



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET
GEOLOŠKI ODSJEK

Tina Šilović

**STRUKTURA I DINAMIKA
PIKOFITOPLANKTONA JADRANA S
NAGLASKOM NA CIJANOBAKTERIJE
RODA *SYNECHOCOCCUS***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GEOLOGY

Tina Šilović

**COMPOSITION AND DYNAMICS OF
PICOPHYTOPLANKTON IN ADRIATIC SEA
WITH EMPHASIS ON CYANOBACTERIA
GENUS *SYNECHOCOCCUS***

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET
GEOLOŠKI ODSJEK

Tina Šilović

**STRUKTURA I DINAMIKA
PIKOFITOPLANKTONA JADRANA S
NAGLASKOM NA CIJANOBAKTERIJE
RODA *SYNECHOCOCCUS***

DOKTORSKI RAD

Mentori: Dr.sc. Dragica Fuks
Dr.sc. Željko Jakšić

Zagreb, 2012.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za morsku mikrobnu ekologiju, Centra za istraživanje mora Instituta „Ruđer Bošković“, Rovinj pod vodstvom dr.sc Dragice Fuks i dr.sc. Željka Jakšića, te dijelom u Zavodu za istraživanje mora i okoliša, Instituta „Ruđer Bošković“, Zagreb pod vodstvom dr. Marijana Ahela, te dijelom u CSIC, ICM-u („*Consejo Superior de Investigaciones Científicas*“, „Institut de Ciències del Mar“), Barcelona, Španjolska pod vodstvom dr.sc. Carlos Pedrós-Alia.

Doktorski rad je izrađen u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Oceanologije pri Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prikazani rezultati su dio istraživanja: projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH: „Struktura i fiziologija mikrobnih zajednica frontalnih zona sjevernog Jadrana (098-0982705-2729), te 119-1191189-1228 i 119-1193086-3085. Odlazak i rad u laboratoriju u Španjolskoj najvećim je dijelom potpomognut potporom UKF fonda „Jedinstvo uz pomoć znanja“ (ugovor br. 70/10).

Hvala...

.. veliko hvala mojim mentorima dr.sc. Dragici Fuks i dr.sc. Željku Jakšiću na potpori i savjetima prilikom pisanja doktorata

.. čitavom Laboratoriju za morsku mikrobnu ekologiju za sve savjete, pomoć i svo strpljenje koje su mi pružali tijekom pisanja doktorata, a poglavito voditeljici laboratorija dr.sc.

Mirjani Najdek-Dragić

.. dr.sc. Marcelu Veldhuisu na uvodu u svijet protočne citometrije (koji je i dalje čaroban kao prvog dana)

.. dr.sc. Carlosu Pedrós-Aliu na svemu! Njegovo znanje, iskustvo, kao i kreativnost pri rješavanju znanstvenih problema velika su inspiracija u mom radu

.. dr.sc. Damiru Viličiću na omogućenim suradnjama, i terenu na južnom Jadranu, koji je i dalje jedan od meni najdražih i najljepših terena ikad

.. Vanessi Balagúe i Cristini Diéz na pomoći i savjetima prilikom rada u molekularnom laboratoriju u ICM-u. Zaista s vama, PCR je postao prevladiva prepreka!!

.. Tomislavu Radiću za podatke korištene iz zajedničkog rada Radić i sur. (2009)

.. Zrinki na podacima pigmenata za južni Jadran, Hrvoju na podacima geostrofičkih struja na južnom Jadranu, te Sunčici na podacima fitoplanktona u Limskom kanalu, al prije svega hvala vam što ste bili uz mene, kao kolege i kao prijatelji u svakom trenutku kada je trebalo. Razgovori s vama su mi davali snage i inspiracije čitavim trnovitim putem

.. Giti za podatke hranjivih soli, te Jasni, Sandru i Darku za podatke klorofila

.. Dariu, Paolu P., Paolu K. i Jeleni na pomoći na terenima bez obzira na vremenske nepogode. Makar kratki, ti tereni su bili pravo zadovoljstvo.

.. obitelji, prijateljima i Marku na beskonačnom strpljenju i razumijevanju

Mojim roditeljima

SADRŽAJ

SAŽETAK	iv
SUMMARY	v

1. UVOD	1
1.1. Pikofitoplankton.....	1
<i>Synechococcus</i>	2
<i>Prochlorococcus</i>	3
Pikoeukarioti	3
1.2. Metode proučavanja pikofitoplanktona	4
1.2.1. Epifluorescentni mikroskop (EM)	4
1.2.2. Protočna citometrija (PC).....	4
1.2.3. Gel - elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa (engl. „Denaturing gradient gel electrophoresis“-DGGE).....	14
1.3. Dosadašnja istraživanja pikoplanktona u Jadranu	16
1.3.1. Pikofitoplankton u Jadranu	16
1.3.2. Struktura pikoplanktonske zajednice u Jadranu.....	17
1.4. Ciljevi istraživanja	18
2. MATERIJALI I METODE	21
2.1. Karakteristike istraživanog područja	21
2.2. Uzorkovanje	26
2.3. Mjerenje abiotičkih parametara (temperatura, salinitet, hranjive soli, pigmenti)	30
2.3.1. Mjerenje temperature i saliniteta.....	30
2.3.2. Mjerenje koncentracija hranjivih soli	30
2.3.3. Određivanje klorofila <i>a</i> fluorimetrijski	31
2.3.4. Određivanje biomarkera pigmenata zeaksantina i divinil klorofila <i>a</i> (DV Chl <i>a</i>) tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	31
2.4. Mjerenje biotičkih parametara.....	32

2.4.1. Određivanje abundancije heterotrofnih bakterija, piko i nanoplanktona epifluorescentim mikroskopom	32
2.4.2. Određivanje abundancije piko i nanofitoplanktona protočnim citometrom.....	33
2.4.3. Određivanje abundancije nano i mikrofitoplanktona invertnim mikroskopom	38
2.4.4. Određivanje strukture pikoplanktonske zajednice metodom gel – elektroforeze u gradijentu denaturirajućeg agensa.....	39
2.5. Izračunavanje biomase fitoplanktona.....	41
2.6. Statistička obrada podataka.....	41
3. REZULTATI	43
3.1. Eksperimentalni dio	43
3.1.1. Eksperiment- Razrijedivanje fluorescentnih kalibracijskih kuglica	43
3.1.1. Eksperiment-Dodavanje gline	44
3.2. Mjerenja <i>in situ</i>	46
3.2.1. Metodološki dio –	
3.2.1. 1. Usporedba učinka fiksativa na abundancije populacija fitoplanktona s prirodnih lokacija	46
3.2.1. 2. Usporedba fiksiranih i nefiksiranih uzoraka	47
3.2.1. 3. Usporedba abundancija dobivenih epifluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom	49
3.2.2. Sastav pikoplanktona u odnosu na termohalinu cirkulaciju u području albanske granične zone (južni Jadran) u kasno proljeće	51
3.2.3. Raspodjela fitoplanktona u termohalinom gradijentu uz sjevero-istočnu obalu Jadrana (zimski aspekt).....	59
3.2.4. Autotrofne zajednice piko i nanoplanktona u sjevernom Jadranu	63
3.2.5. Sezonska dinamika autotrofne zajednice u Limskom kanalu	70
3.2.6. Sezonske varijacije u strukturi pikoplanktonske zajednice u obalnoj zoni sjevernog Jadrana (postaja RV001).....	82

4. RASPRAVA.....	99
4.1. Metodološki aspekt metode protočne citometrije	99
4.1.1. Eksperimentalni dio –Preciznost mjerena instrumenta.....	99
4.1.2. Usporedba abundancija dobivenih epiflorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom.....	100
4.2. Biomarkeri DV-Chl <i>a</i> i zeaksantin u odnosu na raspodjelu cijanobakterija.....	102
4.3. Prostorna raspodjela pikoplanktona.....	104
4.4. Raspodjela pikoplanktona u kontekstu vremena i prostora	107
4.5. Sezonska raspodjela i struktura pikoplanktona.....	112
4.6. Dinamika cijanobakterija <i>Synechococcus</i> u Jadranu	116
5. ZAKLJUČCI	119
6. LITERATURA	122
7. ŽIVOTOPIS	147
8. POPIS OBJAVLJENIH RADOVA.....	148

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Geološki odsjek

Doktorska Disertacija

STRUKTURA I DINAMIKA PIKOFITOPLANKTONA JADRANA S NAGLASKOM NA CIJANOBakterije RODA *SYNECHOCOCCUS*

Tina Šilović

Centar za istraživanje mora, Rovinj

Kratki sažetak:

Udio pikoplanktona značajno utječe na strukturu i funkciranje planktonske zajednice, kao i na ravnotežu i ciklus ugljika u sustavu. Naime, uslijed nedostatka hranjivih soli pikoplankton postaje najvažniji dio biogeokemijskog ciklusa kruženja elemenata i važna karika hranidbenog lanca. Stoga je karakterizacija pikoplanktonske zajednice ključna u cjelovitom razumijevanju morskog ekosustava. Dosadašnja znanstvena istraživanja pikoplanktona u Jadranskom moru su bila usmjerena k identifikaciji i određivanju abundancije roda *Synechococcus*, pri čemu je karakterizacija eukariotske komponente bila zanemarena. Slijedom navedenog glavni cilj ovog istraživanja je bio pružiti sveobuhvatnu sliku pikofitoplanktonske zajednice Jadrana, te objasniti njenu dinamiku na različitim vremenskim i prostornim skalama u odnosu na fizičke, kemijske i biološke parametre. Ovaj rad daje prve rezultate analize protočne citometrije populacija pikoplanktona sjevernog Jadrana, kao i njihove raznolikosti bazirane na genskoj analizi 16S rRNA. Po prvi puta su u sjevernom Jadranu zabilježene cijanobakterije *Prochlorococcus*, kao i dvije različite vrste cijanobakterija *Synechococcus*. Dominacija cijanobakterija *Synechococcus* u abundanciji i biomasi, kao i strukturi bakterioplanktona gdje su predstavljeni najzastupljeniju svojtu potvrđuje njihovu važnost u planktonskoj zajednici čitavog područja. Pikoeukarioti, iako uglavnom brojčano slabije zastupljeni pokazali su se kao stabilna i važna komponenta fitoplanktonske zajednice Jadrana. Niske abundancije cijanobakterija *Prochlorococcus*, zabilježene u sjevernom i južnom Jadranu ukazale su na njihov mali utjecaj unutar pikofitoplanktonske zajednice, te potvrdile mezotrofnost Jadranu. U južnom Jadranu protočnom citometrijom pronađena su dva ekotipa cijanobakterija, poznate kao „dim“ i „light“, dok su u sjevernom Jadranu genskom analizom definirane dvije različite vrste, jedna jako slična soju *Synechococcus* CC9902, prisutna na površini i u pridnenom sloju, te druga vrsta slična soju *Synechococcus* WH7803, prisutna samo u površinskom sloju. Zaključno, ovaj rad daje potpuniju sliku dinamike pikofitoplanktona Jadrana nego što je bilo zabilježeno do danas. Razumijevanje specifičnih uvjeta pojedinih sustava, kao i tolerancije pojedinih grupa na te dane uvjete poboljšati će generalni koncept utjecaja i kontrole okolišnih faktora na različite skupine fitoplanktonske zajednice.

Doktorska disertacija sadrži: 150 stranica / 53 slike / 7 tablica / 214 literarnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Jadransko more, pikofitoplankton, *Synechococcus*, *Prochlorococcus*, pikoeukarioti

Mentori: dr.sc. Dragica Fuks, viši znanstveni suradnik

dr.sc. Željko Jakšić, viši znanstveni suradnik

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada: prof. dr. sc. Mladen Šolić

prof. dr. sc. Jasna Hrenović

doc. dr. sc. Zrinka Ljubešić

Rad prihvaćen: 9. listopada 2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Geology

Doctoral thesis

COMPOSITION AND DYNAMICS OF PICOPHYTOPLANKTON IN ADRIATIC SEA WITH EMPHASIS ON CYANOBACTERIA GENUS *SYNECHOCOCCUS*

Tina Šilović

Center for marine research, Rovinj

Summary:

Picoplankton has an important influence on the structure and functioning of planktonic communities, as well as on the carbon cycle and balance in the system. Due to the lack of nutrients, picoplankton becomes the most important part of the biogeochemical cycle of circulation of elements and an important part of the food chain. Therefore, characterization of picoplankton is a key item for the deep understanding of marine ecosystems. Previous research of picoplankton in the Adriatic Sea was mainly focused on characterization of the genus *Synechococcus*, while neglecting the eukaryotic component. Therefore, the main objective of this research is to provide a comprehensive picture of the Adriatic picophytoplankton community and to explain its dynamics at different temporal and spatial scales with relation to physical, chemical and biological parameters. This research presents the first results in the north Adriatic of flow cytometry analysis of picophytoplankton, as well as their diversity based on genetic analysis of 16S rRNA. The first recorded occurrences of *Prochlorococcus* in the north Adriatic were obtained, as well as the first appearance of particular *Synechococcus* strains. The dominance of the *Synechococcus* cyanobacteria in abundance and biomass, as well as in the structure of bacterial community, where it presented the most frequent taxon, confirms their utmost importance in the picoplankton community of the whole area. Picoeukaryotes were not that prominent in terms of abundance or biomass, but proved themselves as a stable and important compartment of the Adriatic phytoplankton community. The low abundances of *Prochlorococcus* recorded in the northern and the southern Adriatic indicated their minor importance in the picophytoplankton population and confirmed the mesotrophy of the area. In the southern Adriatic two ecotypes of cyanobacteria were recorded by flow cytometry, known as „dim“ and „light“, while genetic analysis of bacterioplankton in the northern Adriatic defined two different types of *Synechococcus* species, one very similar to the *Synechococcus* CC9902 strain, present in the surface and bottom layers, and another one similar to the *Synechococcus* WH7803 strain, present only in the surface layer. In conclusion, this study gives a more complete estimation of picoplankton dynamics in the Adriatic than it has been offered to date. Understanding system-specific environmental conditions and group tolerances to given conditions will improve our general concept of environmental control over different phytoplankton compartments.

