Metode uzorkovanja i obrada perifitonskih dijatomeja i dinoflagelata

Mejdandžić, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

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:217:726741

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

METODE UZORKOVANJA I OBRADA PERIFITONSKIH DIJATOMEJA I DINOFLAGELATA

METHODS OF SAMPLING AND PROCESSING PERIPHYTIC DIATOMS AND DINOFLAGELLATES

SEMINARSKI RAD

Maja Mejdandžić
Preddiplomski studij biologije
Mentor: Doc. dr. sc. Zrinka Ljubešić

Zagreb 2012

SADRŽAJ:

1. **UVOD**.....1
1.1. ŠTO JE PERIFITON?.....3
1.2. ISTRAŽIVANJE PERIFITONA.....5
2. **NASELJAVANJE I SUKCESIJA**.....6
2.1. SEZONSKA VARIJABILNOST NASELJAVANJA.....7
3. **METODE UZORKOVANJA**.....8
4. **PRIRODNI SUBSTRATI**.....10
4.1. EPILITON 11
4.2. EPIPHYTON.....13
4.3. EPIPSAMON.....14
4.4. EPIPELON.....14
5. **UMJETNI SUBSTRATI**.....14
6. **UZORKOVANJE PLANKTONA**.....16
7. **LABORATORIJSKA OBRADA UZORAKA**.....17
7.1. PRED-TRETMAN UZORAKA.....19
7.2. TRETIRANJE PEROKSIDOM.....20
7.3. TRETIRANJE SULFATNOM KISELINOM.....20
7.4. TRETIRANJE SULFATNOM I NITRATNOM KISELINOM.....20
7.5. OČUVANJE UZORAKA I IZRADA TRAJNIH PREPARATA.....21
7.6. IZRADA TRAJNIH PREPARATA ZA SVJETLOSNU MIKROSKOPIJU.....21
7.7. IZRADA PREPARATA ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU.....22
8. **ANALIZA PODATAKA**.....22
9. **LITERATURA**.....25
10. **SAŽETAK**.....29
11. **SUMMARY**.....29

1. UVOD

Fitoplankton su jednostanični autotrofni i miksotrofni organizmi koji lebde u vodenom stupcu. Razvijaju se u eufotičkoj zoni, gdje uz pomoć sunčeve svjetlosti kroz proces fotointeze izgrađuju novu organsku tvar. Riječ je o primarnim proizvođačima organske tvari, čija ukupna godišnja neto proizvodnja iznosi između 15×10^9 i 18×10^9 tona ugljika. Temelj su života u moru.

Dinoflagelati su uz dijatomeje najvažniji predstavnici mikrofitoplanktona, ali i nanofitoplanktona. Poznato je oko 2000 recentnih vrsta koje su raspoređene u jedan razred i 8 redova. Naseljavaju morske, slatke i brakične vode. Pretežno su planktonski, iako su poznati i bentoski predstavnici. Najzastupljeniji su u toplim morima, a u temperiranim su morima brojniji u toplijem dijelu godine.

Stanice dinoflagelata nemaju staničnu stijenku, nego se na površini stanice nalazi omotač karakterističan samo za ovu skupinu amfijezma (slika 1.). Ako je amfijezma tvrda često se naziva oklopom ili tekom, a takve dinofite nazivamo tekatnim.

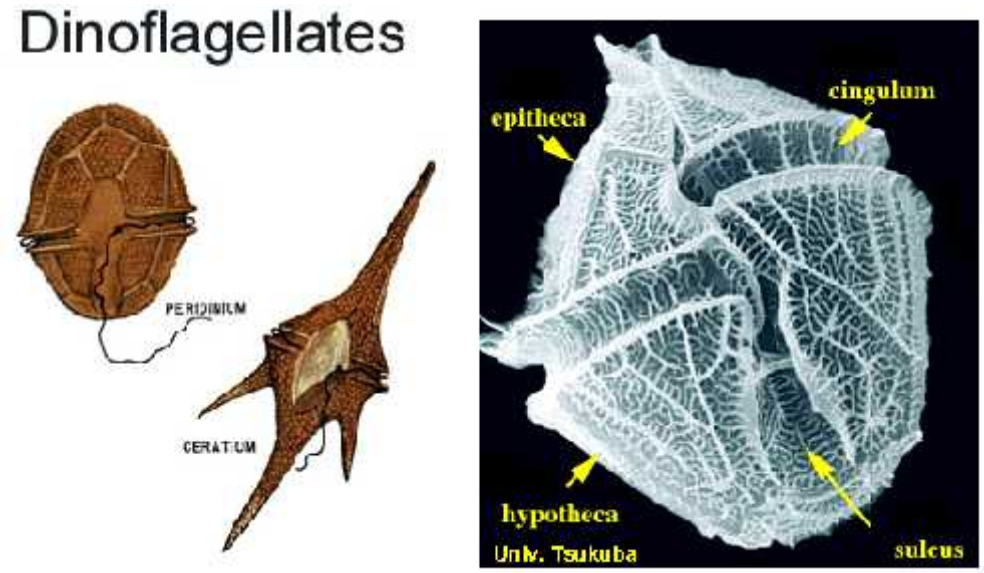
Površina mladih stanica s vanjske strane se sastoji od plazmaleme i s unutrašnje strane od vezikula u kojima se kod oklopljenih vrsta stvaraju celulozne ploče. Vrste čije stanice nemaju celulozne ploče nazivamo netekatnim ili golim, a kod njih su vezikule prazne.

Najveći dio organizama ima gornju i donju polovicu (epitheca i hypotheca) koje razdvaja poprečna brazda ili pojas (cingulum). Na ventralnoj strani on se siječe s uzdužnom brazdom ili žlijebom (sulcus). Iz sjecišta izlaze bičevi i to transverzalni koji se pokreće unutar poprečne brazde i rotira stanicu, te uzdužni bič, koji stanicu pokreće naprijed. Oklopljeni dinoflagelati se međusobno razlikuju po broju i rasporedu pločica u oklopu, te se na taj način određuje rod i vrsta. Za razliku od njih, gole dinoflagelate je neophodno određivati u živom stanju, jer se međusobno razlikuju po obliku, načinu kretanja i po obliku i broju kromatofora.

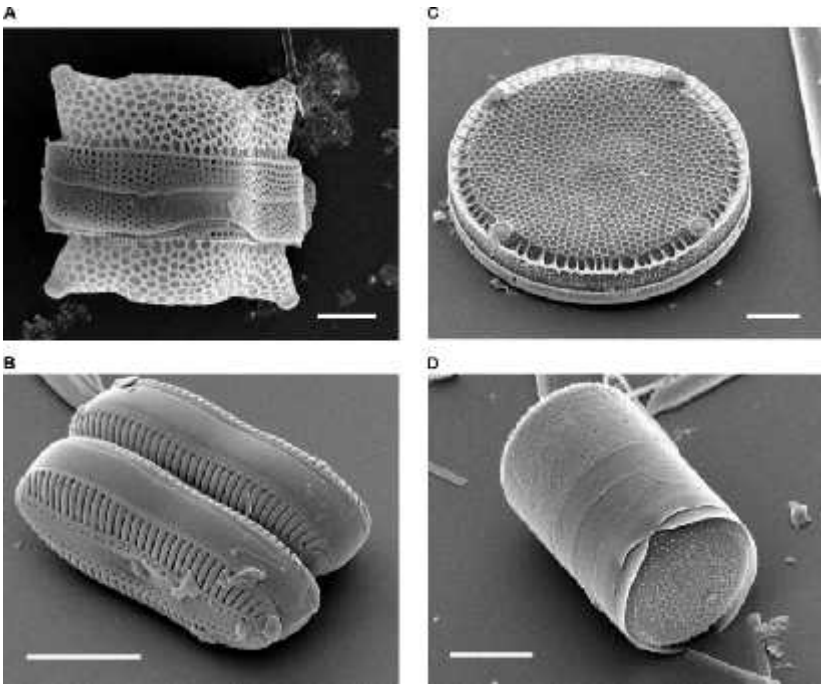
Dinoflagelati su većinom jako dobri plivači kojima su svojstvene dnevne vertikalne migracije. Danju su stanice blizu površine, gdje se koriste svjetlosnom energijom za fotosintezu. Noću stanice migriraju u dublje slojeve, gdje upijaju i skladište višak hranjivih soli.

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

Stanica dijatomeja nema staničnu stijenku već je nakon stanične diobe obavijena periplastom. Ispod plazmaleme nalaze se vezikule u kojima se sintetizira amorfni i netopljivi opal (SiO_2 x H_2O) iz netopljivog silicija, koji je u moru prisutan u obliku ortosilicijeve kiseline (H_2SiO_4) i njezinih topljivih polimera. Ljušturica (frustula) se sastoji od 2 dijela (valve), od kojih veći dio, kao poklopac kutije, pokriva manji dio (slika 2.). Valve mogu biti različitih oblika (okrugle, eliptične, stožaste ili valovite), a bočno su spojene sa pojasom. Pleure gornjeg i donjeg dijela ljušturice stvaraju pojas. Imaju velike vakuole koje zapremaju 90% staničnog prostora. S obzirom na strukturu ljušturice dijelimo ih na Centricae koje imaju radijalnu strukturu u odnosu na centralnu točku i pretežno su planktonski oblici, te Pennatae koje su izdužene i prevladavaju u bentosu.



