7}$	$3{,}09\times10^{-8}$	$4{,}07\times10^{-7}$	$1{,}97\times10^{-7}$	$1{,}81\times10^{-8}$	$1{,}16\times10^{-8}$
	Michaelis-Mentenova konstanta (μM)	8.464	15.07	133.80	0.7147	64.59	3.489
	Indikator razgradnje (%)	28	21	8	8	8	12
	Trigliceridi (%)	27	33	17	35	19	25
	Glikolipidi (%)	15	18	27	17	20	22
	Fosfolipidi (%)	21	18	32	15	42	24

5 RASPRAVA

U ovom rad korišteno je 6 različitih vrsta morskih dijatomeja koje redovito nalazimo u fitoplanktonskoj zajednici sjevernog Jadrana (SJ). Dvije vrste žive pojedinačno (*P. elongatum* i *C. peruvianus*) dok ostale četiri tvore kolonije. Osim vrsta *C. contortus* i *T. rotula* ostale vrste obično ne dostižu visoku brojnost i slabi su kompetitori u fitoplanktonskoj zajednici SJ. Željeli smo istražiti kako će se ove vrste ponašati i kakav će biti njihov fiziološki odgovor u suvišku fosfora, te u uvjetima ograničene koncentracije fosfora. Dvije (*P. elongatum* i *P. sulcata*) od 6 vrsta također obično žive u pridnenom sloju, a u vodenom stupcu ih srećemo nakon miješanja (Marić Pfannkuchen usmeno priopćenje, Pfannkuchen i sur. u pripremi). U ovom radu potvrđeno je da dostupnost fosfora u mediju za uzgoj dijatomeja utječe na rast i fiziologiju stanica. Dostupnost fosfata u f/2 mediju omogućila je stanicama da vrše metaboličke aktivnosti, i koriste fosfate u fiziološkim procesima rasta i razvoja. To je u skladu s literaturnim navodom da je fosfor ključan makronutrijent u replikaciji DNA, sintezi ATP-a i fosfolipida (Paytan i McLaughlin 2007). Međutim u mediju s ograničenom koncentracijom fosfata (P-limit) koncentracije su bile ispod granice detekcije što je induciralo promjene u generacijskom vremenu i fazama rasta dijatomeja, aktivaciju alkalne fosfataze i promjene u sastavu lipida. Fiziološki odgovori fitoplanktona na ograničene koncentracije fosfora kao što su aktivacija alkalne fosfataze i zamjene fosfolipida za glikolipide u staničnim membranama opisani su od strane raznih autora (Van Mooy i sur. 2006, Dyhrman i Ruttenberg 2006, Ivančić i sur. 2012, Gašparović i sur. 2013, Ivančić i sur. 2016).

Fiziološki odgovor vrste *P. elongatum* na ograničene koncentracije fosfata

U eksperimentalnim uvjetima stanice *P. elongatum* dostigle su visoku abundanciju (2.91×10^6 stanica/L) u f/2 mediju. U P-limit mediju abundancija stanica bila je niža (2.89×10^5 stanica/L) što znači da su stanice bolje rasle u suvišku fosfata. U nedostatku fosfora stanice *P. elongatum* imale su kraće generacijsko vrijeme (u f/2 mediju bilo je 1.24 dok u P-limit mediju 0.43 dana). Također, u nedostatku fosfata stanice su postigle maksimum dijeljenja u sedmom danu eksperimenta, dok u f/2 mediju u 11-om danu. Ubrzano dijeljenje stanica u stresnim uvjetima može biti strategija kojom stanice žele održati vrstu, međutim u nedostatku fosfata pretpostavljamo da stanice ulaze ranije u stacionarnu fazu. Ulazak stanica u stacionarnu fazu i na koncu odumiranje znači da je došlo do ograničenja rasta i razvoja stanica kao posljedica nedostatka fosfata. Niske koncentracije fosfata u P-limit mediju inducirale su aktivaciju alkalne fosfataze. Pretpostavljamo da je alkalna fosfataza omogućila stanicama da koriste organsku tvar kao izvor fosfora. Vrijednosti Michaelis-Mentenovog modela (8.464 μM) pokazuje da