Doctoral thesis contains: 150 pages / 53 figures / 7 tables / 214 references

Original in: croatian

Keywords: Adriatic sea, picophytoplankton, *Synechococcus*, *Prochlorococcus*, picoeukaryotes

Supervisors: dr.sc. Dragica Fuks, higher research associate
dr.sc Željko Jakšić, higher research associate

Reviewers: prof. dr. sc. Mladen Šolić
prof. dr. sc. Jasna Hrenović
doc. dr.sc. Zrinka Ljubešić

PhD thesis accepted: 9th October 2012

1. UVOD

Plankton obuhvaća posebnu životnu formu organizama koji lebde u vodi, a pod pojmom fitoplanktona podrazumijevamo njegovu autotrofnu komponentu. Jednostanični fitoplanktonski organizmi različitih su oblika i veličina te se prema veličini dijele na: piko(fito)plankton ($0,2\text{--}2 \mu\text{m}$), nano(fito)plankton ($2\text{--}20 \mu\text{m}$), te mikro(fito)plankton ($20\text{--}200 \mu\text{m}$). Apsorpcijom sunčeve energije ti autotrofni organizmi u procesu fotosinteze stvaraju ugljikohidrate i kisik. Takvo kumulativno pretvaranje energije svjetla u kemijsku energiju, pohranjenu u obliku organskih spojeva, glavnim je dijelom hranidbenog lanca većine vodenih sustava. Veličinska struktura fitoplanktonske zajednice je glavni biološki faktor koji utječe na funkciranje hranidbenog lanca. Veličina pojedine stanice utječe ne samo na protok energije i materijala kroz hranidbeni lanac, već i na efikasnost samog ekosustava. Dinamika, a i fiziološka aktivnost fitoplanktona ovisi o trofičkom statusu područja. Generalno, veće stanice dominiraju u eutrofnim sustavima, dok manje stanice dominiraju u oligotrofnijim područjima (Agawin i sur., 1998). Koja će populacija prevladavati u pojedinom području ovisi o uvjetima okoliša, kao i o prilagodbama populacija na dane uvjete. Uvjeti u morskom okolišu određeni su fizikalnim (struje, vjetar, temperatura, salinitet) i kemijskim čimbenicima (hranjive soli, metaboliti, itd.). Ovi ekološki čimbenici variraju prostorno i vremenski, a planktonske zajednice im se prilagođavaju na različite načine. Pikofitoplanktonski organizmi zbog svojih malih dimenzija, te veće apsorpcijske površine membrane, bolji su kompetitori u odnosu na veće stanice fitoplanktona, zbog čega su brojniji u uvjetima nižih temperatura i nižih koncentracija hranjivih soli. U oligotrofnim područjima, pikoplankton može činiti i do 92% udjela u ukupnom klorofilu, dok u eutrofnim mogu dominirati tek povremeno (Not i sur. 2008).

1.1. Pikofitoplankton

Sve donedavno prevladavalo je mišljenje da su za najveći dio lokalnih i globalnih promjena u fitoplanktonskoj biomasi i produktivnosti zasluzne velike stanice, dok je učinak pikofitoplanktona smatran pozadinom procesa (Chisholm i sur., 1992a; Maranon i sur., 2001). Međutim, mnoge studije su pokazale značajan doprinos pikofitoplanktona u ukupnoj

fitoplanktonskoj biomasi i primarnoj produkciji (Stockner, 1988; Raven, 1998; Maranon i sur., 2001), zbog čega se pikofitoplankton danas smatra dominantnim dijelom ukupne biomase i produktivnosti oligotrofnih i mezotrofnih oceanskih područja (Guillou i sur., 2001). Osim toga pikofitoplankton značajno sudjeluje u biogeokemijskom kruženju elemenata, te predstavlja vrlo važnu kariku hranidbenog lanca. Stoga su istraživanja distribucije pikofitoplanktona u zadnja dva desetljeća poprilično intenzivirana (Partensky i sur., 1996; Blanchot i sur., 2001; Pan i sur., 2007). Primjenom protočne citometrije, kao i molekularno-bioloških metoda omogućeno je sakupljanje i obrada velike količine podataka o njihovoj broju i taksonomskom sastavu u različitim morskim područjima, čime se sustavno unaprijeđuje naše razumijevanje ekologije pikoplanktona.

Skupinu pikofitoplanktona možemo podijeliti na dva glavna dijela, koji čine cijanobakterije (rodovi *Synechococcus* i *Prochlorococcus*), te različiti rodovi eukariotskih algi (pikoeukarioti).

- *Synechococcus*

Rod cijanobakterija *Synechococcus* je vrlo važna prokariotska komponentna autotrofnog pikoplanktona, prvi put definiran 1979. godine, a obuhvaća kokoidne stanice veličine 0.6-1.6 μm . Glavni fotosintetski pigment im je klorofil *a*, dok im kao pomoćni pigmeneti služe fikobiliproteini (fikocijanin, alofikocijanin, alofikocijanin b, te fikoeritrin) (Stainer i Cohen-Bazire, 1977) i te zeaksantin, koji se koristi kao determinirajući pigment roda *Synechococcus* primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Vrste roda *Synechococcus* prisutne su u gotovo svim oceanskim područjima u koncentracijama od nekoliko desetaka do 10^9 stanica L^{-1} , pri čemu je veća abundancija uočena u eufotičkom sloju, no nalazimo ih uz veliku stopu rasta i u jako oligotrofnim područjima (Partensky i sur., 1999). Raspodjela roda *Synechococcus* istražena je u mnogim morskim sustavima (Jacquet i sur., 1998; Partensky i sur., 1999; Gin i sur., 2003; Worden i sur., 2004; Charles i sur., 2005; Pan i sur., 2006; Fuller i West, 2005), ali utjecaj pojedinih okolišnih čimbenika, koji reguliraju njihovu dinamiku, još nije u potpunosti razjašnjen.

- *Prochlorococcus*

Cijanobakterije roda *Prochlorococcus* otkrivene su kasnih 80-tih primjenom protočne citometrije (Chisholm i sur., 1988; Chisholm i sur., 1992b), a njihovo otkriće promijenilo je sliku raspodjele i dinamike fitoplanktona. Smatraju se jednom od najvažnijih komponenti autotrofnog pikoplanktona svjetskih oceana, zbog čega su dobili ime morskih fotosintetskih prokariota globalnog značenja (Partensky i sur., 1999). Glavni fotosintetski pigmenti su im divinil klorofil *a*, te divinil klorofil *b*, no ne i fikobiliproteini. Nalazimo ih u eufotičkom području od 40° sjeverne do 40° južne geografske širine, na dubinama i preko 200 m gdje je dostupno tek 0,1 % sunčeve svjetlosti.

- Pikoeukarioti

Ova najmanje istražena komponenta pikofitoplanktona prisutna je u koncentracijama između 10^2 - 10^4 stanica L⁻¹ unutar različitih oceanskih regija (Díez i sur., 2001). Iako su pikoeukariotske alge uglavnom prevladane abundancijama prokariota, u mnogim sustavima imaju jako važnu ulogu u sveukupnoj fitoplanktonskoj biomasi. Ovi organizmi su u Jadranu godinama bili u potpunosti podcijenjeni. Razlog tome je najvećim dijelom tehničko-metodološke prirode. Njihova fluorescencija iznimno brzo blijedi ukoliko se uzorci ne mjere neposredno nakon uzorkovanja, čime su vrijednosti njihovih abundancija često bile nepotpune i nepouzdane.

1.2. Metode proučavanja pikofitoplanktona

1.2.1. Epifluorescentna mikroskopija (EM)

Zbog male veličine i nedostatka morfološki prepoznatljivih značajki metodom svjetlosne mikroskopije teško je proučavati pikofitoplanktonske organizme, a taksonomski ih je nemoguće razlikovati (Simon i sur., 1994). Epifluorescentna mikroskopija (EM) je uz primjenu specifičnih bojila, kao što su: 4,6-diamidino-2-fenilindol = DAPI (boja DNA) i primulin (boja flagele) omogućila brojanje i razlikovanje eukariotskih od prokariotskih tipova stanica na osnovu sadržaja pigmenta (Cyanobacteria, Cryptophytes, pikoeukarioti).

Zbog brzo blijedeće fluorescencije pikoeukariota uzorke je nužno obraditi što ranije. Bez obzira na svježinu uzorka, da li zbog subjektivnosti osobe koja mikroskopira ili zbog smanjenja stanice pod utjecajem fiksativa, njihova je abundancija a time i uloga u morskim ekosustavima bila podcijenjena sve do primjene protočne citometrije u proučavanju autotrofnog pikoplanktona početkom 90-tih godina (Simon i sur., 1994).

1.2.2. Protočna citometrija (PC)

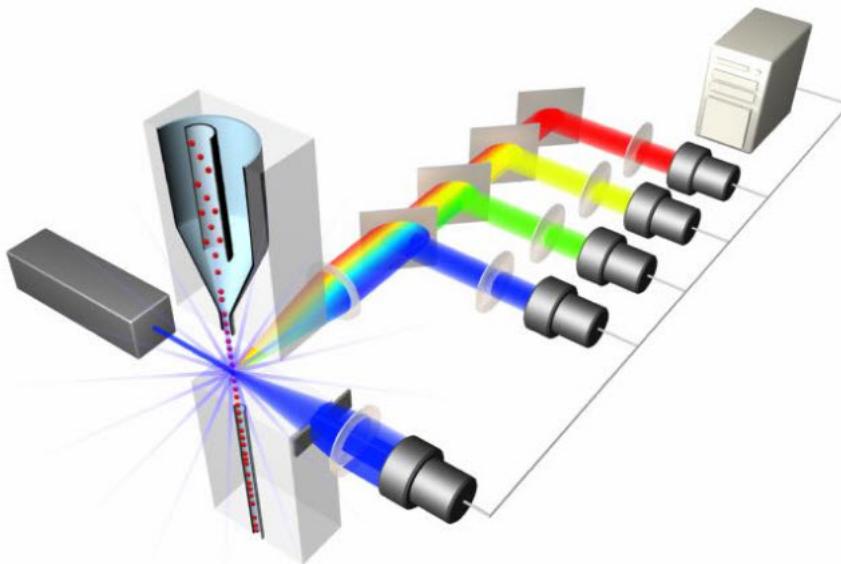
Protočna citometrija (PC) je analitička tehnika koja, na osnovu specifične fluorescencije čestica/stanica pri njihovom neprekidnom prolasku kroz protočnu kivetu, omogućava njihovo kvantitativno i kvalitativno određivanje te izdvajanje iz uzorka, odnosno sortiranje. Zahvaljujući mogućnostima instrumenta da vrlo brzo analizira ne samo abundancije nego i strukturalne te funkcionalne karakteristike svake pojedine stanice, metoda protočne citometrije nalazi široku primjenu i u morskoj mikrobioloskoj ekologiji. Primjenom protočnog citometra u istraživanjima fitoplanktona omogućeno je brže i preciznije razlikovanje autotrofnih populacija, kao i razlikovanje stanica od detritusa i suspendiranih čestica. Osim toga, metoda se pokazala i kao izrazito praktična za proučavanje i najmanjih veličinskih frakcija planktona - pikoplanktona. U usporedbi s konvencionalnom epifluorescentnom mikroskopijom protočna citometrija omogućava znatno brži i detaljniji uvid u strukturu i funkcioniranje planktonskih zajednica (Gasol i Del Giorgio, 2000). Visoka rezolucija protočne citometrije omogućava bolje morfološko razlikovanje različitih populacija, te bolju detekciju malih (i do 0,5 μm veličine) (Rutten i sur., 2005) i slabo fluorescirajućih

organizama, poput cijanobakterija roda *Prochlorococcus* (Shapiro, 2003). Najveća prednost PC-e je brza analiza velikog broja „događaja“ (unutar 1 min može odrediti više desetaka tisuća stanica u uzorku), dajući pritom, za vrlo kratko vrijeme analize, statistički pouzdanije vrijednosti nego EM, gdje se broji tek nekoliko stotina stanica. Primjenom ove metode bitno se izmijenila percepcija o ulozi populacija pikofitoplanktona u kruženju ugljika i hranjivih soli, te njihovog doprinosa i uloge u vremenskoj i prostornoj promjenjivosti biomase (Campbell i sur., 1993) i primarne proizvodnje (Vaulot i sur., 1995; Maranon i sur., 2001). Podaci o raspodjeli pikoeukariota u Jadranu kao dio ovog rada ujedno su i prvi podaci pikoeukariota mjereni metodom protočne citometrije u sjevernom Jadranu. Daljna primjena ove metode u istraživanju Jadrana dati će nam novi i detaljniji uvid u važnost i ulogu pikofitoplanktona unutar planktonske zajednice i čitavog ekosustava.

- Povijest primjene protočne citometrije u morskoj mikrobioloskoj ekologiji

Prvi značajan napredak u automatizaciji određivanja abundancija fitoplanktona omogućen je Coulterovim brojačem (engl. „Coulter Counter“) početkom 70-ih godina prošlog stoljeća (Marie i sur., 2005 i pripadajuće reference). Osnovno ograničenje tadašnjih instrumenata bila je nemogućnost razlučivanja različitih populacija fitoplanktona iste veličine, kao i određivanje stanica manjih od 2 μm . Desetak godina kasnije protočna citometrija je postala primjenjiva i za analizu fitoplanktona iz uzgojenih kultura i prirodnog okoliša (Marie i sur., 2005). Istovremenim mjeranjem više karakteristika svake pojedine čestice, stanice su se mogle razlikovati od organske tvari prisutne u uzorku. Glavna prednost tadašnjih citometara je bila mogućnost analize abundancija stanica velikog raspona veličina, kako onih jako malih, poput pikofitoplanktona, bakterija i virusa, tako i onih većih, do 50 μm veličine, te njihovo međusobno razlikovanje po sadržaju pigmenta. Takva specifična obilježja pikofitoplanktona bilo je vrlo teško, odnosno nemoguće, analizirati tradicionalnim metodama poput epifluorescentne mikroskopije. Upotreba protočne citometrije u morskoj mikrobioloskoj ekologiji i dalje je u razvoju, pa se korištenjem specifičnih fluorescentnih bojila, te primjenom modernih tehnika molekularne biologije saznaje sve više i detaljnije o karakteristikama fitoplanktonskih stanica i njihovom međuodnosu.