Slika 1. Građa dinoflagelata
Lijevo- crteži *Peridinum sp*. i *Ceratium sp*. ; Desno- Slika pod SEM-om (http://hanoverhbiology.wordpress.com)



Slika 2. Dijatomeje slikane SEM-om
A) pojas B) penate spojene valvama C) centrica D) centrice spojene valvama (http://en.wikipedia.org)

1.1. ŠTO JE PERIFITON?

Postoje mnogi termini koji se koriste kako bi se razlikovale grupe organizama koji žive u drugačijim vodenim staništima. Kako znanost i istraživanja napreduju, sve više definicija opisuje slične termine, pa se javlja potreba za standardizacijom istih kako bi se komunikacija među znanstvenicima olakšala.

Bentos ima široko značenje pošto uključuje raznoliki živi svijet koji je uvijek u vezi sa vodenim staništima (Margalef 1983, Wetzel 2001). Nedavno, Wetzel je predložio koncept definiranja bentosa kao ”životinje vezane uz suprstat”.

Definicijom perifitona obuhvaćeni su biljni i životinjski organizmi pričvršćeni na različitim tipovima substrata potopljenih u vodi, a koji pritom ne prodiru u podlogu (Cover i Harrel 1978). Biofilm i mikrofitobentos su dva sinonima koja se prema MacIntyre i sur. (1996) mogu također smatrati perifitonom. Definicija mikrofitobentosa je da su to sve jednostanične eukariotske alge te cijanobakterije koje rastu unutar nekoliko milimetara na osvijetljenom sedimentu (MacIntyre i sur. 1996).

Uzimajući u obzir ove definicije, perifiton se smatra osnovom hranidbenog lanca te u nekim vodenim staništima najbrojnijm oblikom primarnih proizvođača (Wetzel 1964, Goldsborough

i Robinson 1996). U slatkovodnom okruženju bentoske mikroalge su često uključene u perifiton, opisan kao kompleksna zajednica mikrobiota (alge, bakterije, gljive i životinje) i detritusa koji je povezan sa anorganskim ili organskim, živim ili mrtvim substratom (Liboriussen 2003).

Perifiton se dijeli na: euperifiton – osnovni dio perifitona, čine ga pričvršćeni organizmi prilagođeni sesilnom načinu života – pomoću rizoida, želatinoznih cijevi, stapki, držaka i sl., pseudoperifiton – pridruženi dio perifitona, zajednica organizama koji se slobodno kreću među pričvršćnim vrstama, oviseći o njima kao izvoru hrane ili zaštiti od predatora, planktonski organizmi uhvaćeni i zadržani u gustoj mreži pričvršćenih mikrofita. S obzirom na substrat kojeg naseljavaju, perifitonske zajednice mogu biti: epiholon – organizmi na različitim substratima, epizoon – organizmi na životinjama, epidendron – organizmi na drveću, epiliton – organizmi na kamenju, epipelon – organizmi na mulju (slika 3.), epipsamon – organizmi na pijesku, epiphyton – organizmi na biljkama.



Slika 3. Perifiton sa sedimentom (http://www.nps.gov/bicy/forteachers/prairies.htm)

Dinoflagelati u perifitonu se opisuju kao slobodnoživući organizmi koji se kreću po perifitonskom sloju kojega su prethodno napravile same dijatomeje. Oni su također važan

sastavni dio fitoplanktona, pa neposredno time utječu i na sedentarne zajednice pričvršćene na različite substrate.

Perifitonske zajednice se najčešće proučavaju u estuarijima rijeka gdje prevladava brakična voda. Takvom načinu života pogoduje sporiji tok, izobilje hranjivih soli i svjetla, pa su češće prisutne u ušćima rijeka nego na otvorenom moru. Najčešći rodovi dijatomeja koji su prisutni u perifitonskim zajednicama su *Achnanthes*, *Amphora*, *Cocconeis*, *Cyclotella*, *Cymbella*, *Diatoma*, *Diploneis*, *Epithemia*, *Fragilaria*, *Gomphonema*, *Gyrosigma*, *Mastogloia*, *Meridion*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Synedra*. Dominantni taksoni *Achnanthes*-*Cymbella*-*Fragillaria* u perifitonskim zajednicama Mediteranskih rijeka razvijaju se u ljeto kada je period ubrzanog rasta i razvoja takvih zajednica (Caput i sur. 2005). U stabilnim uvjetima planktonske dijatomeje *Melosira* i *Fragillaria* se također mogu naći u perifitonu kao slabo pričvršćena zajednica (Round 1991). Dominantna dijatomeja *Achnantes sp*. je poznata kao indikator vode siromašne hranjivim solima (Agatz i sur. 1999). Također, dijatomeja *Cymbella affinis* je dominantna epifitska dijatomeja u hidrokemijski stabilnim i oligotrofnim vodama (Patrick i Palavage 1994).

1.2. ISTRAŽIVANJE PERIFITONA

Dijatomeje i dinoflagelati, kao najvažnije i najdominantnije skupine perifitonskih zajednica te njihova uloga u primarnoj produkciji u vodenim staništima su često podcijenjene. Osim kvantitativnih i kvalitativnih važnosti perifitonskih dijatomeja i dinoflagelata, njihovom istraživanju je pridana važnost jer su odlični ekološki indikatori kako su prisutni u svim vodnim staništima te reagiraju na male ekološke promjene velikim promjenama u biomasi. Posebno, uočeno je da su dijatomeje jako dobar indikator pH, saliniteta te hranjivih soli pa su se počele široko koristiti kao ekološki indikator vode kao što je problem acidifikacije (Charles i sur. 1990, Battarbee i sur. 1990, Battarbee i sur. 1999), salinifikacije (Fritz 1990, Juggins 1992, Cumming i Smol 1993), eutrofikacije (Smol i sur. 1983, Engstrom i sur. 1985, Whitmore 1989, Anderson 1990, Bennion i sur. 2000), te klimatskih promjena (Smol i Cumming 2000). Njihova bioindikatorna uloga se koristi i proučava unutar znanosti paleoekologije.

Iako sve više raste broj istraživanja važnosti perifitonskih zajednica u stajaćim vodama, samo znanje o lentičkom perifitonu je drastično manje nego o lotičkom, a posebno biologiji fitoplanktona (Goldsborough i Robinson 1996). Usprkos tome što plića vodena

staništa pružaju odlične uvjete razvoja perifitonskih zajednica, spektar informacija o ograničavajućim faktorima koji utječu na sam razvoj u ovakvim staništima je i dalje mali (MacInyre i sur. 1996, Miller i sur. 1996).

2. NASELJAVANJE I SUKCESIJA

Epilitičke mikroalge rastu pričvršćene na kamenje ili umjetne podloge te u morskim staništima prvenstveno uključuju dijatomeje i cijanobakterije. Bentičke mikroalge i bakterije predstavljaju prve među ”doseljenicima” na čvrstim substratima. Prisutnost mikrobnog sloja koji se sastoji od jednostaničnih algi te bakterija pogoduje daljnjem naseljavanju substrata biljkama ili makrozoobentosom (Round, 1981). Epilitičke dijatomeje uključuju i nepričvršćene i pričvršćene. Nepričvršćene vrste su sve penatne birafidne dijatomeje koje se mogu pokretati po substratu, dok su pričvršćene vrste arafidne i monorafidne dijatomeje koje se slabije kreću i imaju dva načina pričvršćivanja. U prvom načinu, stanice na substratu imaju ograničeno gibanje, dok su u drugom pričvršćene jednom valvom pa im je kretanje slobodnije. Rodovi poput *Navicula* i *Nitzchia* žive u sluzavom okruženju kojeg su same stvorile.

U morskim staništima substrati bogati silikatima razvijaju siromašnije perifitonske zajednice nego oni bogati karbonatima. Ova inhibitorna djelovanja silikata na razvoj mnogih morskih beskralježnjaka poznate su još od 19. stoljeća, te su pripisivane oksidacijskim svojstvima kristalične strukture i formiranja slobodnih hidroksilnih skupina.

Na rast, razvitak i naseljavanje perifitonskih zajednica primarno utječu ekološki faktori kao što su svjetlost, salinitet, stupanj trofije te udar valova, a utjecaj substrata je dugo smatran neutralnim parametrom. U novije vrijeme pokazalo se da kemijska struktura substrata vrlo jasno odražava rast dijatomeja što se u prvu ruku vidi po razlici u biomasama. Dijatomeje tako bolje naseljavaju silikatne podloge jer imaju sposobnost ugrađivanja SiO_2 u svoje stanice koji im omogućava izgradnju same ljušturice. Osim kemijskog sastava podloge, treba uzeti u obzir i njenu fizičku strukturu. Faimali i sur. (2004) pokazali su da različit sastav biofilma na staklu, silikatu i mramoru te mikrostruktura površine tih substrata igra važnu ulogu u naseljavanju perifitonskih dijatomeja.