enzim ima dobar afinitet prema organskom supstratu (Labry i sur. 2005). Budući da se radi o bentičkoj vrsti, mala je vjerojatnost da će dominirati u planktonskoj zajednici. Međutim zanimljivo je da aktivira alkalnu fosfatazu i ima dobar afinitet za organskim supstratom što može značiti da u uvjetima niskih koncentracija fosfata ova vrsta ima razvijenu strategiju kojom će koristiti organsku tvar kao izvore fosfora. Povećani postotak indikatora razgradnje u P-limit mediju je posljedica razgradnih procesa u mrtvim stanicama (Gurr i sur. 2002). Povećani udio triglicerida govori nam da su stanice u nedostatku fosfata pod stresom i da čekaju povoljnije uvjete za rast i razvoj (Thompson 1996).

Fiziološki odgovor vrste *T. rotula* na ograničene koncentracija fosfata

U 12 dana eksperimenta stanice *T. rotula* dostigle su visoku abundanciju u f/2 mediju (1.62×10^7 stanica/L) uslijed dostupnosti fosfata. U P-limit mediju abundancija stanica *T. rotula* bila je niža (7.14×10^6 stanica/L) i dostigle su u stacionarnu fazu tijekom eksperimenta. To može biti posljedica nedostatka fosfata u P-limit mediju koji je limitirao daljnji rast stanica. Nedostatak fosfata uzrokovao je brže generacijsko vrijeme (u f/2 mediju bilo je 1,83 dok u P-limit mediju 0,84 dana). Također maksimum dijeljenja stanica postignut je prije u P-limit mediju (u petom danu eksperimenta) dok u f/2 mediju tek u 12-om danu. Pretpostavljamo da ograničene koncentracije fosfata induciraju brže dijeljenje stanica kao odgovor na stresne uvjete rasta. Odgovor na stres brzim dijeljenjem, moguće je da *T. rotula* održava svoju brojnost u zajednici, međutim zbog nedostatka fosfata brzo dostižu maksimum dijeljenja. U P-limit mediju zbog nedostatka fosfata, stanice su aktivirale alkalnu fosfatazu te je maksimum aktivnosti postignut je u desetom danu eksperimenta dok u je posljednjem danu eksperimenta zabilježen pad aktivnosti. Poznato je da enzimska hidroliza organskih spojeva zahtijeva utrošak energije (Cembella i sur. 1984), te je moguće da u stacionarnoj fazi stanice nisu imale energije za daljnje dijeljenje i korištenje organskog fosfora putem alkalne fosfataze pa je ukupna specifična aktivnost po stanici pala. Vrijednost Michaelis Menten konstante ukazuje da alkalna fosfataza koju aktivira *T. rotula* ima loši afinitet prema supstratu. Loš afinitet enzima prema supstratu objašnjava činjenica da je *T. rotula* prisutna u zimi-rano proljeće kada je vodeni stupac dobro izmiješan i dostupne su sve hranjive soli (Godrijan i sur. 2013). *T. rotula* za svoj rast zahtijeva visoke koncentracije fosfata (Lunven i sur. 2005), međutim od svih planktonskih dijatomeja istraživanih u ovom radu ima najlošiju stopu unosa fosfata u uvjetima suviška fosfata. Lunven i sur. (2005) pronašli su da proljetni cvat *T. rotula* dovodi do potrošnje hranjivih soli u površinskom sloju, nakon čega tonu i više nisu detektirane u vodenom stupcu. Analiza lipida kod ove vrste pokazala je da u P-limit mediju dolazi do povećanja postotka triglicerida. Porast

triglicerida je indikator da se stanice nalaze u stresnim uvjetima (Thompson 1996). Stanice skladište trigliceride u neograničenim količinama i mogu ih koristiti kao izvore energije kada se uvjeti poboljšaju. Također niži postotak fosfolipida u P-limit mediju ukazuje na indukciju mehanizma recikliranja fosfora iz fosfolipidnih membrana (Van Mooy i sur. 2009). Za ovu vrstu može se reći da nije jako kompetitivna u uvjetima ograničene koncentracije fosfata, ali je razvila strategiju kojom može održavati aktivni metabolizam.