- Princip rada protočnog citometra



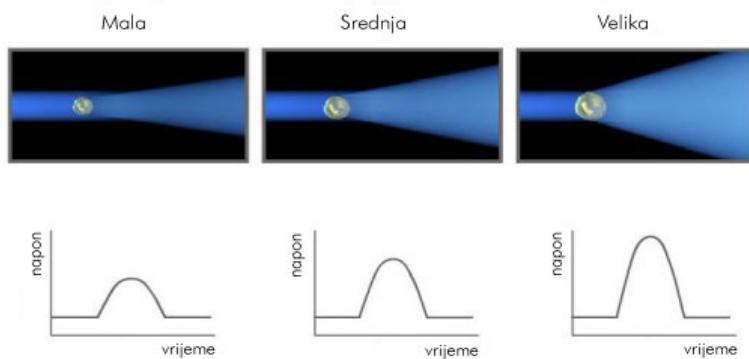
Slika 1.2.2.1. Pojednostavljen prikaz sustava protočne citometrije

(izvor slike: <http://www.invitrogen.com>)

Suspendirani uzorak, najčešće stanica, se u protočnoj kiveti hidrodinamički fokusira protokom fluida nosača (engl. „sheath fluid“) pri čemu se osigurava laminarni tok fluida čijim središtem protiču čestice uzorka što omogućava analizu gotovo svake pojedine čestice zasebno (Slika 1.2.2.1.). Brzina protoka uzorka može se regulirati te na taj način umanjiti stupanj „koincidencije“ (ukoliko su čestice preblizu jedna drugoj prilikom prolaska kroz sustav, instrument ih mjeri kao jednu) te „efekt mrtvog vremena“ (dok mjeri jednu česticu drugu zanemari) koji proporcionalno rastu sa povećanom koncentracijom čestica u uzorku. Tako se u slučaju mjerenja fitoplanktona koristi veći (brži) protok, a u slučaju mjerenja bakterija i virusa, koji se najčešće u uzorcima nalaze u znatno većim koncentracijama, koristi se manji (sporiji) protok samog uzorka.

Neizostavni dijelovi instrumenta su njegovi optički elementi koji uključuju izvore svjetla, te niz filtera i ogledala koji dijele i usmjeravaju emitirano svjetlo. Kao izvor svjetla za pobudu fluorescencije uzorka može se koristiti živina lampa (svjetlost valnih duljina u UV području), laser (engl. „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“) ili tzv. laser dioda koji emitiraju svjetlost specifičnih valnih duljina. Među najčešće korištenim izvorima svjetla u protočnim citometrima je Argon laser. Njegovo specifično zračenje, valne duljine 488

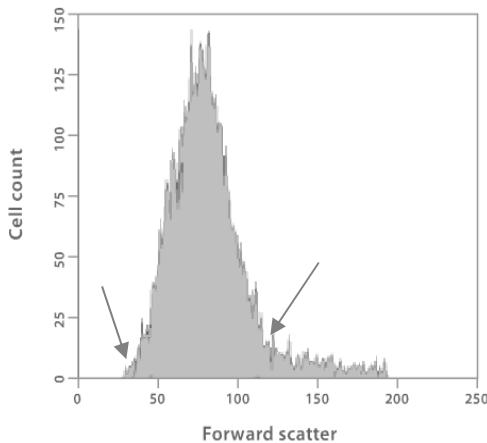
nm, koristi se za obasjavanje čestica koje protiču kroz kivetu te u kontaktu s laserskom zrakom dio te svjetlosti rasipaju u različitim smjerovima, a dio apsorbiraju te ponovno emitiraju svjetlost nižih energija i većih valnih duljina. Dio svjetla koji se blago rasipa (mali kut rasipanja) čini tzv. „forward scatter“ (FSC), te okvirno opisuje veličinu stanice. Veće stanice rasipaju svjetlost nasuprot izvora nešto više od onih manjih. Taj rasap svjetla kvantificira se na fotomultiplikatorima koji konvertiraju intenzitet svjetla u električni napon, pri čemu je magnituda pulsa napona za svaku stanicu proporcionalna njenoj veličini (Slika 1.2.2.2.).



Slika 1.2.2.2. Magnitude pulsa napona nastale rasipanjem svjetla na česticama različite veličine.

Osjetljivost fotomultiplikatora može se regulirati mijenjanjem ulaznog napona čijim se povećanjem povećava i osjetljivost instrumenta i mogućnost detekcije manjih čestica odnosno onih koje slabije fluoresciraju. Pritom treba pripaziti na interpretaciju podataka, jer u takvom slučaju lako može doći do miješanja signala malih stanica ili stanica niskog intenziteta fluorescencije sa signalom „elektronske buke“ instrumenta. Uloga sustava optičkih filtera i zrcala je usmjeravanje emitiranog svjetla, specifičnih raspona valnih duljina, na određene detektore, tako što se na putu zraka emitirane svjetlosti nalaze oni filteri koji izoliraju svjetlo određenih valnih duljina, pa se tako mogu razlikovati signali u zelenom, narančastom i crvenom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja.

Dobiveni signali konvertiraju se u digitalizirane podatke koji se pohranjuju u računalu te naknadno analiziraju. Tako npr. na histogramima koji prikazuju odnos između intenziteta raspršenog svjetla i broja stanica, za manje je stanice svojstven lijevi, a za veće desni dio pika (Slika 1.2.2.3.).



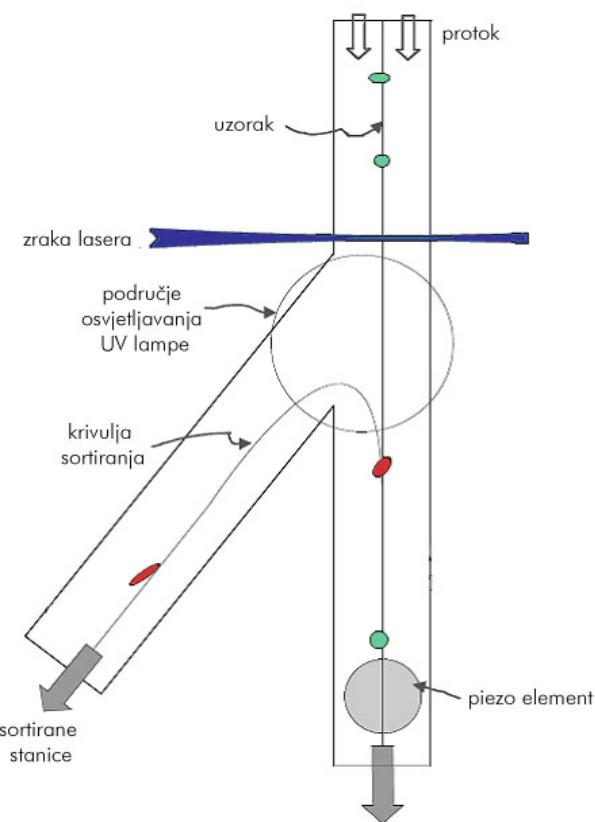
Slika 1.2.2.3. Histogram raspodjele stanica u ovisnosti o intenzitetu raspršenog svjetla nasuprot izvora.

Nadalje, postranično rasipanje svjetlosti posljedica je površinske te unutarnje strukture i granulacije stanice te se onaj dio koji se rasipa pod kutom od 90° od smjera ulaznog svjetla zrake, mjeri i čini tzv. „side scatter“ (SS).

Fluorescencije specifičnih pigmenata ili fluorokromatskih bojila vezanih za pojedine stanične makromolekule detektiraju se dodatnim detektorima fluorescencije (FL) na koje zbog sustava filtera dospijevaju samo „odabrani“ djelovi vidljivog djela spektra (npr. svjetlost zelene, narančaste ili crvene boje), a kojih u protočnom citometru ima nekoliko te su dodatno označeni brojevima (FL1, FL2, FL3 itd.). Jedan od multiplikatora definira se kao glavni „okidač signala“ (eng. „trigger“) koji omogućuje izdvajanje čestice/stanica specifične fluorescencije. Pri analizi populacija fitoplanktona, najčešće se izabiru crveni multiplikatori FL3 ili FL4. FL3 predstavlja crvenu fluorescenciju (uzbuđuje se laserskom linijom od 488nm valne duljine, emitira na 675/20 valnoj duljini), indikativan je za klorofil *a*, dok FL4 se uzbudjuje drugom laserskom linijom (valnom duljinom od 633nm) i indikativan je za fikocijanin (emisija na 660/20) (Reckermann i sur., 2000).

Kombinacijom dvije vrsta signala za pojedinu stanicu (npr. onih koji opisuju veličinu stanica (FS) te intezitet fluorescencije nekog specifičnog pigmenta - oblikuju se dvoparametrijski dijagrami koji dodatno karakteriziraju populacije detektiranih čestica-stanica. Tako se prilikom određivanja fitoplanktona najčešće koriste dvoparametrijski dijagrami sastavljeni od signala dobivenih u narančastom (FL2) i crvenom (FL3) djelu spektra svojstveni za pigment fikoeritin odnosno klorofil *a*.

Sadržaj pigmenta, kao i kompozicija fitoplanktona mijenja se u vodenom stupcu ovisno o svjetlu i hranjivim solima, što se odražava na intezitet fluorescencije stanica. Tako se npr. mogu razlikovati ekotipovi cijanobakterija roda *Synechococcus* nađeni u različitim morskim područjima, kod kojih se na takvim dvoparametrijskim dijagramima uočavaju odvojene skupine stanica. Istovremeno s protokom uzorka, na zaslonu računala dobiveni rezultati intenziteta fluorescencija za svaku od određenih čestica grafički se prikazuju kao histogrami ili dvoparametrijski dijagrami. Promjena brzine protoka uzorka, napona na fotomultiplikatorima i razine signala tzv. „elektronske buke“, utječe na kvalitetu krajnjih rezultata analize. Konačno, moderni protočni citometri omogućavaju i izdvajanje, tj. sortiranje čestica/stanica željenih karakteristika primjenom tzv. piezo-elementa, koji slanjem specifičnog impulsa u smjeru suprotnom od protoka uzorka u točno određenom trenutku preusmjeri detektiranu česticu/stanicu u postraničnu cjevčicu (Slika 1.2.2.4.).



Slika 1.2.2.4. Schematski prikaz sustava za sortiranje.

Primjena protočne citometrije u ekologiji fitoplanktona

Fitoplanktonske stanice veće od 20 μm jednostavno je razlikovati i metodom inverzne mikroskopije, koja nam na osnovu morfoloških razlika među stanicama pruža kvantitativni i kvalitativni (taksonomski) uvid u raznolikost zajednice. Međutim, manje fitoplanktonske stanice (veličine 0,2-2 μm) je moguće tek dijelom kvantitativno odrediti metodom epifluorescentne mikroskopije, tako da je njihova važnost do upotrebe protočne citometrije zbog složenosti određivanja bila podcijenjena. Zahvaljujući analitičkim mogućnostima protočne citometrije te njene sve veće primjene u izučavanju fitoplanktona kao i računalnom analizom velikog broja dobivenih podataka moguće je:

1. Razlikovati i odrediti abundancije različitih populacija fitoplanktonske zajednice pri čemu se brzo i efikasno mogu uočiti toksične vrste, a dugoročnim praćenjem preciznije odrediti trendove u sastavu planktonske zajednice i predvidjeti njihov utjecaj na ekosustav.

2. Odrediti aktivnosti fitoplanktonskih vrsta/populacija, i to:

- određivanjem prisustva pigmenata i njihovih varijacija

Fotosintetski planktonski organizmi osim klorofila posjeduju i druge pigmente po čemu se međusobno razlikuju. *Synechococcus* i *Prochlorococcus* posjeduju pigment zeaksantin, no *Synechococcus* posjeduje i fikoeritrin, koji fluorescira narančasto, te se tako pomoću protočne citometrije može lako detektirati i odvojiti od ostalih. Osim razlika u tipovima pigmenata, postoje razlike i u njegovom staničnom sadržaju na različitim dubinama, a ovisno i o stabilnosti vodenog stupca (raslojen ili izmiješan) (Veldhuis i sur., 2005).

- određivanjem stopa rasta

Stope rasta su za pikoplankton visoke i u uvjetima jako siromašnim hranjivim solima (Kudoh i sur., 1990; Veldhuis i sur., 2005), pri čemu je pikoplankton daleko uspješniji u asimilaciji hranjivih soli nego veće stanice (Irwin i sur., 2006).

- analizom sadržaja DNA tj. praćenjem staničnog ciklusa

Za bolje razumijevanje dinamike fitoplanktona ili mikrobnih populacija nužno je razumijeti dva procesa bitna za razvoj fitoplanktonske stanice, a to su rast stanica i njihova dioba. Ti procesi zajedno čine stanični ciklus, a poznavanje tog procesa,

kao i njegovih mehanizama regulacije iznimno je važno za razumijevanje dinamike fitoplanktona (Binder i Chisholm, 1995). Tako se određivanjem količine sadržaja DNA u svakoj pojedinoj stanici mogu uočiti promjene i zastoji u staničnom ciklusu jedinki date populacije.

3. Odrediti visokospecifične tvorbe i/ili molekule unutar stanica

Korištenje specifičnih fluorokroma koje omogućuju određivanje unutarstaničnog sadržaja, poput toksina kod dinoflagelata, čime se grupe mogu bolje međusobno karakterizirati i razlikovati (Vaulot i sur., 1989).

4. Razvrstavanje stanice

Izdvojiti i razvrstati stanice željenih karakteristika, npr. stanice za daljnju kultivaciju ili molekularnu analizu.

5. Cjelovito analizirati uzgojene kulture fitoplanktonskih populacija

Vijabilnost, stres, respiracija, dijeljenje stanica služe kao pokazatelj njihove aktivnosti, funkcija i procesa u tako uzgojenim kulturama fitoplanktona.

Dakako, uzorci fitopanktona mogu se analizirati protočnom citometrijom i nakon njihove fiksacije, zamrzavanja i čuvanja pri temperaturi od -80 °C. Međutim, neke stanice pokazuju povećanu osjetljivost na fiksaciju i zamrzavanje (Vaulot i sur., 1989), pri čemu, u konačnoj obradi, dolazi do podcijenjivanja njihove abundancije i karakteristika.

- Preciznost analize uzoraka morske vode protočnom citometrijom

Analiza uzoraka morske vode metodom protočne citometrije već duže vrijeme se provodi rutinski. Najbolji rezultati postižu se analizom nefiksiranih uzoraka mjerena direktno na istraživačkom brodu, ukoliko je to nemoguće pohranjivanje uzoraka treba biti pažljivo kako bi se izbjegao gubitak stanica. Točnost i preciznost mjerena uvelike ovisi o osjetljivosti instrumenta i naravno vještini i iskustvu istraživača. Osim toga postoje određeni nedostaci instrumenta na koje treba obratiti pažnju prilikom mjerena. Prije svega treba pripaziti na brzinu protoka stanica/čestica kroz sustav, prebrzi protok stanica može bitno utjecati na

kvalitetu rezultata (Dubelaar, 2000). Nadalje, pri mjerenu stanica prisutnih u niskim koncentracijama (<1000 stanica L^{-1}), što se naročito odnosi na veće stanice ($>60 \mu m$) poput dijatomeja i dinoflagelata, mjerene malog volumena uzorka (1 mL) ne daje sasvim pouzdan rezultat. Osim toga, velike stanice (općenito $>100 \mu m$, no ponekad i one cca. $50 \mu m$) mogu uzrokovati začepljenje protočne kivete zbog čega se preporuča prethodno filtriranje uzorka. Stoga je zbog ispitivanja preciznosti instrumenta u ovom radu proveden niz eksperimenta na protočnom citometru s ciljem boljeg upoznavanja same metodologije, kao i elemenata na koje treba obratiti pažnju prilikom svakodnevnog mjerena uzorka, ili prilikom dizajniranja eksperimenta.