2.1. SEZONSKA VARIJABILNOST NASELJAVANJA

Epilitičke dijatomeje dijele se na različite forme obzirom na njihov rast (Round, 1981): uspravne (prvenstveno arafidne vrste koje su pričvršćene na substrat pomoću ekstracelularnih polimernih substanci (EPS) pomoću kojih izgrađuju stapke), dobro pričvršćene (*eng*. adnate) koje su prvenstveno monorafidne vrste koje se pričvršćuju cijelom površinom valve, te neke birafidne vrste kao što je *Amphora spp*., pokretne (birafidne vrste koje se slobodno pokreću po substratu), dijatomeje koje formiraju sluzavi omotač (tube-forming) - navikuloidni i nitzchioidni oblici koji žive u sluzavim omotačima koje su same proizvele, plokon (*eng*. plocon) - alge koje su slabo pričvršćene za substrat kao što su centrice i cijanobakterije, planktonske (vrste koje ostaju zarobljene u perifitonskoj zajednici pri tome nastavljajući sa procesima fotosinteze).

Prema Totti i sur. (2007) te njihovom istraživanju u sjevernom Jadranu postoji nekoliko faza naseljavanja mikrofitobentosa. U prvoj fazi, substrat naseljavaju samo bakterije i detritus, a slijede dobro pričvršćeni i pokretni oblici dijatomeja koji formiraju rozetaste strukture uspravno se pričvršćivajući na substrat. U zadnjoj fazi događa se veliki rast uspravno pričvršćenih dijatomeja koje naposlijetku kreiraju kompleksnu trodimenzionalnu zajednicu (Korte i Blinn, 1983; Tuji, 2000a,b). Ove faze se mogu prepoznati kod svih zajednica mikroalgi koje naseljavaju čvrste substrate (epilithon, epifithon, episammon, epipelon). Nekoliko studija pokazalo je da se stabilna posljednja faza uočava na substratu koji je ostavljen tri do pet tjedana u stupcu vode (Hoagland i sur.,1982; Hoagland, 1983; Hamilton i Duthie, 1984; Kusakabe, 1988; Tanaka i Watanabe, 1990; Tuji, 2000a; Hameed, 2003) i okarakterizirana je razvitkom uspravnih formi.

Naseljavanje nije uvjetovano samo građom i kemijskom strukturom substrata, nego uvelike ovisi o godišnjem dobu, odnosno sezonskoj varijaciji.
Pokretne forme, koje su i najzastupljenije, prisutne su tokom cijele godine. Uspravne forme pvećavaju svoju brojnost u ranom i kasnom proljeću, a smanjuju ljeti. Dobro pričvršćene dijatomeje imaju veću brojnost ljeti, dok dijatomeje koje formiraju sluzavi omotač imaju svoj vrhunac rasta u proljeće. Plokon i planktonske dijatomeje su gotovo zanemarive jer imaju konstantnu brojnost. Povećana brojnost planktonskih dijatomeja tokom zime pripisuje se karakterističnom cvjetanju u sjevernom Jadranu. Dominacija pokretnih oblika dijatomeja pripisuje se njihovoj pokretljivosti što ih čini nadmoćnim kompetitorima za hranjive soli i

svjetlost (DeNicola i MacIntyre, 1990). S druge strane, uspravni oblici uspjevaju povećati svoju brojnost jer bolje iskorištavaju svjetlost, hidrodinamiku okoliša i hranjive soli (Tuji, 2000b; Liboriussen, 2003). Također, oblici koji sami proizvode svoje sluzave stapke mogu biti jaki kompetitori za svjetlost kada je limitirajući faktor, jer imaju bolju poziciju u cijeloj perifitonskoj zajednici (Wellnitz i Ward, 2000).

Važan faktor koji utječe na oblikovanje same zajednice je *grejzing* efekt koji može narušiti vertikalnu trodimenzionalnu strukturu zajednice tako što izravno utječe na uspravne oblike (Hillebrand i sur., 2000; Wellnitz i Ward, 2000).

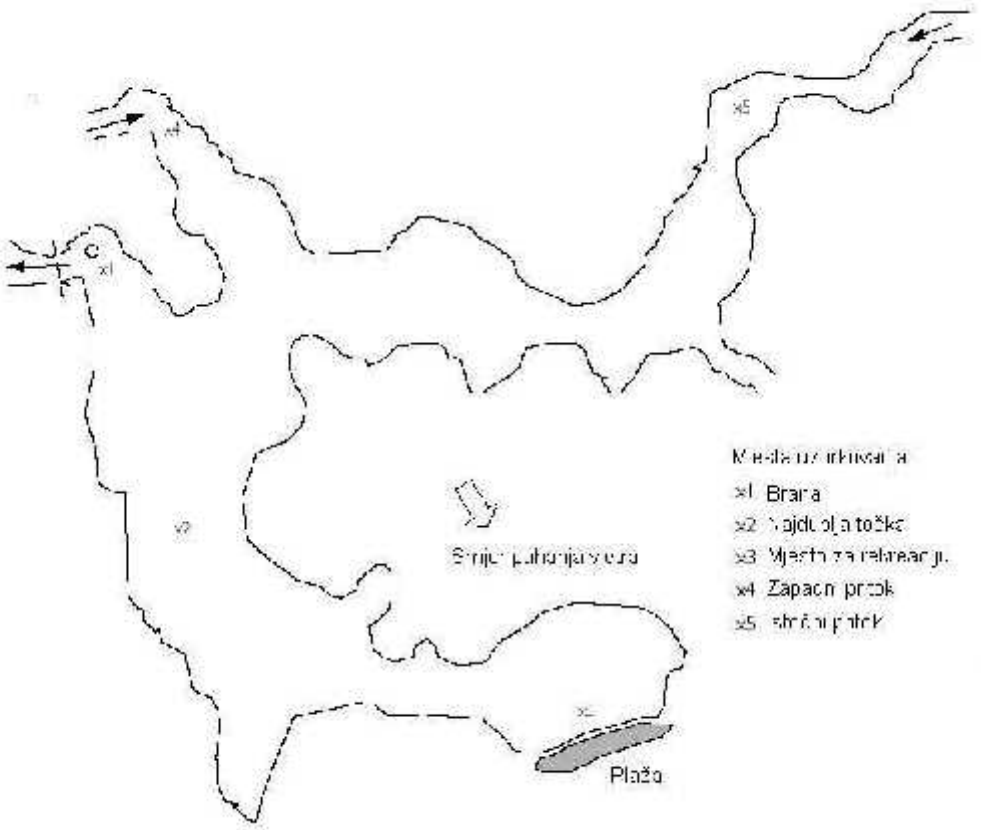
3. METODE UZORKOVANJA

Svaka metoda uzorkovanja se razlikuje, ovisno o tipu staništa. Cilj dobrog uzorkovanja koji će dati svrsishodne rezultate istraživanja je uzorkovati stanište što jasnije moguće kako bi se omogućila dobra specifična analiza i preglednost staništa. Informacije o postotku pokrivenosti substrata na mjestu istraživanja omogućiti će procjenu reprezentativnosti uzoraka.