Fiziološki odgovor vrste *P. calcaravis* na ograničene koncentracije fosfata

Stanice vrste *P. calcaravis* u 12-o dnevnom eksperimenta eksponencijalnim rastom dostigle su abundanciju do 4.17×10^5 stanica/L u f/2 mediju i 1.68×10^5 stanica/L u P-limit mediju. U ovom eksperimentu izostala je stacionarna faza. Nedostatak fosfata uzrokovao je da se generacijsko vrijeme u P-limit mediju povećalo (0,382). U f/2 mediju stanice su dostigle najbrže dijeljenje u devetom danu eksperimenta dok u P-limit mediju tek u 11-om danu. To je jedina vrsta koja je u P-limitiranom mediju rasla sporije nego u f/2 mediju. Ovakav rezultat ukazuje da ova vrsta slabije reagira na stresne uvjete. Radi se o velikoj vrsti koja sporo raste, prisutna je u zimskom periodu (maksimum u veljači) kada ekosustav nije ograničen fosfatima (Aubry i sur. 2012, Godrijan i sur. 2013). Među svim planktonskim dijatomejama koje su istražene u ovom radu, *C. calcaravis* ima najveću stopu unosa fosfata. Velika sposobnost kompeticije za hranjivim solima, mala brzina rasta i veličina stanica potvrđuje da je *C. calcaravis* K-vrsta. U ovom eksperimentu u P-limit mediju stanice *P. calcaravis* aktivirale su alkalnu fosfatazu, međutim u ovom slučaju enzimska aktivnost lokalizirana je na površini stanice pomoću fosfomonoesterskog supstrata (ELF-97). Taj supstrat je prethodno korišten kao kvalitativna metoda za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze u uvjetima ograničene koncentracije fosfora (Dyhrman i Palenik 1999). Ivančić i sur. (2016) dokumentirali su da u prirodnim uzorcima *P. calcaravis* daje pozitivan odgovor na ELF supstrat u uvjetima ograničene koncentracije fosfora, dok je u ovom radom pronađeno da se vrsta *P. calcaravis* u eksperimentalnim uvjetima ponaša isto kao „*in situ*“.. Niski afinitet enzima prema organskom supstratu govori nam da ta vrsta nije kompetitivna u uvjetima ograničene koncentracije fosfora. Povećani udio glikolipida moguća je posljedica korištenja fosfora iz fosfolipidnih staničnim membrana i korištene u metaboličkim putevima (npr. fotosinteza) (Van Mooy i sur. 2009). Zanimljivo je da je postotak fosfolipida jednak u f/2 mediju i P-limit mediju. To je moguće povezati sa činjenicom da stanice fitoplanktona u uvjetima visokih koncentracija fosfata mogu skladištiti fosfor u neograničenim količinama u obliku polifosfata (Rhee 1973). Isto tako moguće je da mobilizacija polifosfata

može omogućiti rast i održavanje metaboličke aktivnosti stanica *P. calcaravis* kada su vrijednosti fosfata u okolišu niske.

Fiziološki odgovor *P. sulcata* na ograničene koncentracije fosfata

Eksperiment s vrstom *P. sulcata* trajao je 21 dan. U uvjetima suviška fosfora stanice su dostigle maksimalnu abundanciju u 19-om danu (9.80×10^7 stanica/L), a u posljednjem danu eksperimenta abundancija je pala (6.28×10^6 stanica/L). Ulazak stanica u stacionarnu fazu i odumiranje stanica moguće je povezati sa starenjem kulture. U P-limit mediju stanice nisu značajno rasle, maksimalna abundancija bila je 9.12×10^5 stanica/L. Manje generacijsko vrijeme u P-limit mediju (0.23 dana) i maksimalni doseg dijeljenja u desetom danu posljedica je reakcije stanica na stres uzrokovan niskom koncentracijom fosfata. Zanimljivo je da su stanice u P-limit mediju maksimum dijeljenja postigle u desetom danu, nakon čega u 14-om danu aktiviraju alkalnu fosfatazu. Do aktivacije alkalne fosfataze u ovom eksperimentu došlo je kasnije nego u ostalim istraživanim vrstama, što ukazuje na spor enzimski odgovor na niske koncentracije fosfata. Međutim zanimljiva je činjenica da upravo *P. sulcata* ima najbolji afinitet enzima prema organskom supstratu. Dobar afinitet prema organskom supstratu omogućuje ovoj vrsti da koristi organsku tvar kao izvore fosfora ako se nađe u uvjetima niske koncentracije fosfata. *P. sulcata* je bentička vrsta koja koju je moguće naći u pelagijalu nakon vertikalnog miješanja vodenog stupca u jesen i pozitivno korelira s koncentracijom hranjivih soli (Godrijan i sur. 2013). To može objasniti zašto su stanice bolje rasle u suvišku fosfora, ali isto tako da ova vrsta može biti poveznica između bentosa i pelagijala i doprinositi u remineralizaciji organske tvari. Porast postotka triglicerida ukazuje da su stanice u P-limit mediju u stresnim uvjetima, i da skladištenjem energetskih rezervi očekuju bolje uvjete. Porast udjela glikolipida i pad udjela fosfolipida u P-limit mediju ukazuje na to da je došlo do remodeliranja stanične membrane i korištenje fosfora za važnije fiziološke potrebe kao što je replikacija DNA (Van Mooy i sur. 2009).