Prava koncentracija stanica je funkcija točnosti i preciznosti mjerena instrumenta (Shapiro, 2003). Veličina pogreške mjerena abundancije protočnom citometrijom ovisi o volumenu uzorka (analizom manjeg volumena uzorka veća je mogućnost podcjenjivanja neke populacije niskih koncentracija), očuvanju uzorka (fiksativi mogu oštetiti stanice, promijeniti njihov oblik i veličinu), te tzv. „efektu mrtvog vremena“, „stupnju koincidencije“, itd.

Preciznost mjerena se može procijeniti koeficijentom varijacije (KV). Za mjerena protočnom citometrijom poželjno je da KV bude ispod 5%, obzirom da većina modernih protočnih citometara može postići KV između 1% i 3% prilikom mjerena fluorescentnih kuglica (Shapiro, 2003). Što je manji KV, vrijednosti imaju homogeniju raspodjelu. Čimbenici koji utječu na KV mogu biti ovisni kako o samom instrumentu, tako i o svakom pojedinom uzorku, a ponekad i jedno i drugo može značajno utjecati na kvalitetu rezultata.

- Utjecaj visokog / niskog broja stanica na učinkovitost brojanja

Veći broj analiziranih stanica u uzorku metodom protočne citometrije dozvoljava statistički značajnije rezultate, što je važno za proučavanje sastava i strukture zajednice. Međutim pri mjerenu uzorka previsoke koncentracije stanica uzorka veća je mogućnost da dvije čestice prođu skupa, te ih instrument detektira kao jednu veliku česticu (Gasol i del Giorgio, 2000). Taj fenomen nazvan „koincidencija“ postaje značajan pri stopi brojanja preko $2,5 \times 10^6$ stanica/mL (Marie i sur., 1996), odnosno protoka od 1000 do 1400 stanica/čestica u sekundi (del Giorgio i sur., 1996; Marie i sur., 1999). Prag „koincidencije“ odgovara maksimalnoj koncentraciji stanica nakon koje broj zabilježenih stanica nije linearan u odnosu

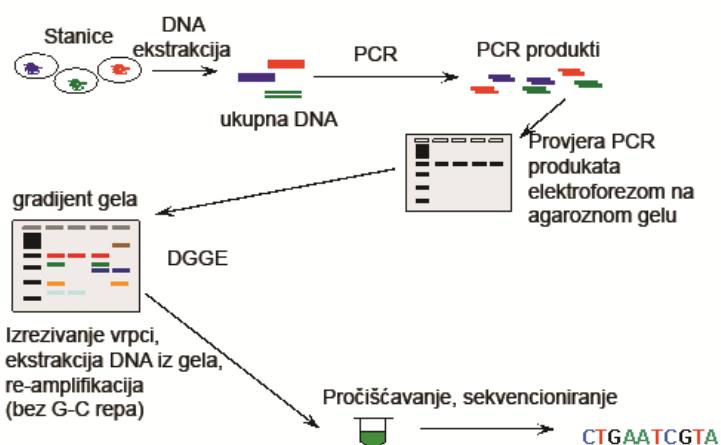
na koncentraciju uzorka (Gasol i del Giorgio, 2000). Da bismo spriječili pojavu „koincidencije“ neophodno je ili smanjiti protok ili razrijediti uzorke prije analize (Gasol i del Giorgio, 2000). Mjerenje uzorka pri velikim protoku, poput 1500 čestica u sekundi, utječe na intenzitet raspršenja i signal fluorescencije, te se stvarna koncentracija čestica može podcijeniti čak i do 70%. Stoga kako bi se osigurala veća pouzdanost mjerenja, protok čestica/stanica morao bi biti manji od 400 stanica čestica/stanica u sekundi (Veldhuis i Kraay, 2000). Pri jako niskim koncentracijama stanica u uzorku potrebno je analizirati veliki volumen uzorka da bi dobili statistički značajan podatak. Minimalno 1000 dogadaja prilikom mjerenja upućuje na KV manji od 10% (Li, 1990). U prirodnim uvjetima ove situacije su moguće prilikom detekcije rijetkih populacija prisutnih u malom broju. Uzorci s niskom koncentracijom stanica zahtjevaju koncentriranje uzorka ili mjerenje uzorka pri visokim stopama protoka, prilikom čega i jedno i drugo vodi k manje kvalitetnim podacima. Osim toga pri mjerenju većeg volumena uzorka postoji i mogućnost taloženja većih stanica u tubici za mjerenje što nam opet daje netočan a time i nepotpun podatak o njihovoj konačnoj koncentraciji u uzorku.

Jedan od načina mjerenja stupnja koincidencije, a time i osjetljivosti instrumenta da detektira čestice/stanice specifičnih dimenzija ili fluorescencija pojedinog instrumenta je serijskim razrijedivanjem fluorescentnih kuglica (Gasol i del Giorgio, 2000) čime oponašamo različite koncentracije uzorka.

1.2.3. Gel - elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa (engl. „Denaturing gradient gel electrophoresis“-DGGE)

U posljednih 20 tak godina razvoj molekularnih metoda omogućio je kvalitetniji uvid u ulogu mikroorganizama u okolišu. Analiza izolirane DNA iz uzorka najčešće uključuje navedeno: (Slika 1.2.3.1.):

- cijepanje DNA pomoću restriktičkih endonukleaza
- amplifikacija DNA lančanom reakcijom polimeraze (engl. „Polymerase Chain Reaction“- PCR)
- gel elektroforeza
- sekvencioniranje DNA



Slika 1.2.3.1. Schematski prikaz DGGE procedure (prilagođeno sa slike, izvor:

http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/index_11.htm)

Velika prednost DGGE metode je brz uvid u predominantane sastavnice šarolike mikrobne zajednice, no manja je niski prag detekcije i reproducibilnost.

DGGE je elektroforetska metoda koja se upotrebljava za prepoznavanje promjena ili izmjena baza u segmentu DNA, a prvi put su je opisali Fischer i Lerman (1983). Dvostruka uzvojnica DNA podvrgнутa je gradijentu denaturirajućih uvjeta u akrilamidnom gelu pri čemu dolazi do razdvajanja DNA fragmenata iste veličine, no različitog sastava. Fragmenti DNA, obično su amplificirani (umnoženi) PCR-om, da bi se dobila dovoljna koncentracija DNA za gel, te isto tako da bi se dobili specifični i jednak veliki dijelovi sekvence. Odvajanje se zasniva na različitoj elektroforetskoj pokretljivosti fragmenata DNA iste molekulske mase u

poliakrilamidnom gelu linearnog gradijenta denaturanata (mješavina uree i formamida). Kada područje s nižom temperaturom taljenja dosegne svoju temperaturu u određenom mjestu u denaturirajućem gelu, događa se prijelaz s heliks oblika DNA u djelomično otopljen oblik i djelomična migracija molekule. Može se smatrati da djelomično ili potpuno razdvojena molekula DNA umjesto dva ima tri ili četiri kraja i zato njena migracija kroz gel zahtijeva složen način gibanja, odnosno njeno je putovanje kroz pore gela sporije (Fischer i Lerman, 1983). Smanjenje mobilnosti u gelu stabilizira molekulu u određenom mjestu koje se ne mijenja ovisno o trajanju elektroforeze. Sekvence citozina i gvanina koje se dodaju na 5' kraju PCR klice (Sheffiled i sur., 1989; Scheffield i sur., 1992) imaju ulogu onemogućiti da se uzvojnica DNA potpuno disocira. Tako se sekvene bogate s AT bazama tope na nižim temperaturama, ili na nižim koncentracijama uree i foramidnog gela u odnosu na molekule bogatije s GC bazama (Fischer i Lerman, 1983). Dakle, različite sekvene se ponašaju drukčije u ovom gradijentu i odvajaju se u ovisnosti o njihovom području denaturacije. Prisutnost razlika u sekvcencama dokazana je krajnjim pozicijama vrpcu istraživanih molekula u gradijentu.

1.3. Dosadašnja istraživanja pikoplanktona u Jadranu

1.3.1. Pikofitoplankton u Jadranu

Priobalna područja, kao izrazito dinamična predstavljaju najzanimljivije zone u kojima se promjene u strukturi i funkcioniranju mikrobne zajednice kao posljedica okolišnog stresa očituju u iznimno kratkom roku. Heterotrofne bakterije su najbrojniji organizmi pikoplanktona, te imaju jako bitnu ulogu u biogeokemijskim ciklusima hranjivih soli u planktonskim hranidbenim mrežama. Utoliko su i istraživanja zajednica heterotrofnih bakterija mnogo intezivnija u odnosu na istraživanja autotrofa ili tzv. pikofitoplanktona (cijanobakterije rodova *Synechococcus* i *Prochlorococcus*, te eukariotske alge). Tako je za područje srednjeg Jadrana najviše objavljenih rezultata istraživanja o heterotrofnim bakterijama u Kaštelskom zaljevu (Šolić i sur., 2009; Šolić i sur., 2010) te u novije vrijeme i na širem području srednjeg Jadrana (Šantić, 2010; Šantić i sur., 2012), dok su za područje sjevernog Jadrana najbolje istražene lokacije ušće rijeke Po, Venecijanski i Tršćanski zaljevi (Fonda Umani i sur., 2007; Pugnetti i sur., 2008; Ivančić i sur., 2010). Istraživanja pikofitoplanktona najvećim su dijelom rađena u sjevernom Jadranu (Vanucci i sur., 1994; Malej i sur., 1995; Revelante i Gilmartin, 1995; Bernardi Aubry i sur., 2006; Pugnetti i sur., 2008; Šilović i sur., 2012a; Šilović i sur., 2012b), te mnogo rjeđe u srednjem (Ninčević-Gladan i sur., 2006; Šantić, 2010; Šantić i sur., 2011) i južnom Jadranu (Šantić, 2010; Šantić i sur., 2011; Šilović i sur., 2011; Batistić i sur., 2012; Cerino i sur., 2012; Gallina i sur., 2012). U nekoliko studija istraženi su utjecaji karakterističnih pojava u okolišu na pikoplanktonske zajednice, npr.: postojanje dubokomorske konvekcije (Vilibić i Šantić, 2008; Batistić i sur., 2012), pojava tzv. "cvjetanja mora" u sjevernom Jadranu (Vanucci, 2003; Fuks i sur., 2005; Totti i sur., 2005) te cvatovi cijanobakterija u tranzicijskim sustavima - lagunama (Sorokin i sur., 2004; Paoli i sur., 2007; Sorokin i Dallochio, 2008). Bitno je naglasiti da je u većini tih studija pikoeukariotska komponenata ostala neistražena. Jedan od razloga podcijenjivanja uloge pikofitoplanktona u sjevernom Jadranu je taj što se to područje smatra jednim od najproduktivnijih zona Mediterana. Povećanoj proizvodnji organske tvari sjevernog Jadrana u odnosu na ostale dijelove Jadranu značajno doprinosi donos hranjivih soli rijekom Po što ujedno i utječe na dinamiku fitoplanktonske zajednice (Degobbis i sur., 2000). Osim rijeke Po vrlo značajan utjecaj imaju i meteorološka kolebanja kao i promjenjiv sustav strujanja u

Jadranu, koji utječe na izmjenu vode sa srednjim Jadranom. Strujanje u sjevernom Jadranu karakterizirano je izmjenom zimske otvorene cirkulacije s ljetnom poluzatvorenom, kada se pojavljuju ciklonalni i anticiklonalni vrtlozi (Orlić i sur., 1992) i istarska obalna protustruja (Supić i sur., 2000). Sjeverozapadni dio Jadrana direktno je pod utjecajem rijeke Po, pa na postajama u tom području nailazimo na veće gradijente abundancija i biomase mikrobne zajednice (Fuks 1995; Fuks i sur., 2005), te npr. abundancije cijanobakterija roda *Synechococcus* dosežu abundancije karakteristične za eutrofna područja (Fuks, 1995). Ipak, varijacije biomase pikofitoplanktona pod utjecajem rijeke Po manje su izražene, nego što je to slučaj kod većih stanica fitoplanktona (Revelante i Gilmartin, 1992). U području sjevernog Jadrana udjeli piko-biomase u ukupnoj fitoplanktonskoj biomasi uglavnom se kreću oko 30% (Vanucci i sur., 1994; Bernardy- Aubry i sur., 2006; Radić i sur, 2009), no povremeno taj udio dosegne i $\leq 60\%$ (Magazzu i Decembrini, 1995; Revelante i Gilmartin, 1995; Šilović i sur., 2012a). Udio pikofitoplanktona u ukupnoj fitoplanktonskoj biomasi srednjeg Jadrana jednolično je raspoređen u vodenom stupcu tijekom godine, osim u zimskom razdoblju kada su zabilježeni veći doprinosi u površinskom sloju (Ninčević-Gladan i sur., 2006). U vrijeme raslojenosti vodenog stupca i povišene temperature mora doprinos pikofitoplanktona ukupnoj fitoplanktonskoj biomasi maksimalan je u području termokline. Uspoređujući obalno i otvoreno more uočeni udio pikoplanktona u ukupnoj fitoplanktonskoj biomasi bio je puno veći na otvorenom moru (31%) nego u priobalnom području (9%; Ninčević-Gladan i sur., 2006), što je manje nego u drugim oligotrofnim područjima u Mediteranu (Magazzu i Decembrini, 1995). Pikofitoplankton voda srednjeg Jadrana najvećim dijelom je sastavljen od cijanobakterija (96%), dok pikoeukarioti čine tek 4% (Ninčević, 2000). Sličan omjer nalaze i Vanucci i suradnici (1994) za sjeverni Jadran (cijanobakterije 91%; pikoeukarioti 9%). Pikoeukarioti, bez obzira na malu abundanciju znaju imati veće biomase od prokariota zbog većeg biovolumena (Bec i sur., 2005), no u slučaju Jadrana gore navedena istraživanja su pokazala da cijanobakterije nadmoćno dominiraju nad pikoeukariotima i brojčano i u biomasi.