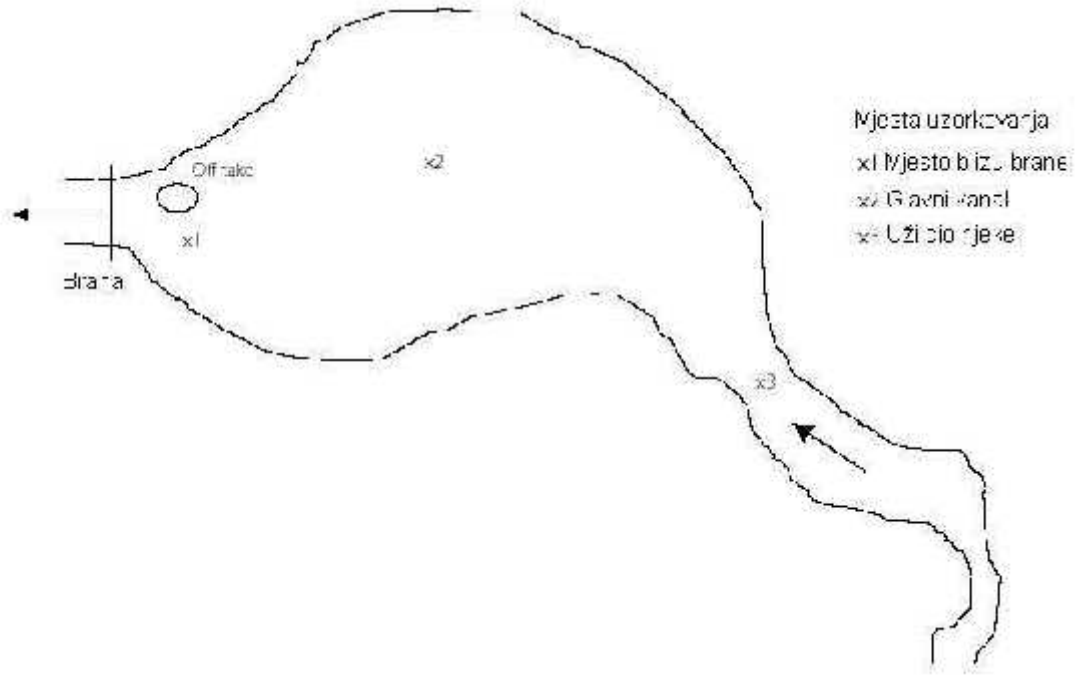
Druga važna stvar je odabrati pravo vrijeme uzorkovanja. Uzorkovanje perifitona trebalo bi biti tokom perioda kada je tok vode stabilan. Ovakvi stabilni uvjeti variraju obzirom na različite regije toka rijeke. Uzorkovanje se mora vršiti u točno vrijeme svake godine ako se radi o višegodišnjem istraživanju, kako bi se minimizirao utjecaj sezonskih promjena na perifitonske zajednice. Uzorkovati se može u bilo koje doba godine, no ipak se preporuča proljeće kada su dijatomeje dominantna skupima mikrofitobentosa. Uzorkovanje zimi se ne preporuča jer je rast dijatomeja tada najmanji, a uvjeti na terenu nisu pogodni.

Mjesto u toku rijeke na kojem želimo uzorkovati mora imati potrebne substrate za samo istraživanje kao što su kamenje, makrofiti ili mineralni sedimenti, ovisno o tipu rijeke. Uvijek je dobro da mjesto ima kombinacije brzaca i bazena, kako bi se omogućilo uzorkovanje različitih prirodnih substrata. Preporuča se da se uzorkuje bar 1 metar dalje od obale širokih rijeka, a 10% širine dalje od obale užih rijeka (slika 5.). Uzorkovanje u jezerima bi trebalo obuhvatiti različite dubine jezere i svakako eventualne pritoke svježe vode iz okolnih rijeka (slika 4.).

Svako uzorkovanje se mora zabilježiti na formularu STAR protokola. Na njemu se bilježi tip substrata (makrofiti, makroalge, sediment, kamen, konstrukcije napravljene ljudskom djelatnošću).



Slika 4. Preporučena mjesta uzorkovanja u velikim jezerima (http://www.agr.unizg.hr/cro/nastava/moduli/doc/26280_plankton_bentos.pdf)



Slika 5. Preporučena mjesta uzorkovanja na tekućoj vodi (http://www.agr.unizg.hr/cro/nastava/moduli/doc/26280_plankton_bentos.pdf)

Također, ukoliko se uzorkuje na makrofitima ili makroalgama, zabilježava se vrsta. Bočice u koje se uzorci stavljaju moraju biti valjano označene i slagati se sa ispunjenim formularima. Uvijek se za isti substrat uzima više uzoraka zbog gubljenja podataka ili nedostatka materijala za različite analize.

Ukoliko je moguće, dobro je obraditi i samu kemiju vode i fizikalna obilježja staništa. Ako je moguće, kemija vode analizira se *in situ* sa odgovarajućim uređajima, a ako ne, uzorci vode se uzimaju sa površine u bočice i odnose na analizu. Mjeri se pH, zasićenost dušikom (N), fosforom (P), DOC (dissolved organic matter), zasićenost kisikom (O) te veći kationi i anioni. Karakterizacija staništa uključuje tipove substrata, kompleksnost staništa i pokrivenost, vegetacijsku pokrivenost i strukturu, antropogeni utjecaj, korito-priobalnu interakciju te vodostaj.

4. PRIRODNI SUBSTRATI

Uzorci sa prirodnih substrata mogu se uzorkovati sa svih raspoloživih substrata ili sa reprezentativnih substrata kao što je krupno kamenje ili oblutci sa plitke i brze vode iz rijeke.

Za uzorkovanje sa svih substrata najprije je potrebno odrediti kakav je substrat raspoloživ u vodotoku i u kojem postotku. Ako se rade i analize bentosa, tada je potrebno i perifiton uzorkovati sa istih substrata. Različita staništa imaju karakterističan substrat. Tako će uz obalu obično biti prisutno krupno kamenje sa obraštenim biljnim materijalom, dok će u bazenima vjerojatno biti prisutan šljunak ili pijesak.

4.1. EPILITON

Epiliton označava svaku perifitonsku zajednicu koja je vezana uz kamen različitih veličina, oblika i kemijske strukture.
Cilj uzorkovanja je skupiti epilitičke dijatomeje sa kamenja koji se u normalnim uvjetima ne miču udarima vode. Oblutci (*eng*.cobbles) pripadaju kamenju srednje veličine (*lat*.mesolithal), a uzorkuju se više nego krupnije stijene (e*ng*.boulders) jer je sa njima lakše rukovati. Sitni šljunak (*eng*. pebbles) je najsitniji substrat (*lat*. microlithal) te se može koristiti kada oblutci nisu dostupni u staništu (zajednice dijatomeja se na sitnom šljunku lakše poremete promjenama hidroloških uvjeta).

Kad se uzorkuju oblutci, sa postaje se uzima minimalno 5 primjeraka, tako da gornja površina sa koje se struže perifiton iznosi oko 100 cm2 (slika 7.). Kamenja se biraju nasumice, te se pazi da nisu obrasla sa filamentoznim algama. Kada se uzorkuje sitni šljunak, potrebno je uzeti minimalno 10 uzoraka. Uvijek je bitno znati površinu sa koje se uzima uzorak i volumen vode u kojem se uzorak čuva radi kasnijih kvantitativnih analiza kojima želimo ustanoviti točan broj stanica po volumenu uzorka.

Izabrani kamen se očisti od lagano pričvršćenog detritusa ili zagađenja, stavi se u plastičnu posudu i po njemu se izlije 100-200 ml destilirane vode. Gornja površina kamena se ostruže sa čvrstom četkicom za zube ili oštrim skalpelom i zatim se destilirana voda sa ostruganim perifitonom prelije u bočicu za uzorke (slika 6.). Ako se uzorci ne obrade u laboratoriju sljedećih 24 sata, uzorak se treba kozervirati sa 4%-tnim formaldehidom.

U nekim rijekama, kamenje može biti obraslo filamentoznim algama. Uzorkovanje tih kamenja rezultiralo bi sakupljanjem epilitičkih i epifitskih dijatomeja. Ako je slučaj da je većina kamenja obraslo algama, onda uzorkovanje onih par koji nisu neće dati reprezentativan primjerak.



Slika 6. Struganje perifitona koristeći skalpel

(http://www.yuroktribe.org/departments/ytep/ytep_photo_gallery/waterqualityphotogallery.htm)



Slika 7. Uzorkovanje epilitona iz jezera

(http://www.yuroktribe.org/departments/ytep/ytep_photo_gallery/waterqualityphotogallery.htm)

4.2. EPIPHYTON

Epifithon (*lat*. epiphyton) predstavlja perifitonske zajednice koje rastu pričvršćene na makrofite ili makroalge.

Potopljeni makrofiti su prednost naspram onih koji se većinom nalaze iznad vode. Kada se uzorkuju makrofiti, sakupljaju se dijelovi talusa ili stabljike koji su u zoni fluktuiranja vode. Prije samog uzorkovanja, determiniraju se vrste koje se uzorkuju i popiše njihova relativna brojnost. Filamentozne alge (makroalge) se ubiru rukom (slika 8.), te stave u kontejner zapremine 1l sa širokim otvorom. Doda se 100-200ml destilirane ili riječne vode, te se uzorak protresa 60 sekundi. Suspenzija od 250 ml se dekantira u manju bočicu za uzorke i fiksira sa formaldehidom ako je potrebno.

Kada se uzorkuju potpuno potopljene morske cvjetnice, kao što su *Zoostera* i *Posidonia*, treba paziti da se odreže vrh stabljike i listova te da se pri tome ne uzburka sediment kako ne bi došlo do kontaminacije sa bentičkim zajednicama. Nakon vađenja uzorka iz vode, sa djelova listova i stabljike se oštrim skalpelom struže perifiton i stavlja u bočicu za uzorke sa određenim volumenom vode.