Fiziološki odgovor *C. peruvianus* na ograničene koncentracije fosfata

U sedmodnevnom eksperimentu stanice *C. peruvianus* dostigle su veću abundanciju u P-limit mediju (2.79×10^6 stanica/L dok je u f/2 mediju bila 1.54×10^6 stanica/L). To može značiti da je ova vrsta dobro prilagođena na ograničene koncentracije fosfata u ekosustavu. Manje generacijsko vrijeme (0.115) u P-limit mediju pokazuje da su se stanice brže dijelile nego u f/2 mediju. Isto tako stanice su imale brz odgovor postizanjem maksimalne brzine dijeljenja u drugom danu ali nisu ušle u stacionarnu fazu. U P-limit mediju stanice su aktivirale alkalnu

fosfatazu koje je u ovom eksperimentu lokalizirana pomoću fosfomonoesterskog supstrata (ELF-97) na setama. Zanimljivo je da unatoč tome što je korištenje organskih oblika fosfora energetski jako zahtijevan proces, stanice vrste *C. peruvianus* su bolje rasle u P-limit mediju isto kao i da taj enzim kod *C. peruvianus* ima loši afinitet prema organskom supstratu. *C. peruvianus* je termofilna dijatomeja, prevladava u ljeti (Gomez i sur. 2007). Moguće je da u ljetnom periodu kada su niske koncentracije fosfata u okolišu *C. peruvianus* je razvio morfološku prilagodbu kojom produžuje sete na kojima se nalazi alkalna fosfataza. Veća površina stanice omogućava mu da lakše kompenzira za organskom tvari iz koje alkalnom fosfatazom koristi fosfor. Zanimljivo je da u P-limit mediju postotak fosfolipida je veći nego u f/2 mediju. To je moguće objasniti da u stresnim uvjetima *C. peruvianus* može također mobilizirati unutar stanične zalihe fosfora kao što je prethodno pokazano i u slučaju kod vrste *P. calcaravis*.

Fiziološki odgovor vrste *C. contortus* na ograničene koncentracije fosfata

Kod vrste *C. contortus* eksperiment u trajanju od 12 dana pokazao je da su stanice bolje rasle u f/2 mediju, abundancija stanica na kraju eksperimenta bila je 2×10^8 stanica/L dok u P-limit mediju 6×10^7 stanica/L. Generacijsko vrijeme u f/2 mediju bilo je duže (2.71) nego u P-limit mediju (0.734). To opet pokazuje kako stanice reagiraju na nedostatak fosfata ubrzavanjem diobe. Najbrže vrijeme dostizanja generacijskog vremena u oba medija uzgoja bio je u šestom danu, što znači da ova vrsta sporije reagira na stresne uvjete. U ovom eksperimentu došlo je do aktivacije alkalne fosfataze, najveća specifična aktivnost bila je u stacionarnoj fazi. Ako usporedimo kinetičke parametre među svim planktonskim vrstama u ovom radu, najbolji afinitet enzima prema organskom supstratu ima *C. contortus*. To objašnjava njegovu sposobnost da postigne izrazito visoku brojnost „*in situ*“ u ljetnom periodu kada su u okolišu niske koncentracije fosfata (Aubry i sur. 2004). Smanjeni postotak fosfolipida pri niskim koncentracijama fosfata posljedica je indukcije mehanizma u kojem će stanice koristiti fosfor iz fosfolipida za važnije fiziološke potrebe kao što su replikacija DNA i fotosinteza (Van Mooy i sur. 2009).