1.3.2. Struktura pikoplanktonske zajednice

Korištenjem metoda molekularne biologije u zadnjih nekoliko desetljeća učinjen je veliki napor kako bi se odredila raznolikost zajednica morskih mikroorganizama. Primjena tih

metoda proširila je razumijevanje evolucije, metabolizma i ekologije morskih mikroorganizama (De Long i Karl, 2005). Daljnje izučavanje ekologije mikrobnih zajednica različitih staništa omogućit će preciznije i cjelovitije definiranje mikrobnih i biogeokemijskih procesa u morskim ekosustavima. Istraživanja koja su se bavila izučavanjem prostorne varijabilnosti strukture mikrobne zajednice ukazala su na njihovu visoku stabilnost i nepromjenjivost na širokoj geografskoj skali (Murray i sur., 1998; Schauer i sur., 2000; Yokokawa i sur., 2010; Celussi i sur., 2011). Zbog poteškoća uzorkovanja u otvorenom moru sezonske studije su se uglavnom provodile u priobalnim vodama (Murray i sur., 1996; Murray i sur., 1998; Pinhassi i Hagström, 2000; Schauer i sur., 2000; Schauer i sur., 2003; Kan i sur., 2006; Alonso-Sáez i sur., 2007; Celussi i Cateletto, 2007; Celussi i sur., 2011). Obalne zone su generalno vrlo dinamična sredina i uvelike ovise o perturbacijama u okolišu. Pokazalo se da u različitim dijelovima istog područja različiti čimbenici oblikuju ekosustav i strukturu mikrobne zajednice vrsta i ekoloških perturbacija te mogu uzrokovati različite obrasce njihove raspodjele u prostoru, promatrano na različitim skalama (Jensen, 2010). No uspostavljeni obrasci sastava i strukture mikrobne zajednice obalnih područja ponekad mogu odstupati od trenda zbog heterogenosti i jakog hidrodinamizma često prisutnog u obalnim područjima. Vodeni stupac obalnih područja uglavnom je veći dio godine vertikalno izmiješan, stoga su mnoge sezonske studije obalnih područja uzele u obzir isključivo strukturu mikrobnih zajednica u površinskom sloju (Acinas i sur., 1997; González i Moran, 1997, Murray i sur., 1998; Pinhassi i Hagström, 2000; Schauer i sur., 2000; Schauer i sur., 2003; Kan i sur., 2006; Alonso-Sáez i sur., 2007; Celussi i Cateletto, 2007; Alonso-Gutiérrez i sur., 2009; Celussi i sur., 2008; Celussi i sur., 2011).

1.4. Ciljevi i hipoteze istraživanja

- Ciljevi

1. Primjena i validacija metoda koje bi omogućile rutinsku i sveobuhvatnu procjenu abundancije, raspodjele i raznolikosti pikofitoplanktona pod različitim uvjetima okoliša u Jadranskom moru.

2. Utvrditi i objasniti dinamiku pikofitoplanktona na različitim vremenskim i prostornim skalamama u Jadranskom moru.

- Južni Jadran (albanska granična zona)

Ciljevi: (1) definirati strukturu pikoplanktonske zajednice u oligotrofnom i vrlo dinamičnom okolišu, (2) dobiti uvid u karakteristike pikoplanktona i (3) razjasniti utjecaj levantinske intermedijarne vode (engl. „Levantine Intermediate Water” = LIW) na zajednicu pikoplanktona na granici kontinetalnog šelfa i istočnojadranske struje (engl. „Eastern Adriatic Current” = EAC). Povezivanje promjena fizikalnih parametara s njihovim utjecajem na sastav i izmjenu glavnih komponenti pikoplanktonske populacije pomoći će razumijevanju dinamike hranidbene mreže oligotrofnih i drugih sustava slične dinamike onoj južnog Jadrana.

- Sjeveroistočni Jadran (Paški kanal, Velebitski kanal, estuarij Zrmanje)

Cilj: (1) objasniti utjecaj okolišnih čimbenika na raspodjelu fitoplanktona u Paškom i Velebitskom kanalu te estuariju rijeke Zrmanje tijekom zimskog hidrološkog režima.

- Sjeverni Jadran (Rovinj-Po profil, Limski kanal)

Rovinj-Po profil

Ciljevi: (1) istraživanjem sezonske raspodjele pikoplanktona na postaji ispred Rovinja detaljnije opisati strukturu (sastav i dinamiku) mikrobne zajednice u priobalnim vodama sjeveroistočnog Jadrana, te (2) odrediti relativni utjecaj okolišnih čimbenika na promjenu strukture mikrobne zajednice u vodenom stupcu tijekom perioda raslojenosti i vertikalnog mješanja.

Limski kanal

Ciljevi: (1) opisati sezonske promjene u raspodjeli veličinskih frakcija fitoplanktona, (2) utvrditi relativni doprinos pikofitoplanktona u ukupnom broju i biomasi fitoplanktona, i (3) procijeniti ekološke čimbenike koji kontroliraju raspodijelu fitoplanktona.

- Hipoteze

1. Razlike u raspodjeli pikofitoplanktonske zajednice u pojedinim područjima posljedica su hidrodinamičkih svojstava Jadrana.
2. Raslojenost i vertikalno mješanje vodenog stupca rezultirat će promjenjivom strukturu i distribucijom pikoplanktonske zajednice.

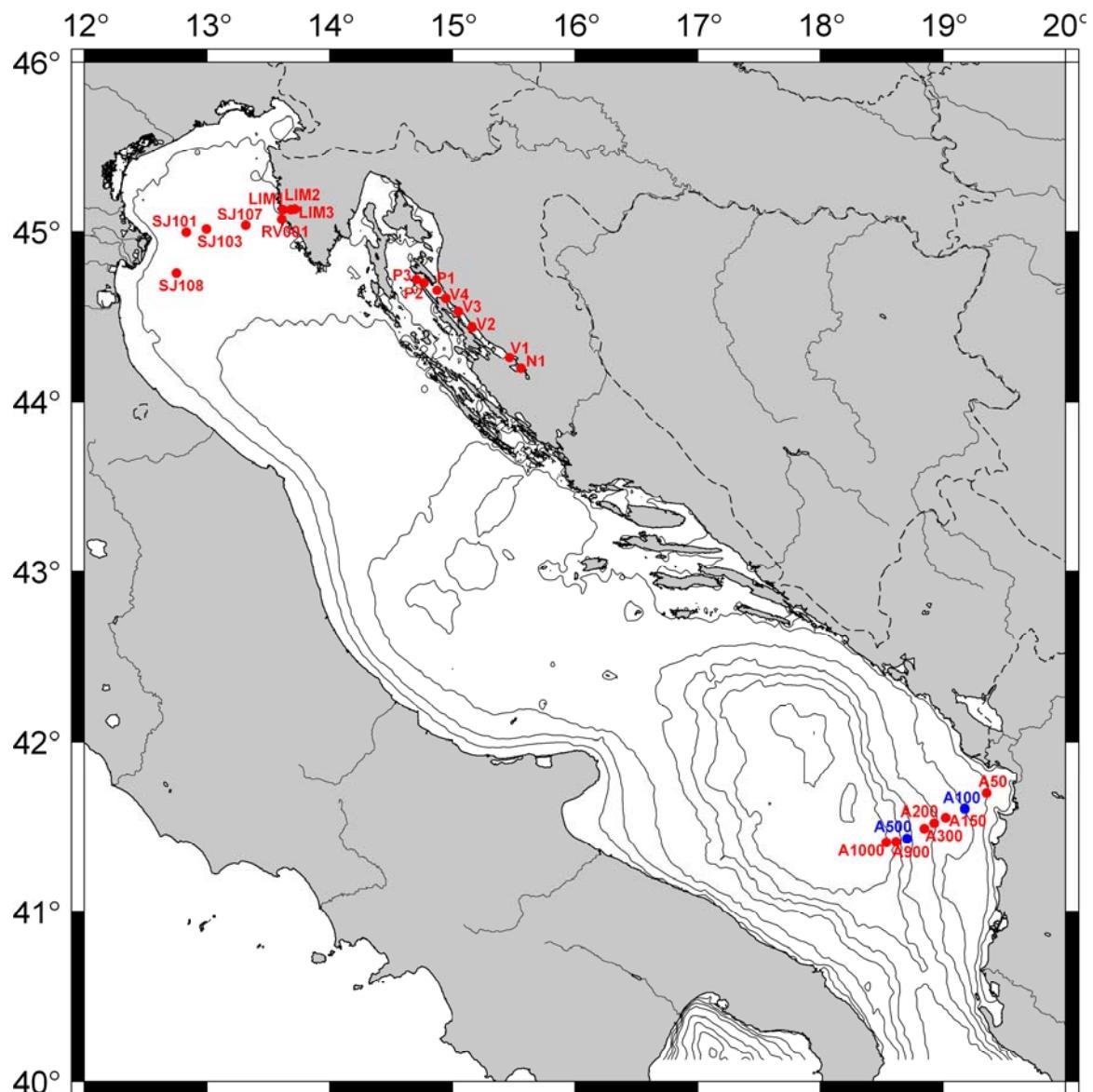
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Karakteristike istraživanog područja

Jadransko more

Jadransko more predstavlja najsjeverniji ogrank Sredozemnog mora, koji se proteže od Otrantskih vrata, gdje se spaja s Jonskim morem, preko sjeverozapadno smještene delte rijeke Po do Trščanskog zaljeva.

Prosječna dubina Jadranskog mora je 252 m, no u području Sjevernog Jadrana rijetko prelazi dubinu od 100 metara (Slika 2.1.1.). Površinska temperatura Jadranskog mora uglavnom se kreće od 22 do 24 °C u ljetnim mjesecima, te od 12 do 14 °C u zimskom razdoblju, dok salinitet varira između 38 i 39. Prevladavajuća struja (EAC) protiče suprotno od smjera kazaljke na satu, od Otrantskih vrata, uz istočnu obalu, te se vraća natrag uz zapadnu, talijansku obalu. Istraživane postaje (Slika 2.1.1.) (Tablica 2.1.1.) su najvećim dijelom obuhvatile sjeverni dio Jadrana zbog iznimne dinamike navedenog područja, kao posljedica utjecaja slatkovodnih dotoka rijeke Po i oligotrofne vode iz južnog Jadrana.



Slika 2.1.1. Prikaz istraživanih postaja u Jadranskom moru
(na postajama A100 i A500 su određene samo termohaline karakteristike)

Tablica 2.1.1. Geografske koordinate i dubine postaja

Postaja	Geografska širina (N)	Geografska dužina (E)	Radna dubina (m)
A50	41° 42'07"	19° 22'04 "	40
A150	41° 34'02"	19° 02'04"	100
A200	41° 32'03 "	18° 56'06 "	180
A300	41° 30'04 "	18° 51'09 "	280
A900	41° 25'07"	18° 38'01 "	300
A1000	41° 25'05 "	18° 33'03 "	300
N1	44° 11'48"	15°33'36"	20
V1	44° 15'42"	15°28'00"	20
V2	44° 26'21"	15°09'39"	60
V3	44°31'43"	15°02'50"	65
V4	44°36'25"	14°56'47"	65
P1	44°39'17"	14°52'34"	75
P2	44°42'03"	14°46'13"	75
P3	44°43'07"	14°42'17"	75
RV001	45°04'48"	13°36'36"	27
SJ107	45° 02'54 "	13°19'00"	35
SJ101	44°59'54 "	12°49'48"	30
SJ103	45° 00'60 "	12°59'36"	31
SJ108	44°45'24 "	12°44'60"	30
LIM1	45°07'55 "	13°37'10"	25
LIM2	45°07'51 "	13°41'10"	30
LIM3	45°08'07"	13°43'00"	18

Južni Jadran (albanska granična zona)

Međusobno djelovanje Jadranskog i Sredozemnog mora ima značajan utjecaj na fizikalna svojstva južnog Jadrana (Gačić i sur., 2001). Za razliku od Sredozemnog mora, Jadransko more je tzv. bazen dilucije, što znači da iz njega otječe relativno svježa voda u Jonsko more, dok pritom u njega ulazi slanija i toplija sredozemna voda. Ova izmjena vode varira, no generalno do istjecanja dolazi u zapadnom dijelu, dok je najveći postotak pritjecanja vode uz istočnu obalu. Najvažnija komponenta pritjecanja sredozemne vode, koja utječe u Jadran je levantinska intermedijarna voda (LIW) iz Jonskog mora i širi se sjeverno srednjim dubinama (Zore-Armanda, 1969). LIW predstavlja dio istočnojadranske struje

(EAC), koja se sastoji od dviju vodenih masa: Jonske površinske vode (engl. „Ionic Surface Water“ - ISW) koja protiče površinom i navedene LIW koja prolazi srednjim dubinama (Poulain i Cushman-Roisin, 2001). U južnom Jadranu, na EAC bitan utjecaj imaju i albanske rijeke koje svojim djelovanjem odmiču strujanje od obale (Zavatarelli i sur., 2002). Novija istraživanja upućuju da, osim zimskog maksimuma EAC-a, koji je pod utjecajem nanosa obalnih rijeka u Jadranskom moru (Poulain i Cushman-Roisin, 2001; Orlić i sur., 2007), postoji i drugi maksimum, koji se može pojaviti u proljeće. Smatra se da je ovaj potonji rezultat različitih zimskih uvjeta na području između Jadranskog i Sredozemnog mora (Orlić i sur., 2007). LIW ima važan utjecaj na čitav vodeni stupac, uglavnom donosom hranjivih tvari. Miješanje vodenog stupca uz posljedično obogaćenje hranjivim tvarima može rezultirati cvjetanjem fitoplanktona ili njegovim nakupljanjem na određenim dubinama (Pingree i sur., 1975; Tett, 1981). Pritjecanje tople i slane levantinske intermedijske vode obično se događa na srednjoj razini, na dubinama između 100 i 600 m, sa središtem u sloju od 200 do 400 m (Orlić i sur., 1992; Raicich, 1996; Socal i sur., 1999). LIW obilježavaju salinitet iznad 38,7 i temperature veće od 14 °C (Civitarese i sur., 1998; Vilibić i Orlić, 2002). Fizikalne perturbacije utječu na stabilnost vodenog stupca i stupanj vertikalnog miješanja što zatim utječe na dotok hranjivih tvari i biološke procese unutar njih.

Sjeveroistočni Jadran (Paški kanal, Velebitski kanal, estuarij Zrmanje)

Istočno područje Jadranskog mora, pa tako i njegova obala smatraju se nisko produktivnim i to najvećim dijelom zbog EAC koja protječe smjerom jug-istok (Gačić i sur., 2001) i krških rijeka koje protječu istočnom obalom (Svensen i sur. 2007; Viličić i sur. 2008). S druge strane, na sjeverozapadnu obalu Jadrana stižu velike količine slatke vode rijekom Po (Raicich 1996, Vollenweider i sur. 1998), koja zapadnom jadranskom strujom (engl. „West Adriatic Current“ = WAC) iz sjevernog Jadrana duž talijanske obale odlazi prema jugu. Sustav Paškog i Velebitskog kanala dug je 50 km, širok 4-14 km i orijentacije SZ-JI. Unutarnji dio Velebitskog kanala proteže se do estuarija rijeke Zrmanje. Rijeka Zrmanja i brojne vrulje donosom hranjivih soli (Viličić i sur., 2008), podupirući sezonski rast fitoplanktona značajno reguliraju hidrografiju ovog područja (Orlić i sur., 2000). Podzemni izvori smješteni duž obale povezani su ponikvama (Bonacci i Roje-Bonacci, 2000,) a postaju aktivni u kišnom periodu (listopad-prosinac), te u doba topljenja snijega (ožujak-svibanj).