Slika 8. Perifiton na makroalgama (http://www.aquafiber.com/about_us.html)

4.3. EPIPSAMON

Epipsamon označava sve orzanizme koji žive na pijesku.
Kada se uzorkuje sediment, koriste se staklene cjevčice (kapilare) koje se drže začepljene palcom dok se ne urone do dna, a onda se horizontalnim pokretima i otpuštanjem palca sa otvora dopušta sedimentu i vodi da uđu u kapilaru. Kapilara se tada vadi iz vode i sadržaj se presipa u bočicu za uzorke. Postupak se ponavlja dok se ne dobije otprilike 200 ml uzorka. Uzorak je bolje ne fiksirati, no ako je nemoguće obraditi ga unutar 24 sata, postupak fiksacije je isti.

4.4. EPIPELON

Epipelon predstavljaju organizmi koji naseljavaju površine mulja.
Epipelon je najteža zajednica koju možemo uzorkovati, prvenstveno jer se može naći na različitim dubinama vodenog stupca, a drugim dijelom jer je teško odvojiti prave epipeličke vrste od mrvih ljušturica dijatomeja sa drugih staništa.

Ako se uzorkuje u plitkim vodenim staništima, uzorak se sakuplja staklenom cjevčicom promjera 1 cm pod kapilarnom aktivnosti. Pusti se da se cjevčiva napuni sedimentom do pola i tako prekriveni sediment sa vodom se stavlja u stetilizirani kontejner.

Ako se uzorkuje sa dublje dubine, koristi se grabilica za sediment, a iz zagrabljenog sedimenta se odvaja površinski dio prekriven sa vodom. Preko noći se uzorak ostavi pod jakim svjetlom sa staklenom predmetnicom na sedimentu, kako bi pokretne dijatomeje iz epipelona mogle naseliti predmetnicu. Sutradan se sa predmetnice ostružu dijatomeje i stave u zaseban kontejner sa formaldehidom.

5. UMJETNI SUBSTRATI

Perifiton se može uzorkovati i sa umjetnih substrata koji su stavljeni u vodeni medij u određenom vremenskom periodu. Zajednice organizama će kolonizirati substrat, koji u određenom trenutku možemo uzorkovati. Ova metoda je vrlo korisna na dubokim potocima

i rijekama na kojima nema plitkih i brzih dijelova, močvarama ili litoralnim zonama lentičkog staništa.

Upotrebljava se predmetno stakalce, stakleni štapić, ploče pleksiglasa ili drvene pločice (slika 9.). Oni se stavljaju u posebno prilagođene vreće ili boce na površinu vode ili na dno u periodu između 2 do 4 tjedna. Na svakoj lokaciji treba staviti do 3 umjetna substrata da bi se mogla izmjeriti prostorna varijabilnost algi. Umjetni substrat je potrebno fiksirati na čvrstim strukturama na rijeci da ne bi bio odnesen vodenom strujom, a svaki se treba okrenuti uzvodno. Nakon inkubacijskog perioda sakupljaju se uzorci pomoću četkice, gumenim ili drvenim predmetima. Prednost ovakve metode je da se mogu postaviti različiti substrati na točno određena mjesta i prikupljati uzorci bez utroška energije za odstranjivanje perifitona sa kamenja ili nekih drugih substrata.

Pleksiglas je najčešća umjetna podloga koju znanstvenici upotrebljavaju kada im je u cilju kvantitativno istraživanje obraštaja. Pleksiglas pločice dimenzija 10 x 6 x 0,3 cm se učvrste za konop i postave u vodeni stupac na različitim željenim dubinama. Da se dubina ne bi mijenjala, dodatno se konop učvrsti sa sidrom i lancem za dno. Pločice se poredaju paralelno sa površinom vode.
Obraštaj se struže skalpelom i tvrdom četkicom sa gornje srane, te se dodatno ispere površinskom vodom. Nakon skidanja obraštaja izmjeri se i zabilježi površina ostruganog dijela pločice, a uzorci se skupljaju u za to predviđene bočice i fiksiraju u poznatom volumenu 2%-tne otopine formaldehida (konačna koncentracija).



Slika 9. Plutajući umjetni substrat sa staklenim predmetnicama (http://www.hoskin.ca/catalog/index.php?main_page=index&cPath=1_57_387_395)

6. UZORKOVANJE PLANKTONA

Uzorkovanje planktona je dobro napraviti prilikom uzorkovanja samog perifitona jer se u pseudoperifitonskim zajednicama nalaze i planktonske i pričvršćene vrste. Tako će uzorak planktona biti izvrstan popratni podatak perifitonskom istraživanju.

Plankton je uobičajeno dobro izmješan između same površine vode i njezinog sedimenta. Za kvalitativan podatak uzorkuje se planktonskim mrežicama (slika 10.) po sredini jezera ili na otvorenom moru da bi se dobrio reprezentativan uzorak fitoplanktona (zastupljen sa svim skupinama), a da bi se izbjeglo kontaminiranje sa bentoskim vrstama. U dobro produktivnim jezerima (eutrofnim) dovoljno je uzeti otprilike 250ml uzorka, dok u manje produktivnim (oligotrofnim) jezerima uzorak mora biti veći, najčešće 1l. Kako se sastav planktona neprestano mijenja, uzorkovanje se mora odvijati periodički kroz godinu, u ista godišnja doba. Ako se namjerava istraživati kvantitativna struktura uzoraka, treba imati na umu da dijatomeje nisu ravnomjerno raspoređene na svim dubinama, te se uzorkovanje mora ponavljati na više različitih dubina da bi se dobio reprezentativan uzorak. Uzorkovanje se najlakše izvodi Niskin crpcem (slika 11.) koji zaprema litru ili više vode sa određene dubine, te je zato najvažniji za kvantitativne metode istraživanja.
Količina fitoplanktona se izražava kao abundancija (broj stanica po L^{-1}) koja se određuje fazno kontrastnim mikroskopom, te kao biomasa klorofila a po L^{-1} ili biovolumen (svježa težina).



Slika 10. Planktonska mrežica



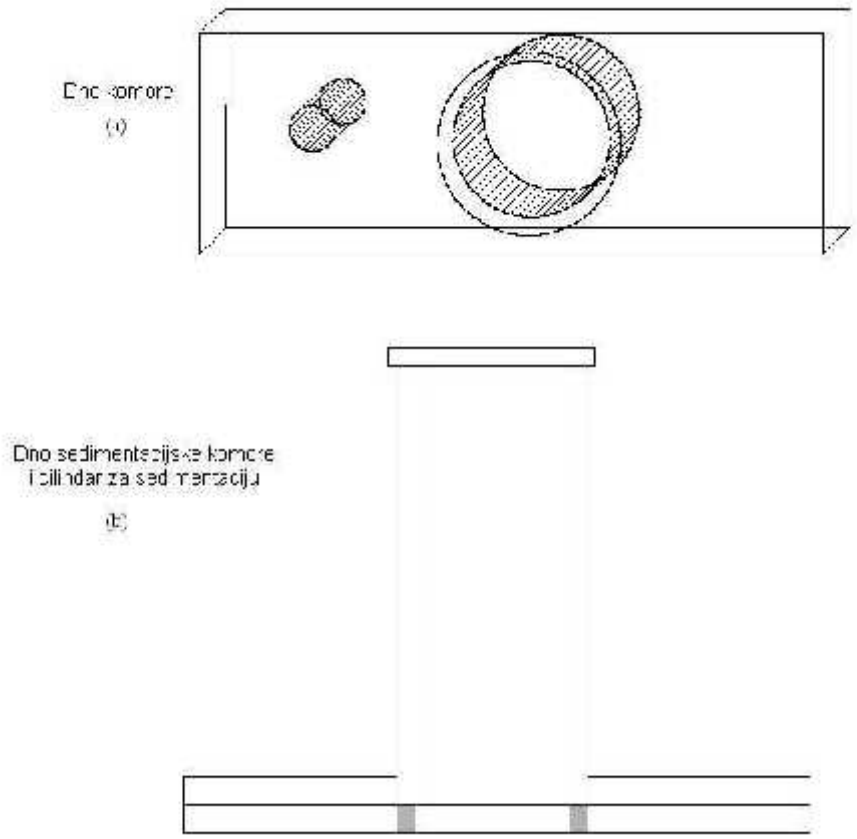
Slika 11. Niskin crpac

7. LABORATORIJSKA OBRADA UZORAKA

Dijatomeje su uvjiek bile, a i danas su, najdraži objekt promatranja pod mikroskopom biologa diljem svijeta. Pri kvantitativnim analizama dijatomeja i dinoflagelata, brojnost se utvrđuje na uzorcima fiksiranima u 2% otopini neutraliziranog formaldehida (konačna koncentracija). Brojanje stanica vrši se pomoću sedimentacijskih komorica za brojanje po Utermöhl-u 1958. (slika 12.). Nakon što se uzorak sedimentira, uzimamo komore i stavljamo ih pod mikroskop. Koristi se inverzni mikroskop, koji se razlikuje od klasičnog u tom smislu da se objektivi nalaze ispod ploče kako bi mogli brojati dno sedimentacijske komore (slika 14.). Prije brojanja na velikom povećanju, dobro je provjeriti uzorak na malom (10x). Na taj način brojimo velike dinoflagelate. Na većem povećanju se vide stanice poput kokolitoforida i dijatomeja, koje se broje po transektima (jedan horizontalni potez po ovalnoj komorici). Uzorci fitoplanktona sadrže litru morske ili slatke vode. Kada prebrojimo stanice po transektima u komorici, pristupa se čišćenju ostatka uzorka da bi se kvalitativno analizirale jer često ne znamo točne vrste koje smo brojali. Vrste označene sa x onda uspoređujemo sa relativnom brojnošću u očišćenom uzorku i tada ju determiniramo. Perifitonske uzorke je obavezno čistiti jer se ne može točno identificirati stanica dijatomeje bez opsežnog pregleda ljušturice. Nakon identifikacije i prebrojavanja stanica, brojnost se preračunava u broj stanica po litri uzorka.