6 ZAKLJUČAK

U ovom radu dokazano je da svih 6 vrsta istraživanih dijatomeja aktivira alkalnu fosfatazu u nedostatku fosfata. Neke vrste koje ne dostižu visoku brojnost poput *P. calcaravis* i *C. peruvianus* i koje ne dominiraju planktonskom zajednicom poput *P. elongatum* i *P. sulcata* u nedostatku fosfata aktiviraju alkalnu fosfatazu kako bi održale aktivni metabolizam. Iz kinetičkih parametara Michaelis-Mentenovog modela vidljivo je da je afinitet alkalne fosfataze prema organskom supstratu vrsno specifičan. *T. rotula i P. calcaravis* unatoč tome što aktiviraju alkalnu fosfatazu slabi su kompetitori u ograničenim koncentracijama fosfora, čemu je mogući razlog to što su prisutne zimi i/ili u ranom proljeću kada su dostupne hranjive soli. Visoki afinitet alkalne fosfataze prema organskom supstratu omogućava da *C. contortus* postigne visoku brojnost u ljetnom periodu kada koncentracije organskog fosfora nadmašuju koncentracije anorganskog fosfora. Bentičke vrste (*P. elongatum* i *P. sulcata*) unatoč tome što neće dominirati u planktonskoj zajednici imaju dobar afinitet prema organskom supstratu i mogu biti poveznica u kruženju fosfora između pridnenog sloja i pelagijala. Osim aktiviranja alkalne fosfataze uočene su i druge strategije kojima dijatomeje pokušavaju kompenzirati nedostatak fosfata. Tako *P. elongatum, T. rotula* i *P. sulcata* u nedostatku fosfata sintetiziraju trigliceride koje će koristiti kao energetske rezerve kada se uvjeti poboljšaju. Smanjenje staničnih potreba za fosforom zamjenom fosfolipida za glikolipide u staničnim membranama kod *P. sulcata, T. rotula* i *C. contortus* posljedica je indukcije mehanizma kojim se fosfor koristi za važnije fiziološke potrebe. Vrste *P. calcaravis* i *C. peruvianus* u uvjetima ograničene koncentracije fosfora pokazale su sposobnost mobilizacije unutarstaničnih zaliha fosfora. Također niske koncentracije fosfora mogu inducirati i fenotipsku (morfološku) varijaciju što je vidljivo na produživanju seta kod *C. peruvianus*. Praćenje fizioloških odgovora na niske koncentracije fosfata na razini vrste omogućava da predvidimo ponašanje i ekološku uspješnost te vrste. Ekološki uspjeh vezan je za vrstu a ne za rod, što je vidljivo iz različitog ponašanja vrsta unutar roda *Chaetoceros*. Zbog različitog ponašanja vrsta unutar istog roda buduća istraživanja kao i monitoring okoliša potrebno je provoditi na razini vrste. Shvaćanje fizioloških odgovora na razini vrste bitno je za razumijevanje funkcioniranja ekosustava i predviđanja odgovora ekosustava na klimatske promjene, antropogeni pritisak i acidifikaciju oceana.

7 LITERATURA

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research, 25(17)*, 3389-3402.

Amato, A., Kooistra, W. H. C. F., Levialdi Ghiron, J. H., Mann, D. G., Pröschold, T., & Montresor, M. (2007). Reproductive Isolation among Sympatric Cryptic Species in Marine Diatoms. *Protist*, *158*(2), 193–207.

Aubry, F.B, 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*(1), 97–115.

Aubry, F. B., Cossarini, G., Acri, F., Bastianini, M., Bianchi, F., Camatti, E., Pugnetti, A., & 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.

Bligh, E. & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification.. *Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–917.

Cembella, A. D., Antia, N. J., Harrison, P. J., & Rhee, G.Y. (1984). The Utilization of Inorganic and Organic Phosphorous Compounds as Nutrients by Eukaryotic Microalgae: A Multidisciplinary Perspective: Part 2. *Critical Reviews in Microbiology*, *11*(1), 13–81.