(Penzar i sur., 2001). Osim toga, sjeveroistočno obalno područje Jadrana u zimskim mjesecima je pod snažnim utjecajem bure, čija brzina upravo u ovom području dosije najveće vrijednosti zabilježene za čitav Jadran (Makjanić 1976; Dorman i sur. 2006), te značajnom mjerom uvjetuje cirukulaciju čitavog sustava.

Sjeverni Jadran (Rovinj-Po profil/Limski kanal/ postaja RV001)

Sjeverni Jadran dinamično je područje s vrlo promjenjivom cirkulacijom (Mihanović i sur., 2011, uključujući i reference), te pod jakim utjecajem vjetrova, slatkovodnih dotoka rijeke Po i oligotrofne vode iz južnog Jadrana. Snaga protok rijeke Po zajedno s meteorološkim faktorima glavni su čimbenici koji utječu na vertikalno miješanje ili stratifikaciju vodenog stupca (Socal i sur., 2008), čiji vremenski tijek i prostorni raspon pokazuju međugodišnju varijabilnost (Solidoro i sur., 2009). Nadalje, u prisustvu vertikalne stabilnosti i jake bure, voda rijeke Po prateći polu-zatvorenu cirkulaciju u Sjevernom Jadranu može dosegnuti zapadnu obalu Istre (Artegiani i sur., 1997), te tako bitno utjecati na dinamiku mikrobnih populacija.

Limski kanal

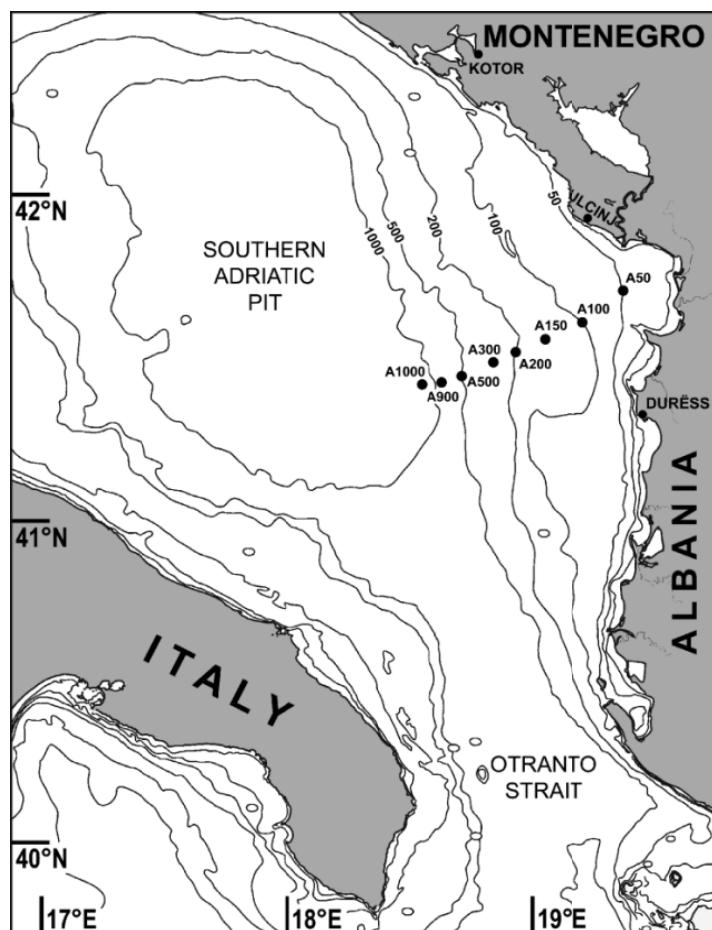
Geomorfološke značajke Limskog kanala, njegova plićina, utjecaji vjetra, plime i epizodni priljevi slatke vode, uz visoku varijabilnost fizikalnih i kemijskih svojstava morske vode, imaju bitan utjecaj na strukturu i biomasu fitoplanktonske zajednice. Unos slatke vode iz podvodnih izvora, potaknutih intezivnim kišama (siječanj-veljača) smanjuje salinitet i donosi hranjive soli u vodenim stupcima. Drugi važan utjecaj na trofičko stanje u Limskom kanalu je priljev oligotrofne vode s otvorenog mora koja dolazi s plimom. Dosadašnja istraživanja u Limskom kanalu uglavnom su bila usmjerena na ekologiju nekih specifičnih fitoplanktonskih skupina (Bosak i sur., 2009; Ljubešić i sur. 2011), utjecaj uzgoja riba na fitoplanktonske zajednice, poglavito „cvjetanja“ toksičnih vrsta, detaljnija veličinska struktura čitave fitoplanktonske zajednice objavljena je tek nedavno (Šilović i sur., 2012a), studijom koja je dijelom ovog rada.

2.1. Uzorkovanje

Uzorkovanja na Rovinj-Po profilu provedena su 2006. godine, dok su sva druga provedena u periodu od 2008. do 2009. godine. Uzorci morske vode prikupljeni su Niskim crpcima (SL).

Južni Jadran (albanska granična zona)

Istraživanje je provedeno u svibnju 2009. brodom „Rozafa 3“ na 75 km dugom profilu (postaje od 50-1000 m dubine) u smjeru SW (230°), počevši od kontinentalnog šelfa - Drini zaljeva, preko njegovog ruba, duž kontinentalne padine. Temperatura i salinitet mjereni su na osam postaja (Slika 2.2.1.) CTD sondom.

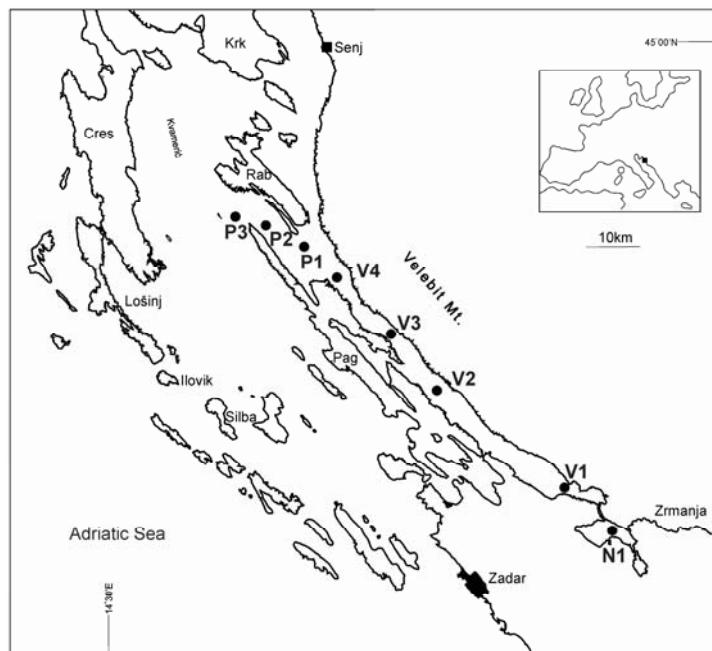


Slika 2.2.1. Postaje u južnom Jadranu.

Hidrografski profili mjereni su između površine i dubine od 380 m (dubina je bila ograničena dostupnošću čelične sajle broda). Uzorci morske vode za mjerjenje abundancije pikoplanktona, biomarkera pigmenata, te hranjivih soli prikupljeni su na šest postaja uzorkovanja, i to na četiri do osam dubina (0, 5, 20, 50, 75, 100, 200 i 300 m), ovisno o dubini postaje (Slika 2.2.1.) (Tablica 2.1.1.). Na osnovu prijašnjih istraživanja gdje su pigmenti fitoplanktona nađeni samo u površinskom sloju morske vode (Totti i sur., 2000; Ninčević i sur., 2002), za određivanje biomarkera pigmenata rutinski su uzeti uzorci morske vode unutar vodenog stupca samo do 100 m dubine .

Sjeverni Jadran (Paški, Velebitski kanal, estuarij Zrmanje)

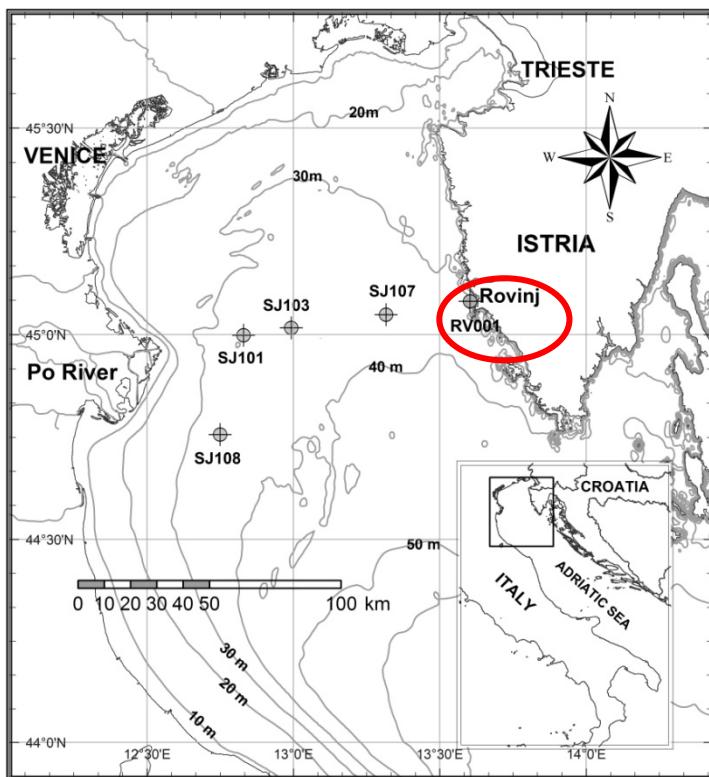
Uzorkovanja su provedena u Paškom (postaje P3, P2, P1) i Velebitskom kanalu (postaje V4, V3, V2, V1) na 4 do 8 dubina (0, 5, 20, 50, 75, 100, 200 i 300 m), te u estuariju rijeke Zrmanje (postaja N1) na 5 dubina (0, 2, 4, 10 i 20 m) u veljači 2008. godine. Postaje su prikazane na Slici 2.2.2, te navedene u Tablici 2.1.1.)



Slika 2.2.2. Postaje u sjeveroistočnom Jadranu.

Sjeverni Jadran (Rovinj-Po profil)

Uzorci su prikupljeni na krstarenjima od lipnja do prosinca 2006. duž tzv. Rovinj – rijeka Po profila, u sjevernom Jadranu (Slika 2.2.3.), na 4 postaje (SJ107, SJ103, SJ101 i SJ108), na tri dubine na svakoj postaji (0 m, 10 m, i 2 m iznad dna) (Tablica 2.1.1.). Oceanografske postaje izabrane su na temelju onih za koje je prethodno utvrđeno da označavaju istočno-zapadni trofički gradijent (Zavatarelli i sur., 1998) u smjeru prema ušću rijeke Po. Dubina dna na profilu varira od 29 m do 37 m, dok je na postajama uzorkovanja od 32 do 37 m.

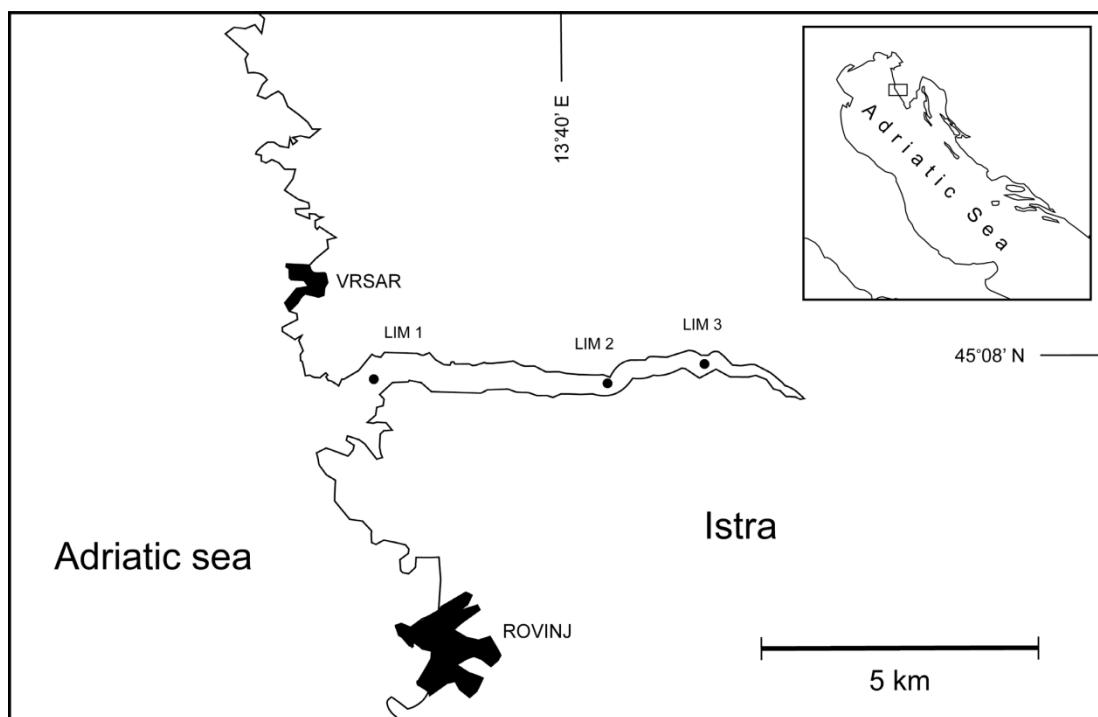


Slika 2.2.3. Rovinj-rijeka Po profil u sjevernom Jadranu.

Limski kanal

Istraživanje je provedeno u Limskom kanalu, 10 km dugom zaljevu koji se nalazi na zapadnom dijelu istarskog poluotoka u periodu od lipnja 2008. do rujna 2009., na tri udaljene postaje (5,3-4,5 km) LIM1, LIM2 i LIM3 (Slika 2.2.4.) (Tablica 2.1.1.). Postaja LIM1 nalazi se na ulazu u Limski kanal, dok se postaja LIM2 nalazi u blizini uzbunjališta riba, koje pruža povećanu razinu hranjivih tvari, što se posebno očituje u periodu stratifikacije (Bosak i sur., 2009). Unutarnji dio Limskog kanala, odnosno postaja LIM3, plitko je područje (dubina od 18 m) pod izrazitim utjecajem slatkovodnih izvora. Uzorci morske vode skupljeni su s tri dubine (0 m, 5 m i 10 m) na svim postajama. Dodatni uzorci su prikupljeni na 2 m iznad dna (dubine: LIM1-30 m; LIM2-25 m, LIM3-16 m).