Slika 14. Inverzni mikroskop
(http://www.agr.unizg.hr/cro/nastava/moduli/doc/26280_plankton_bentos.pdf)



Slika 12. Sedimentacijska komora za brojanje po Utermöhl-u (http://www.agr.unizg.hr/cro/nastava/moduli/doc/26280_plankton_bentos.pdf)

Iako bi se trebale prvenstveno proučavati u vlastitom prirodnom staništu, promatranje fine strukture ljušturice dijatomeja zahtjeva prethodnu pripremu uzoraka sakupljenih na terenu. Postoje različite metode čišćenja dijatomeja od organske tvari, posebice kloroplasta u stanicama. Navedene metode se koriste najviše zbog svoje jednostavnosti i pristupačnosti.

Svi uzorci sakupljeni na terenu će uz dijatomeje i dinoflagelate koje želimo proučavati sadržavati još i organski detritus, anorganske komponente sedimenta i antropogena onečišćenja ukoliko je stanište pod takvim utjecajem. Dakako, ukoliko se uzorak ne može obraditi unutar 24 sata, fiksira sa formaldehidom ili Lugolovom otopinom.

Svi koraci čišćenja uzorka je zbog preventivnosti najbolje raditi unutar digestora sa zaštitnim rukavicama i naočalama. Zagrijavanja uzoraka se obavljaju obavezno u epruvetama od Pyrex stakla.

7.1. PRED-TRETMAN UZORAKA

Analiza perifitona može se raditi isto kao i analiza fitoplanktona, ali postoje i druge metode. Da bi kvalitetno promotrili dijatomeje, potrebno ih je najprije oksigenizirati, pa tek nakon tog postupka možemo pristupiti identifikaciji (determinaciji) pod fazno-kontrastnim (Slika 13.) ili elektronskim mikroskopom.

Kako bi se kvalitativno obradile dijatomeje, trebaju se ponajprije odvojiti sa substrata i očistiti od organske tvari da se bolje vidi sama ljušturica. To se najbolje radi sa dodavanjem kloridne kiseline na uzorak, pritom pazeći na reakciju stvaranja CO_2. U uzorak se pažljivo dodaje voda i zagrijava uz oprez od nastalih para. Zagrijavanje traje oko pola sata, a nakon hlađenja uzorka, kiselina se mora odvojiti. Sedimentiranjem uzorka, jednostavno se odvoji supernatant, zatim se opet doda voda i postupak sedimentacije i odvajanja supernatanta ponovi. Brži način sedimentacije je dakako centrifuga, pa se može pribjeći i toj metodi.

Nakon tretiranja kloridnom kiselinom, rješavamo se nepotrebnog sedimenta, ali ne i organske tvari u stanicama mikroalgi. Za takvo čišćenje koriste se različite metode, a najvažnije su: Tretiranje peroksidom, tretiranje sulfatnom kiselinom i tretiranje kombinacijom sulfatne i nitratne kiseline.



Slika 13. Istraživački fazno-kontrastni mikroskop

7.2. TRETIRANJE PEROKSIDOM

Nakon tretiranja kloridnom kiselinom i sedimentiranja uzorka, u uzorak se doda mala količina 30%-tnog vodikovog peroksida. Uzorak se ostavi nekoliko minuta. Ukoliko se reakcija događa burnije, pričekamo više dok se pare ne stabiliziraju. Nakon stabiliziranja uzorka, doda se još 5x volumena vodikovog peroksida. Uzorak se tada pažljivo zagrijava 30 minuta u vodenoj kupelji, ovisno o količini organske tvari može i dulje. Uzorak se nakon toga izvadi iz vodene kupelji i ohladi. Potom se doda vrlo mala količina (na vrh spatule) kalijevog permanganata. Reakcija je vrlo burna, pa dok se smiri doda se još malo dok uzorak ne poprimi narančastu boju. Nakon toga, uzorak se sedimentira i hladi, pa se supernarant odvoji vakuum sisaljkom. Ispire se sa destiliranom vodom i centrifugiranjem barem dva puta.

7.3. TRETIRANJE SULFATNOM KISLINOM

Prednost ove metode je da se ne događaju burne reakcije kao sa vodikovim peroksidom. Nakon tretiranja kloridnom kiselinom, u sedimentiran i ispran uzorak se dodaje sulfatna kiselina do 2x volumena uzorka. Zatim se na vrh spatule doda kalijev permanganat. Uzorak se potom ostavlja 24 sata ili ubrza sa zagrijavanjem na vodenoj kupelji (60 stupnjeva). Čisti uzorak bi trebao biti sivkaste boje, naravno bez tragova sedimenta ili fragmenata makrofita. Uzorak se sedimentira (centrifugira) i ispire sa destiliranom vodom do pH neutralnog.

7.4. TRETIRANJE SULFATNOM I NITRATNOM KISELINOM

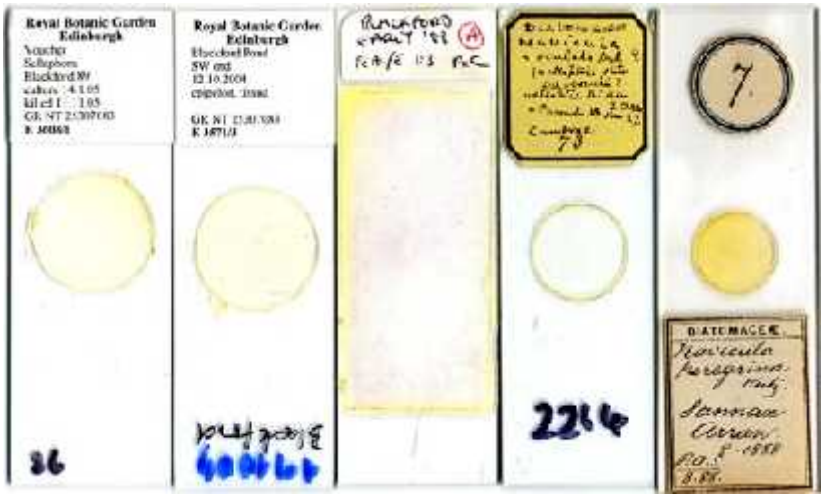
Prije samog dodavanja kiseline, uzorak se ispire od formalndehida sa destiliranom vodom i centrifugiranjem te odvajanjem supernatanta barem dva puta.
U uzorak se dodaje sulfatna i nitratna kiselina u omjeru 1:4 te se zagrijava pažljivo na plameniku dok ne provrije 3-4 puta, odnosno dok se ne obezboji i očisti od vidljivih organskih tvari, sedimenta i fragmenata makrofita. Nakon zagrijavanja se uzorak hladi. Ohlađni uzorak se prebaci u plastične kivete za centrifugu i pažljivo se dodaje destilirana voda. Centrifugira se 10 minuta i nakon centrifuge se vakuum sisaljkom odvaja supernatant. Postupak se ponavlja sve dok pH ne postane neutralan.

7.5. OČUVANJE UZORAKA I IZRADA TRAJNIH PREPARATA

Nakon čišćenja uzoraka perifitonskih dijatomeja, talog se prebaci u manje kivete (Eppendorf) i drži na hladnom do izrade trajnih preparata. Trajni preparati su arhivirani uzorak kojeg je moguće iznova pregledavati i kao takav ima prednost pred pregledavanjem neočišćenog uzorka svjetlosnim mikroskopom. Za lakšu determinaciju zbog svoje izuzetno kompliciranе građe ljušturice, dijatomeje je najbolje promatrati elektroskim mikroskopom. Prema tome, razlikujemo izrade preparata za svjetlosnu i elektronsku mikroskopiju.

7.6. IZRADA TRAJNIH PREPARATA ZA SVJETLOSNU MIKROSKOPIJU

Uzorak iz Eppendorf kivete se resuspendira te se kapalicom prebacuje po kapljica na više pokrovnih stakalaca. Uzorak se raširi preko cijele pokrovnice i pusti preko noći da se osuši. Brži način je sušiti uzorak na laganom plamenu. Nakon što se uzorak osušio, na predmetno stakalce se stavi kapljica Naphraxa i pokrovnica se okrene i pritisne uz kapljicu Naphraxa (smole). Cijela predmetnica se uzme pincetom i pažljivo zagrijava na plameniku u digestoru dok se mjehurići Naphraxa ne izgube iz preparata i dok ne bude homogeno narančast. Zatim se ostavi hladiti i tako ohlađen preparat se promatra pod svjetlosnim mikroskopom (Slika 14.).