Cloern, J. E. (2001). Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine ecology progress series*. *210*, 223-253.

Cotner, J. B., & Biddanda, B. A. (2002). Small players, large role: Microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems*, *5*(2), 105–121.

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.

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

Degobbis, D., Gilmartin, M., & Revelante, N. (1986). An annotated nitrogen budget calculation for the northern Adriatic Sea. *Marine Chemistry*, *20*(2), 159–177.

Dyhrman, S. T., & Palenik, B. (1999). Phosphate stress in cultures and field populations of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphatase assay. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(7), 3205-3212.

Dyhrman, S. T., & Ruttenberg, K. C. (2006). Presence and regulation of alkaline phosphatase activity in eukaryotic phytoplankton from the coastal ocean: Implications for dissolved organic phosphorus remineralization. *Limnology and Oceanography*, *51*(3), 1381–1390.

Falkowski, P. (2012). Ocean Science: The power of plankton. *Nature*, *483*(7387), 17–20.

Falkowski, P. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research*, *39*(3), 235–258.

Gomez, F., & Souissi, S. (2007). Unusual diatoms linked to climatic events in the northeastern English Channel. *Journal of Sea Research*, *58*(4), 283–290.

Gašparović, B., Godrijan, J., Frka, S., Tomažić, I., Penezić, A., Marić, D., & Tepić, N. (2013). Adaptation of marine plankton to environmental stress by glycolipid accumulation. *Marine Environmental Research*, *92*, 120-132.

Gašparović, B., Kazazić, S. P., Cvitešić, A., Penezić, A., & Frka, S. (2015). Improved separation and analysis of glycolipids by Iatroscan thin-layer chromatography–flame ionization detection. *Journal of Chromatography*, *1409*, 259–267.

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.

Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* 29-60

Gurr, M. I., Harwood, J. L., & Frayn, K. N. (2002). Fatty acid structure and metabolism. *Lipid Biochemistry*, *5*, 13-92.

Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, *45*(2), 160–186.

Hardison, D. R., Sunda, W. G., Shea, D., & Litaker, R. W. (2013). Increased toxicity of *Karenia brevis* during phosphate limited growth: ecological and evolutionary implications. *PLoS One*, *8*(3), e58545.

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

Huang, X. P., Huang, L. M., & Yue, W. Z. (2003). The characteristics of nutrients and eutrophication in the Pearl River estuary, South China. *Marine Pollution Bulletin, 47*(1), 30-36.

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

Ivančić, I., Godrijan, J., Pfannkuchen, M., Marić, D., Gasčparović, B., Djakovac, T., & Najdeka, 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., & Degobbis, D. (1987). Mechanisms of production and fate of organic phosphorus in the northern Adriatic Sea. *Marine Biology*, *94*(1), 117–125.

Labry, C., 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). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *318*(2), 213-225.

Lunven, M., Guillaud, J. F., Youénou, A., Crassous, M. P., Berric, R., Le Gall, E., & Aminot, A. (2005). Nutrient and phytoplankton distribution in the Loire River plume (Bay of Biscay, France) resolved by a new Fine Scale Sampler. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *65*(2), 94–108.

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.

Marić, D., Ljubešić, Z., Godrijan, J., Viličić, D., Ujević, I., & Precali, R. (2011). Blooms of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle in coastal waters of the northern Adriatic Sea (Croatia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *92*(3), 323–331.

Paytan, A., & McLaughlin, K. (2007). The oceanic phosphorus cycle. *Chemical Reviews*, *107*(2), 563–576.

Pettine, M., Patrolecco, L., Camusso, M., & Crescenzio, S. (1998). Transport of Carbon and Nitrogen to the Northern Adriatic Sea by the Po River. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *46*(1), 127–142.

Redfield, A. C., Ketchum, B. H., & Richards, F. A. (1963). The Influence of Organisms on the Composition of Sea Water. *The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas* 2, 26–77.

Revelante, N., & Gilmartin, M. (1976). Temporal succession of phytoplankton in the northern Adriatic. *Netherlands Journal of Sea Research*, *10*(3), 377-396.

Rhee, G.Y. (1973). A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *Journal of Phycology*, *9*(4), 495–506.