Replikati za usporedbu fiksiranih i nefiksiranih uzoraka mjereni protočnom citometrijom, te usporedbu abundancije dobivenih epifluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom prikupljeni su u razdoblju od lipnja do studenog 2008. godine.



Slika 2.2.4. Postaje u Limskom kanalu.

Obalna zona sjevernog Jadrana (postaja RV001)

Uzorci morske vode prikupljeni su s 5 dubina (0 m, 5 m, 10 m, 20 m i 27 m) na obalnoj postaji RV001 (Slika 2.2.4.), udaljenoj jednu nautičku milju od istarske obale i grada Rovinja u sjevernom dijelu Jadranskog mora. Uzorci su prikupljeni svaka dva tjedna između rujna 2008. i listopada 2009.

Mjerenje abiotičkih parametara (temperatura, salinitet, hranjive soli, pigmenti)

2.3.1. Mjerenje temperature i saliniteta

Temperatura, salinitet i gustoća (Sigma-T) mjereni su CTD sondom (SeaBird Electronic SBE 25- sjeverni Jadran); (SeaBird Electronic SBE 9 plus- južni Jadran); (SeaBird Electronic SBE 19 plus- Paški i Velebitski kanal, te estuarij Zrmanje).

**Iz podataka temperature i saliniteta određene su relativne geostrofičke struje klasičnom dinamičkom metodom (Gill, 1982.) pomoću podataka temperature i saliniteta prikupljenih na profilu u južnom Jadranu. Struje su izračunate u odnosu na struje na 150 m (dakle, samo u dijelu između A150 i A1000). Ta razina je izabrana kao razina bez pokreta, imajući pri tom na umu da absolutne struje na takvim dubinama još uvijek mogu biti znatno varijabilne, osobito u sinoptičkim (nekoliko dana) i sezonskim (nekoliko mjeseci) vremenskim skalama (Poulain i sur, 1996.; Kovačević i sur., 1999).

2.3.2. Mjerenje koncentracija hranjivih soli

Uzorci morske vode za analizu otopljenih hranjivih soli (nitrati- NO_3^- , nitriti- NO_2^- , amonijak- NH_4^+ ; fosfati- PO_4^{3-} i silikati- SiO_4) držani su zamrznuti na -20 °C u polietilenskim bocama od 500 mL do analize. Koncentracije hranjivih soli u uzorcima su utvrđene standardnim kolorimetrijskim metodama (Parsons i sur, 1984; Ivančić i sur., 1984; Degobbis i sur., 1986; Vollenweider i sur, 1998) Shimadzu UV-1800 spektrofotometrom po povratku u laboratorij. Koncentracije otopljenog anorganskog dušika DIN određene su zbrajanjem vrijednosti nitrata, nitrita i amonijaka ($\text{DIN} = \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$).

2.3.3. Određivanje klorofila *a* (Chl *a*) fluorimetrijski

Uzorci s Rovinj-Po profila i Limskog kanala

Uzorci (0,5 L) za određivanje klorofila *a* nano i mikro frakcije filtrirani su kroz 47 mm Whatman GF/C filtre (promjera pora 1,7 µm), pohranjeni na -20 °C. Svi uzorci su prethodno prefiltrirani su kroz najlonsku mrežicu promjera pora 20 µm. Chl *a* ekstrahiran je s filtera acetonom i u ekstraktu određivan fluorometrijski (Parsons i sur., 1984) primjenom Turner TD-700 fluorimetra.

Uzorci s obalne zone sjevernog Jadrana, postaja RV001

Uzorci za ukupni klorofil *a* (0,5 L), direktno su filtrirani na GF/F filtre bez prefiltracije. Uzorci (0,5 L) za nano frakciju klorofila *a* prefiltrirani su kroz najlonsku mrežicu promjera pora 20 µm, uzorci za piko-frakciju prefiltrirani su kroz 2,0 µm Nucleopore polikarbonatne filtre (promjera 47 mm). Potom su se ti prefiltrirani uzorci filtrirali na 47 mm Whatman GF/F filtre (promjera pora 0,7 µm). Filteri su zamrznuti (-20 °C) i analizirani Turner TD-700 fluorimetrom (Parsons i sur., 1984).

Mikro- frakcija Chl *a* određena je tako da je vrijednost nano- frakcije oduzeta od ukupnog chl *a*, vrijednost piko frakcije je oduzeta od vrijednosti nano frakcije klorofila *a*.

2.3.4. Određivanje biomarkera - pigmenata zeaksantina (*Zea*) i divinil klorofila *a* (DV-chl *a*), tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Biomarkeri, zeaksantin i divinil klorofil *a* mjereni su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti („High-performance liquid chromatography“-HPLC) kako bi se utvrdila prostorna promjenjivost rodova *Synechococcus* i *Prochlorococcus* (Barlow i sur., 1997). Za određivanje pigmenata, 1 L morske vode filtrirano je kroz 25 mm GF/F Whatman filtere, koji su potom smrznuti i pohranjeni u tekućem dušiku na -196 °C. Ekstrakcija je obavljena u 4 mL hladnog 90% acetona sonifikacijom filtera, nakon čega su filtri odvojeni od ekstrakta centrifugiranjem. Identifikacija Pigmenti su identificirani primjenom HPLC-a (Barlow i sur., 1997). Ekstrakti su u omjeru 1:1 v/v mješani s 1M amonijevim acetatom te injektirani u kolonu HPLC sustava (Termo Hypersil column MoS-2, C-8, veličine pora 120 Å, dimenzija kolone: 150 × 4,6 mm; Thermo-Hypersil Keystone). Pigmenti su odvojeni pri protoku od 1

mL min^{-1} pomoću programa linearnog gradijenta tijekom 45 minuta. Otapalo A sastojalo se od metanola i 1M amonijevog acetata u omjeru 70:30 (v/v), dok je otapalo B bilo 100% metanol. Klorofil *a* i karotenoidi detektirani su pri apsorbanciji od 440 nm (Spectra System, Model UV 2000). Primjenom standardnih otopina pojedinih pigmenata načinjene su baždarne krivulje te je interpolacijom podataka za veličinu/površinu/visinu pika pri specifičnom vremenu retencije (uz iste uvjete protoka) odeđena kvalitativno i kvantitativno prisustvo pojedinog pigmenta u uzorku. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinih pigmenata provedena je kalibracijom pomoću standarda autentičnih pigmenata (VKI, Danska).

2.4. Mjerenje biotičkih parametara

2.4.1. Određivanje abundancije heterotrofnih bakterija, piko- nanofitoplanktona epifluorescentnim mikroskopom

Uzorci za analizu epifluorescentnim mikroskopom (20 mL) fiksirani su formaldehidom (2% konačne koncentracije) i pohranjeni na 4°C do analize u laboratoriju. Poduzorak od 2 mL za heterotrofne bakterije obojan je s 4-6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, Sigma, konačna koncentracija $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Nakon 15 minuta bojanja, uzorci su filtrirani kroz crni polikarbonatni filter, koji je zatim postavljen na predmetno stakalce, te su stanice brojane pod UV svjetлом uz povećanjem od 100x na Nikon microphot-SA epifluorescentnim mikroskopom.

Analiza uzoraka za piko- i nanofitoplankton je provedena Leitz Laborlux D epifluorescentim mikroskopom (pod povećanjem od 100x). Za određivanje abundancije cijanobakterija (*Synechococcus* sp.) 15 mL uzorka filtrirano je kroz crne polikarbonatne filtere ($0,4 \mu\text{m}$ veličine pora), te je izbrojano najmanje 300 stanica koje su pri ekscitaciji zelenim svjetлом emitirale narančastu autofluorescenciju (Takahashi i sur., 1985). Abundancije piko- i nanofitoplanktona mjerena je na istom filteru nakon 15 minuta bojanja s Primulinom (250 g L^{-1} u $0,1 \text{ M}$ Tris HCL, pH 4,0) pri ekscitaciji plavim svjetлом. Heterotrofni i autotrofni nanoplankton razlikovao se na osnovu prisutnosti ili odsutnosti klorofila *a* (Caron, 1983).

2.4.2. Određivanje abundancije piko- i nanofitoplanktona protočnim citometrom

- **Eksperiment - Razrijedivanje fluorescentnih kalibracijskih kuglica**

Ovaj eksperiment je napravljen da bi se utvrdila važnost analize dovoljnog broja čestica/stanica za statistički opravdane rezultate. Fluorescentne kalibracijske kuglice korištene u ovom eksperimentu su „Flow cytometer Standardization Fluorospheres (Flow-SetTM Fluorospheres, nominalnog promjera od 3,6 µm). Stock je napravljen od 20 mL ultra čiste vode i 20 kapi originalne otopine fluorescentnih kalibracijskih kuglica. Taj stock je postupno razrijeden 20 puta. Svaki uzorak serijskog razrijedenja analiziran je 5 puta. Uzorci su analizirani korištenjem crvene fluorescencije (FL3).

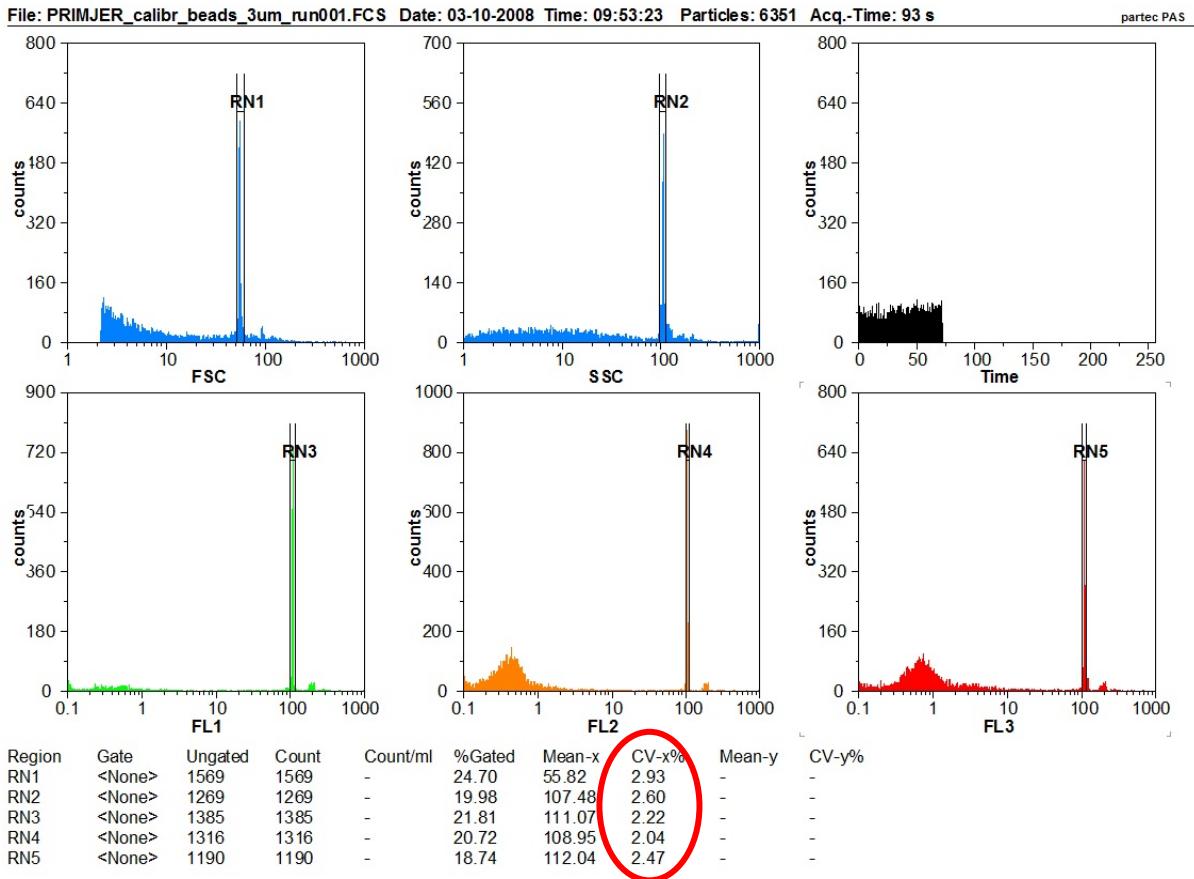
Raspodjela mjerih čestica unutar jednog uzorka općenito se može opisati Poissonovom raspodjelom. Ova raspodjela se još zove i "Zakon rijetkih događaja", što znači da Poissonov zakon utječe na brojanje rijetkih događaja (Shapiro, 2003, Thyssen, 2008). Ako je broj rijetkih događaja prenizak (za postići KV<3%), tada je pogreška brojanja previsoka, zbog čega ne možemo odrediti statistički značajnu razliku između brojeva.

- **Eksperiment-Dodavanje gline**

U ovom eksperimentu uzorak ultra čiste vode je serijski koncentriran dodavanjem čestica gline. Stock otopina je napravljen od 125 mg mješavine Montmorilonita i Kaolina i 25 mL ultra čiste vode. Svaki od 15 mjerena serijski razrijedivanih uzoraka imao je 5 ponavljanja, te je analiziran dva puta s različitim „okidačem signala“ (FL4/FSC). Prilikom korištenja FL4 kao „okidača signala“, mjerene su samo čestice s fluorescencijom, dok su korištenjem FSC „okidača signala“, analizirane sve čestice u uzorku.