Slika 14. Trajni preparati za svjetlosnu mikroskopiju (http://rbg-web2.rbge.org.uk/algae/collections_Edinburgh.html)

7.7. IZRADA PREPARATA ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU

Svježe prikupljeni uzorci se jednostavno mogu nanijeti na aluminijski nosač i prekriti sa zlatom te promatrati pod mikroskopom. Ovaj način izrade preparata pogoduje dinoflagelatima koji prethodno moraju proći seriju dehidracije u različitim koncentracijama alkohola, od manje ka većoj. Uzorak se zatim filtrira kroz filtar "Nucleopor" koji ima oke promjera 0,22 μm. Filtar papir sa osušenim uzorkom se postavlja na traku od ugljika pa na aluminijski nosač, prekrije zlatom i promatra (Slika 15.).

Očišćeni uzorak se nanese pipetom na bakrenu mrežicu nas kojoj se osuši te promatra pod TEM-om.



Slika 15. SEM (http://www.amri.uno.edu/WZhou%20folder/WZhou/ElectronBeamNanolithography.htm)

8. ANALIZA PODATAKA

Na temelju kvantitativnog i kvalitativnog sastava biljnih i životinjskih zajednica određuje se saprobiološko stanje istraživanog dijela vodotoka ili mora, te se na temelju toga određuje stupanj onečišćenja vode. U čistim vodama zajednice organizama su u ravnoteži – postoji odgovarajući broj proizvođača, potrošača i razgrađivača. U zagađenim vodama ta ravnoteža je poremećena i vrijedi Thienemannovo pravilo – što su uvjeti okoliša ekstremniji i dalje od optimalnih uvjeta to je veći broj karakterističnih vrsta.

Saprobnost je kvaliteta vode u odnosu na količinu razgradljive organske tvari i intenziteta razgradnje. Saprobnost karakteriziraju zajednice organizama.

Sastav životne zajednice daje kompleksne informacije o svojstvima okolne vode – planktonske zajednice o otvorenoj vodi, bentoske i litoralne zajednice o uvjetima dna i obalnog područja.

Za izračunavanje saprobnosti vode koristi se Pantle-Buckov indeks saprobnosti (1955.). Najprije se pristupa identifikaciji vrsta, gdje se indikatorski organizmi nastoje identificirati do razine vrste, a ako nije moguće do razine roda ili porodice. Identifikacija i brojčana zastupljenost pojedine vrste (skala 1, 3 i 5) prikazuje se na listi koja sadrži popis nađenih i identificiranih vrsta kao i njihov stupanj saprobnosti, koji je određen prema nekom od indikatorskih sustava. Od indiktorskih sustava, koristi se Wegl, 1983. gdje se za svaku indikatorsku vrstu može naći određen broj bodova koji se koriste za izračunavanje indeksa saprobnosti. Za svaki analizirani uzorak mikrofitobentosa i makrozoobentosa izračuna se indeks saprobnosti (S) prema formuli:

S = indeks saprobnosti $S= \Sigma(sh)/\Sigma h$

s = stupanj saprobnosti

h = zastupljenost

Primjer:

VRSTA	h	s	sh
Achnantes minutissima	1	2,0	2,0
Cymbella ventricosa	3	2,0	6,0
Nitzschia palea	5	2,6	13,0

KLASIFIKACIJA VODA:

Raspon vrijednosti indeksa saprobnosti kreće se od 1 do 4 i interpolira u sustav s 5 klasa boniteta vode (NN br.77/98).

Na osnovi vrijednosti indeksa saprobnosti definira se klasa boniteta vode na određenoj mjernoj postaji:

Tablica 1. Klase kvalitete voda prema vrijednosti indeksa saprobnosti

KLASA KVALITETE VODA	**INDEKS SAPROBNOSTI**	**SAPROBIOLOŠKO OBILJEŽJE ZAJEDNICE**	**OPIS VODENOG BIOTOPA**
I Plave boje	1,0 - < 1,5	oligosaprobnost	neopterećen ili malo opterećen
I-II Zelene boje	1,5 - < 1,8	oligobetamezosaprobnost	vrlo malo opterećen
II Zelene boje	1,8 - < 2,3	betamezosaprobnost	jače opterećen
II-III Žut boje	2,3 - < 2,7	beta-alfamezosaprobnost	kritično opterećen
III Žute boje	2,7 - < 3,2	alfa-mezosaprobnost	jako opterećen
III-IV Crvene boje	3,2 - < 3,5	alfamezos.-polisaprobnost	vrlo jako opterećen
IV Crvene boje	3,5 - < 4,0	polisaprobnost	prekomjerno opterećen

Tablica 2. Interpolacija P-B indeksa saprobnosti u sustav od 5 klasa kvalitete voda:

KLASA KVALITETE VODA	**KLASA**	**INDEKS SAPROBNOSTI (S)**	**OPIS VODENOG BIOTOPA**
I	I + I – II	1,0 - <1,8	neopterećen ili malo opterećen
II	II	1,8 - < 2,3	znatnije opterećen
III	II - III	2,3 - < 2,7	kritično opterećen
IV	III	2,7 - < 3,2	jako opterećen
V	III – IV + IV	3,2 - <4,0	vrlo jako opterećen

9. LITERATURA

Agatz, M., R.M. Rasmus and B. Deventer., 1999: Structural changes in the benthic diatom community along eutrophication gradient on a tidal flat. Helgoland Marine Research. **53**: 92-101.

Anderson, N.J., 1990: Inferring diatom palaeproduction and lake trophic status from fossil diatom assemblages. 11th International Diatom Symposium, 539-547 pp. San Francisco 1990. Otto Koeltz, Koenigstein.

Battarbee, R.W., Mason, J., Renberg, I. And Talling, J.F., 1990: Palaeolimnology and lake acidification. The Royal Society, London.

Battarebee, R.W., Charles, D.F., Dixit, S.S., and Renberg, I., 1999: Diatoms as indicators of surface water acidity. In: Stoermer E.F. i Smol J.P. (eds)) The diatoms: Applications for environmental and earth sciences, 85-127pp. Cambridge University Press, Cambridge.

Bennion, H., Monteith, D. And Appleby, P., 2000: Temporal and geographical variation in lake trophic status in the English Lake District: evidence from (sub) fossil diatoms and aquatic macrophytes. Freshwater Biology. **45**: 394-412.

Burić, Z., Caput, K. and Viličić, D., 2004: Distribution of the diatom Cocconeis scutellum in the karstic estuary (Zrmanja, eartern Adriatic Sea), Biologia, Bratislava. **59**: 17.

Caput, K., Burić, Z., Olujić, G., 2005: Vertical distribution of periphytic diatoms in the karstic Zrmanja River (Croatia), Acta Bot. Croat. **64:** 227–236.

Charles, D.F. and Smol, J.P., 1990: The PIRLA II Project: Regional assessment of lake acidification trends. Verhandlungen/Internationale Vereingung fur theoretische und angewandte Limnologie **24**: 474-480.

Cover, E.C., Harrel, R.C., 1978: Sequences of colonization, diversity, biomass and productivity of macroinvertebrates on artificial substrates in freshwater canal. Hydrobiologia. **59**: 81–95.

Cumming, B.F. i Smol, J.P., 1993: Diatoms and their relationship to salinity and other limnological characteristics from 65 Cariboo/Chilcotin regiaon (British Columbia, Canada) lakes. Hydrobiologia. **269/270**: 179-196.

De Nicola, D.M. and McIntyre, C.D., 1990: Effects of substrate relief on the distribution in laboratory streams. I. Hydrology. Journal of Phycology. **26**: 624-633.

Engstrom D.R., Swain, E.B. and Kingston, J.C.,1985: A pleolimnological record of human disturbance from Harvey's lake, Vermont: Geochemistry, pigments and diatoms. Freshwater Biology **15**: 261-288.

Faimali, M., Garaventa, F., Terlizzi, A., Chiantore, M.C. and Cattaneo-Vietti, R., 2004: The interplay of substrate nature and bioflm formation in regulating Balanus amphitrite Darwin, 1854 larval settlement. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. **306**: 37-50.

Fisher, J. and Dunbar, M.J., 2007: Towards a representative periphytic diatom sample, Hydrol. Earth Syst. Sci. **11:** 399-407.

Flemming, W. D. 1954: Naphrax: a synthetic mounting medium of high refractive index. New and improved methods of preparation. J. Roy.Micros. Soc. **74:** 42.

Fritz, S.C., 1990: Twentieth-century salinity and water-level fluctuations in Devils lake north Dakota: A test of a diatom-based transfer function. Limnology and Oceanography. **35**: 1771-1781.