Rivkin, R. B., & Swift, E. (1979). Diel and vertical patterns of alkaline phosphatase activity in the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca. Limnology and Oceanography*, *24*(1), 107–116.

Ritz, C., & Streibig, J. C. (2005). Bioassay analysis using R. *Journal of statistical software*, 12(5), 1-22.

Sieburth, J. M., Smetacek, V., & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*, *23*(6), 1256–1263.

Smetacek, V. (1999). Diatoms and the Ocean Carbon Cycle. *Protist*, *150*(1), 25–32.

Smith, S. V. (1984). Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine environment. *Limnology and Oceanography*, *29*(6), 1149–1160.

Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. *A practical handbook of seawater analysis, 167*, 185.

Tomas, C. R. (1997). Identifying marine phytoplankton. Academic press.San Diego

Thingstad, T. F., Krom, M. D., Mantoura, R. F. C., Flaten, G. A. F., Groom, S., Herut, B., & Zohary, T. (2005). Nature of phosphorus limitation in the ultraoligotrophic eastern Mediterranean. *Science 309*(5737), 1068–1071.

Thompson, G. A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, *1302*(1), 17–45.

Totti, C., Cangini, M., Ferrari, C., Kraus, R., Pompei, M., Pugnetti, A., Romagnoli, T., Vanucci, T., & Socal, G. (2005). Phytoplankton size-distribution and community structure in relation to mucilage occurrence in the northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, *353* (3), 204–217.

Tyrrell, T. (1999). The relative influences of nitrogen and phosohorus on oceanic primary production. *Nature*, *400*(6744), 525–531.

Van Mooy, B. A. S., Rocap, G., Fredricks, H. F., Evans, C. T., & Devol, A. H. (2006). Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(23), 8607–12.

Van Mooy, B. A. S., Fredricks, H. F., Pedler, B. E., Dyhrman, S. T., Karl, D. M., Koblízek, M.,&Webb, E. A. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature*, *458*(7234), 69–72.

Viličić D. (2002b): Fitoplankton Jadranskoga mora: biologija i taksonomija, Školska knjiga.

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. (2002a). Checklist of phytoplankton in the eastern Adriatic Sea. *Acta Botanica Croatica*, *61*(1), 57–91.

Wu, J. (2000). Phosphate Depletion in the Western North Atlantic Ocean. *Science*, *289*(5480), 759–762.

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 & Evolution*, *11*(3), 173.

8 ŽIVOTOPIS

Nikola Medić

Osobni podaci

rođen 15.04.1992. u Puli

adresa prebivališta: Koparska 5, 52100 Pula

kontakt: medic.nikola92@gmail.com

Nakon završetka srednje škole upisao sam preddiplomski studij Znanost o moru na Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli. U godini 2015. stekao sam zvanje prvostupnika Znanosti o moru i u istoj godini upisao diplomski studij Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Zagrebačkog prirodoslovno matematičkog fakulteta. Tokom studiranja oduvijek me zanimalo sve vezano za morski ekosustav, s toga odlučio sam baviti se biologijom i ekologijom morskih organizama s naglaskom uvijek na njihovu fiziologiju i odgovore na okolišne uvjete. Sudjelovao sam i u raznim manifestacijama popularizacije znanosti kao što su Festival znanosti i Noć biologije.

Radovi:

Kovačić, I., **Medić, N.** (2016) The effect of chlorpyrifos on protein content and acid DNase activity in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Marine and freshwater behaviour and physiology, 49, 265-275

Sažetak u zbornicima skupova

Pustijanac, E., Marić Pfannkuchen, D., Baričević, A, Smodlaka Tanković, M., Ivančić, I., Kužat, N., **Medić, N.**, Kušpilić, G., Novak, T., Gašparović, B., Pfannkuchen, M. (2017) *Chaetoceros peruvianus* Brightwell, 1856: A generalistic/opportunistic approach to success in the northern Adriatic plankton. Abstract book of the 52nd European Marine Biology Symposium. Ramšak, A., Francé, J., Orlando-Bonaca, M. ... Malej, A. (ur.). - Piran: National Institute of Biology, Marine Biology Station Piran. 83 (ISBN: 978-961-93486-6-6).