Goldsborough, L.G. i Robinson, G.G.C., 1996: Pattern in Wetlands. In: *Stevenson, R.J., Bothwell, M.L. i Low,e R.L.* (eds.) Algal Ecology. Freshwater Benthic Ecosystems, 77-117 pp. Academic Press, San Diego.

Hameed, H.A., 2003: The colonization of periphytic diatom species on artificial substrates in the Ashar canal, Basrah, Iraq. Limnologica. **33**: 54-61.

Hamilton, P.B. and Duthie, H.C., 1984: Periphyton colonization of rock surfaces in a boreal forest stream studied by scanning electron microscopy and track in autoradiography. Journal of Phycology. **20**: 525-532.

Hillebrand, H., Worm, B. and Lotze, H.K., 2000: Marine microbenthic community structure regulated by nitrogenloading and grazing pressure. Marine Ecology Progress Series. **204**: 27-38.

Hoagland, K.D., Roemer, S.C. and Rosowski, J.R., 1982: Colonization and community structure of two periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (Bacillariophyceae). American Journal of Botany. **69**: 188-213.

Hoagland, K.D., 1983: Short-term standing crop and diversity of periphytic diatoms in a eutrophic reservoir. Journal of Phycology. **19**: 30-38.

Juggins, S., 1992: Diatoms in the Thames Estuary, England. Ecology, palaeoecology, and salinity transfer function. Bibliotheca Diatomologica **25**. J.Cramer, Berlin.

Korte,V.L. and Blinn, D.W., 1983: Diatom colonization on artificial substrates in pool and riffle zones studied by light and scanning electron microscopy. Journal of Phycology. **19**: 332-341.

Kusakabe, A., 1988: Ecological study on epiphytic algae in Lake Biwa. In L. Biwa Research Institute. Lake Biwa Study Monographs. **4**: 1-61.

Liboriussen, L., 2003: Production, regulation and ecophysiology of periphyton in shallow freshwater lakes. PhD thesis, National Environmental Research Institute. Denmark.

MacIntyre, H.L., Geider, R.J. and Miller, D.C., 1996: Microphytobenthos: the ecological role of the secret garden of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. Estuaries. **19**: 186-201.

Margalef, R., 1983: Limnología. Omega, Barcelona.

Miller, D.C., Geider, R.J. and MacIntyre, H.L., 1996: Microphytobenthos: the ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallov-water marine habitats.II. Role in sediment stability and shallow-water food webs. Estuaries. **19**: 202-212.

Munda, I.M., 2005: Seasonal fouling by diatoms on artificial substrata at different depths near Piran (Gulf of Trieste, Northern Adriatic), ACTA ADRIAT. **46**: 137-157.

Patrick, R., Pavalage, D.M., 1994: The value of species as indicators of water quality. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia. **145**: 55–92.

Pickett-Heaps, J. D., 1998: A rapid, highly efficient method for collecting, fixing and embedding planktonic and other small cells for electron microscopy. J. Phycol **34**: 1088-1089.

Pujadas, R.T., 2005: Ecological analysis of periphytic diatoms in Mediterranean coastal wetlands (Emporda wetlands, NE Spain), ISBN: 978-84-692-3801-1.

Round, F.E., 1981: The ecology of algae. Cambridge: Cambridge University Press.

Round, F.E., 1991: Diatoms in river water-monitoring studies. J. Appl. Phycol. **3**: 129–145.

Simon A. Townsend and Peter A. Gell, 2005: The role of substrate type on benthic diatom assemblages in the Daly and Roper Rivers of the Australian wet/dry tropics. Hydrobiologia **548**: 101–115.

Smol, J.P., Brown, S.R. and McNeely, R.N., 1983: Cultural disturbances and trophic history of a small meromictic lake from central Canada. Hydrobiologia. **103**: 125-130.

Smol, J.P. i Cumming, B.F., 2000: Tracking long-term changes in climate using algal indicators in lake sediments. Journal of Phycology. **36**: 986-1011.

Smol, J.P., Birks, H.J.B. and. Last, W.M., 2002: Tracking environmental change using lake sediments, Volume 3, Terrestrial, algal and siliceous indicators, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Tanaka, S. and Watanabe, T., 1990: The colonization process of a typical epilithic algal community *Homoeothrix janthina-Achnanthes japonica* community in a less polluted river in Japan. JapaneseJournal of Phycology. **38**: 167-177.

Totti, C., Cucchiari, E., De Stefanoo, M., Pennesi, C., Romagnoli, T. and Bavestrello, G., 2007: Seasonal variations of epilithic diatoms on ditterent hard substrates, in the northern Adriatic Sea, J. Mar. Biol. Ass. U.K. **87**: 649-658.

Tuji, A., 2000a: Observation of developmental processes in loosely attached diatom (*Bacillariophyceae*) communities. Phycological Research. **48**: 75-84.

Tuji, A., 2000b: The effect of irradiance on the growth of different forms of freshwater diatoms: implications for succession in attached diatom communities. Journal of Phycology. **36**: 656-661.

Viličić, D., 2003: Fitoplankton u ekološkom sustavu mora. Školska knjiga. Zagreb.

Wegl, R., 1983: Index für die Limnosaprobitat. Wass. Abwass., Wien. **26**: 1-175.

Weilhoefer, C.L. and Pan, Y., 2007: A comparison of diatom assemblages generated by two sampling protocols. J. N. Am. Benthol. Soc. **26**: 308-318.

Weitzel, R.L., 1979: Methods and measurements of periphyton communities: *A review,* ASTM, Baltimore.

Wellnitz,T.A. and Ward,V., 2000: Herbivory and irradiance shape periphytic architecture in a Swiss alpine stream. Limnology and Oceanography. **45**: 64-75.

Wetzel, R.G., 1964: A comparative study of the primary produstivity of higher aquatic plants, periphyton, and phytoplankton in a large, shallow lake. Internationale Revue der Gesamten Hidrobiologie und Hydrographie. **49**: 1-61.

Wetzel, R.G., 2001: Limnology. Lake and River Ecosystems. Academic press, San Diego.

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

http://www.nps.gov/search/index.htm?page=1&query=periphyton+%3Cstrong%3Ealgae%3C/strong%3E

http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy uk.org.uk/mag/artaug06/fs-diatoms.html

http://post.queensu.ca/~pearl/diatom%20prep.pdf

http://www.wrc.org.za/Knowledge%20Hub%20Documents/Research%20Reports/TT281-07.pdf

http://www.agr.unizg.hr/cro/nastava/moduli/doc/26280_plankton_bentos.pdf

10. SAŽETAK

Dijatomeje i dinoflagelati su najbrojniji mikroorganizmi u perifitonskoj zajednici. Budući da svojom primarnom proizvodnjom i raznolikošću utječu na više karike trofičkog lanca, a pri tome i na biodiverzitet, poklanja im se velika pažnja u znanstvenim istraživanjima.

Svaki znanstveni rad na perifitonskim zajednicama počinje na terenu, uzorkovanjem prethodno odabranih substrata na staništima koja su reprezentativna mjesta za analizu područja koje želimo okarakterizirati stupnjem trofije ili biodiverziteta. Uzorkovati se mogu bilo prirodni bilo umjetni substrati koji su u vodi proveli barem 3-5 tjedana. Adekvatno uzimanje uzoraka zahtjeva praćenje protokola za uzorkovanje, uvijek pazeći da uzorak bude dobro označen, a volumen i površina izmjerene. Prilikom laboratorijske obrade koriste se različite metode, ovisno o rezultatima koji se žele istraživanjem dobiti. Za dijatomeje i dinoflagelate najvažnije je dobro obraditi uzorak i napraviti trajnu arhivu kako bi se uzorak mogao detaljnije i dugotrajnije proučavati. Kao bioindikatori, perifitonske zajednice danas postaju centar zanimanja biologa diljem svijeta, te se na njima dolazi do važnih spoznaja ekološkog stanja staništa u čijem je izravnom doticaju i sam čovjek.

11. SUMMARY

Diatoms (*Bacillariophyceae*) and dinoflagellates (*Dinophyceae*) are the most numerous group of periphyton communities. Because it’s primary production and diversity affect multiple trophic links of the chain, and thereby on biodiversity, gives them a great deal of attention in scientific research.

Each research paper on periphyton communities begins in the field, sampling of pre-selected substrate in habitats that are representative of the analysis area that we want to characterize by the trophic state or degree of biodiversity. Sampling can be on either natural or artificial substrates that have been in water for at least 3-5 weeks. Adequate sampling requires monitoring protocols for sampling, always makig sure that the sample is well marked, and the volume and surface area measured. When laboratory analyzes are using different methods, depending on the results of the survey that they want to get. For diatoms and dinoflagelate most well treated sample and make a permanent archive to be able to sample more detailed and longer-term study. As bioindicators, periphyton community has become the focus of interest of biologists around the world, so there you come to important understanding of the ecological condition of habitats in which direct contact is the man himself.