- Određivanje ukupne koncentracije stanica fitoplanktona (u uzorcima morske vode ili u kulturama)

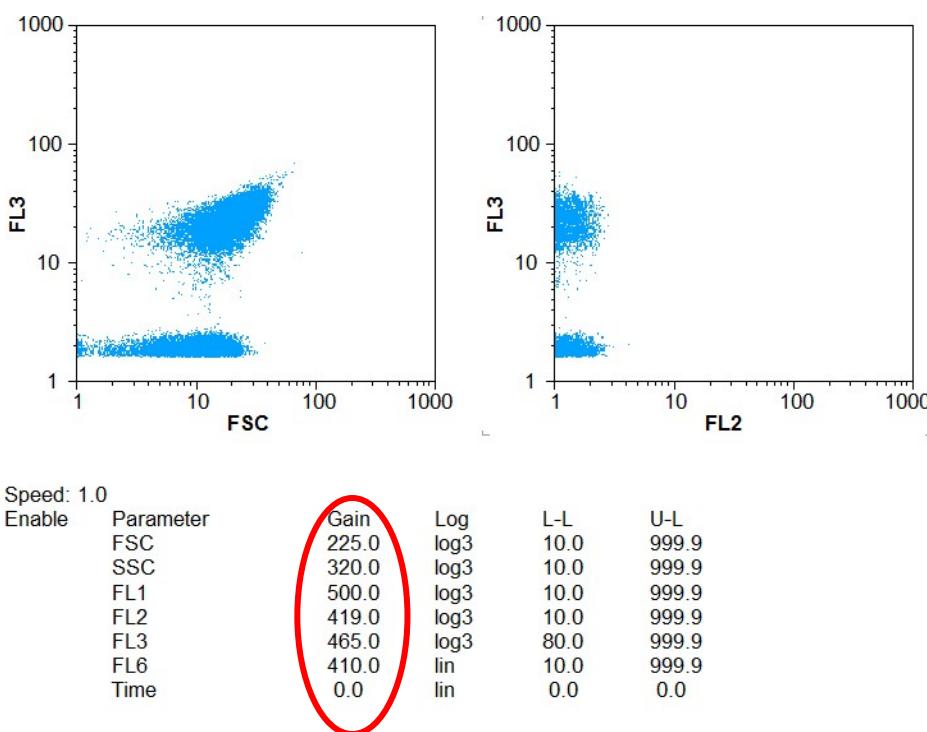
Prije izrade protokola za mjerjenje fitoplanktona potrebno je kalibrirati uređaj. Instrument se kalibrira korištenjem fluorescentnih kalibracijskih kuglica promjera 3 µm (Partec Calibration Beads 3 µm, ref. no 05-4008) (Slika 2.4.2.1.).



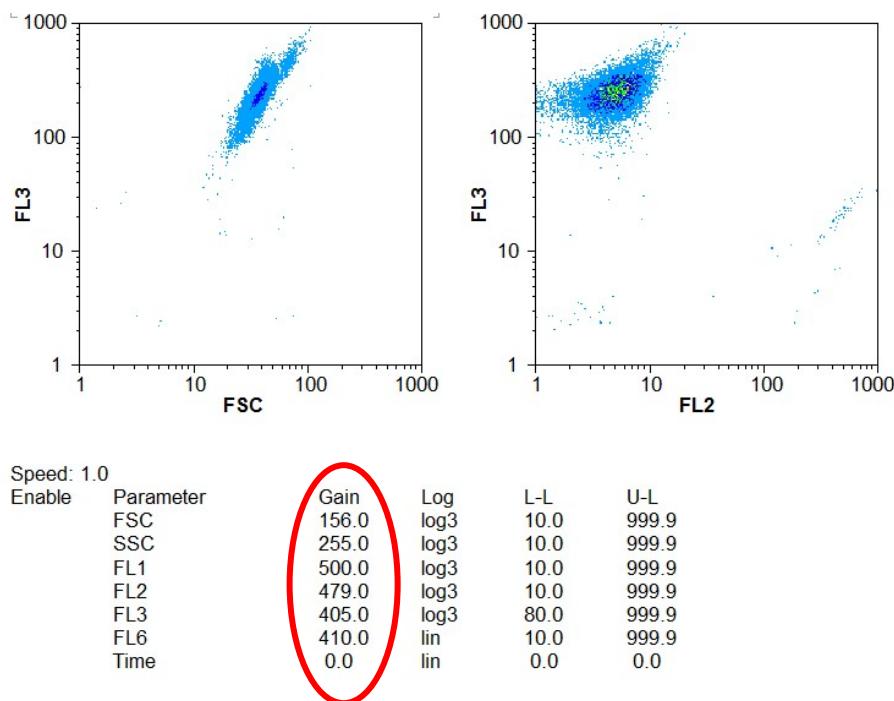
Slika 2.4.2.1. Prikaz dvoparametrijskog dijagrama prilikom kalibracije protočnog citometra 3 µm fluorescentnim kalibracijskim kuglicama (zaokružene crvenim KV vrijednosti pikova svakog pojedinog detektora).

Konačne abundancije svake podskupine vidljive na dijagramima dobivaju se pomoću posebne karakteristike Partecovog instrumenta, koja omogućuje apsolutno volumetrijsko određivanje koncentracije čestica u uzorku. Preciznost mjerena volumena definirano je fiksnim mehaničkim dizajnom, kojim se uklanjuju eventualne pogreške nastale kalibracijom fluorescentnim česticama. Stoga protok Partec PAS II (Münster, Njemačka) protočnog citometra nije neophodno kalibriti prije svakog mjerjenja. Prilikom mjerjenja uzorka neophodno je promatrati jednoparametrijski dijagram koji nam prikazuje protok uzorka kroz fluid, tj. broj čestica koje se detektiraju tijekom analize u jedinici vremena (Slika 2.4.2.1.). Ukoliko dijagram vremena nije linearan znači da je došlo do problema u protoku stanica, te se mora ponoviti mjerjenje.

Obzirom da fitoplankton posjeduje pigmente, populacije razlikujemo na osnovu njihove veličine i autofluorescencije. Optimalno odvajanje populacija fitoplanktona od elektronske buke ostvaruje se na dvoparametrijskim dijagramima gdje FSC i SSC opisuju veličinu i strukturu stanice, a FL3 opisuje crvenu fluorescenciju stanice. Veličinski sastav populacije fitoplanktona se razlikuje unutar različitih geografskih područja, kako vertikalno tako i horizontalno, tako da je za uzorke koji se rade prvi put neophodno prvo provesti referentni uzorak za namještanje detektora u svrhu centriranja populacije u dvoparametrijski dijagram (kombinacije FL3/FL2; FL3/FSC; FL3/SSC). Probni protokol je napravljen mjerenjem koncentracija kultura fitoplanktona (ustupljenih iz Roscoff kolekcije kultura, Francuska) različitih veličina i fluorescencije (*Prochlorococcus* sp., *Synechococcus* sp., *Ostreococcus tauri*, *Micromonas pusilla*, *Emiliania huxleyi*). Karakterizacija kultura je mnogo jednostavnija nego mjerjenje prirodnih uzoraka, obzirom da se u kulturama nalazi jedna populacija istih značajki, za razliku od prirodnog uzorka koji može sadržavati više populacija različitih veličina i različitog inteziteta fluorescencije. Zbog razlika u fluorescenciji i veličini stanica, kulture *Ostreococcus tauri* i *Emiliania huxleyi* daju različite signale formirajući specifičan klaster koji se dovede u centar dvoparametrijskog dijagraama mijenjanjem napona multiplikatora (Slike 2.4.2.2.; 2.4.2.3.)

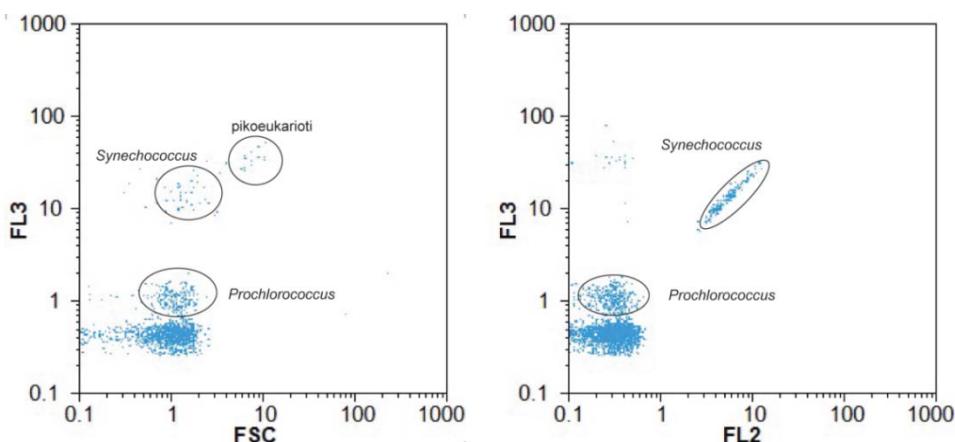


Slika 2.4.2.2. Dvoparametrijski dijagrami kulture *Ostreococcus tauri* mjereni na Partec PAS II protočnom citometru



Slika 2.4.2.3. Dvoparametrijski dijagrami kulture *Emiliania huxleyi* mjereni na Partec PAS II protočnom citometru.

Populacije fitoplanktona, poput cijanobakterija roda *Synechococcus*, osim klorofila *a* posjeduju i pigment fikoeritrin koji obzirom na maksimum emisije pri 575 nm uočavamo i na kombinaciji FL2/FL3. Tako *Synechococcus* možemo vrlo lako razlikovati od roda *Prochlorococcus* ili pikoeukariota (Slika 2.4.2.4.).



Slika 2.4.2.4. Dvoparametrijski dijagram različitih populacija pikofitoplanktona u morskom uzorku.

Usporedba učinka fiksativa na abundancije populacija fitoplanktona

Uzorci (135) za usporedbu učinka fiksativa na abundanciju populacija fitoplanktona prikupljeni su u razdoblju od siječnja 2009. godine do lipnja 2010. godine.

Uzorci morske vode (4mL) za testiranje djelovanja različitih fiksativa na fitoplanktonske zajednice fiksirani su glutaraldehidom (konačne koncentracije 0,1% i 0,5%, odnosno paraformaldehidom (konačna koncentracija 0,2%), te potom analizirani protočnim citometrom.

Usporedba fiksiranih i nefiksiranih uzoraka

Analizirano je 72-78 fiksiranih i nefiksiranih uzoraka sakupljenih na 3 postaje (LIM1, LIM2 i LIM3) na 4-5 dubina u razdoblju lipanj - studeni 2008. godine.

- Priprema uzoraka

Rovinj-Po profil

Uzorci morske vode za mjerjenje abundancija pikofitoplanktona protočnim citometrom uzorkovani na Rovinj-Po profilu obrađeni su nefiksirani, neposredno nakon uzorkovanja.

Velebit-Pag-Zrmanja profil/profil južni Jadran / Limski kanal/ postaja RV001

Uzorci moske vode (4 mL) fiksirani su dodatkom glutaraldehyda (do konačne koncentracije 0,5 %) i ostavljeni 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom su smrznuti u tekućem dušiku, te po povratku u laboratorij pohranjeni su na -80 °C do analize, koja je provedena unutar 15 dana.

- Mjerjenje prirodnih uzoraka

Uzorci su analizirani unutar 10 dana od uzorkovanja pomoću protočnog citometra (Partec PAS II, Münster, Njemačka) opremljenog Argon laserom (488 nm). Mehaničke postavke instrumenta standardizirane su za sve parametre svaki dan pomoću fluorescentnih kalibracijskih kuglica (promjera 1, 3 i 10 µm). Podaci su prikupljeni u datoteci putem FL3

kao parametra „okidača signala“, te obrađeni FloMax softverom (Partec, Njemačka). Različite subpopulacije fitoplanktona detektirane su na osnovu različite autofluorescencije klorofila (FL3) i fikoeritrina (FL2), sadržanog u stanicama; kao i njihove veličine (FSC), određene na osnovu kuta kojim se svjetlo raspršuje od stanice. Ti karakteristični signali autofluorescencije omogućili su nam razlikovanje populacija cijanobakterija *Synechococcus*, pikoeukariota i nanoeukariota.

2.4.3. Određivanje abundancije nano i mikrofitoplanktona invertnim mikroskopom

Za određivanje abundancije nano i mikrofitoplanktona invertnim mikroskopom korišten je Carl Zeiss Axiovert 200 opremljen faznim kontrastom i svjetlom. 150 mL uzorka morske vode fiksirano je formaldehidom (2% konačne koncentracije, puferirano dinatrij tetraboratom - boraksom), od čega je nakon 24 sata sedimentacije za analizu korišteno 50 mL poduzorka (Lund i sur. 1958, Utermöhl, 1958). Za određivanje nanoplanktona i iznimno brojnog mikroplankton pretražen je jedan profil uzduž dna komorice pri povećanju od 400x, a dva profila pri povećanju od 200x. Za identifikaciju svih vrsta većih od 30 μm pretraživano je čitavo dno komorice pri povećanju od 100x. Minimalna koncentracija koja se može detektirati ovom metodom je 20 stanica L^{-1} . Identifikacija određenih vrsta potvrđena je i pri povećanju od 1000x. Mikroalge koje se nisu mogle identificirati do razine vrste ili roda dodijeljene su generalnim grupama: criptofitima, kokolitoforidima, prazinoficejama ili drugim fototorofnim nanoflagelatima. Veličinske klase nano- ($5\text{-}20 \mu\text{m}$), i mikrofitoplanktona ($>20 \mu\text{m}$) utvrđene su nakon mjerjenja maksimalne linearne dimenzije stanica.

2.4.4. Određivanje strukture pikoplanktonske zajednice metodom gel – elektroforeze u gradijentu denaturirajućeg agensa (DGGE)

Za DGGE analizu 5 L morske vode prikupljano je jednom mjesечно s površine (0m) i iz pridnenog sloja (27m) s postaje RV001 u periodu od rujna 2008. Do listopada 2009. Uzorci su najprije filtrirani kroz filtre veličine pora 3 μm (Nucleopore PC), potom je dobiveni filtrat ponovno filtriran kroz filtre veličine pora 0,2 μm (Nucleopore PC) uz vakuum od 150 mm Hg. 0,2 um filteri su spremljeni su u krio-tubice u koje je dodano 1,8 mL lizirajućeg pufera (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0,75 M saharoze), te pohranjeni na -80 °C do analize u laboratoriju.

DNA ekstrakcija (izolacija DNA)

DNA je izolirana metodom po Boström-u i sur., (2004). Ukratko, stanice su tretirane lizozimom, proteinazom K i natrij dodecil sulfatom, potom je uslijedila ekstrakcija fenol-kloroform-izoamil alkoholom. Izlučena DNA je desalizirana, te tretirana s koncentriranim etanolom i 5 M natrij acetatom. Dobiveni pelet DNA razrijeđena je u 50 μL za MQ vode, te spremljen na -80 °C.

Lančana reakcija polimeraze (PCR) i gel elektroforeza u gelu denaturirajućeg agensa (DGGE)

Fragment gena 16S rRNA (dug oko 550 parova baza) je umnožen korištenjem specifične bakterijske početnice GC358f koja je komplementarna pozicijama 341 - 358 (numerirane od *Escherichia coli*), te ima GC rep, i univerzalne početnice 907rm koja je komplementarna pozicijama 927 - 907. Reakcijske smjese volumena 50 μl sadržavale su: 20 ng predloška (izolirane DNA), 200 μM dNTP, standardni 1x PCR pufer, 2 mM MgCl₂, 0,25 μM svake početnice, albumin goveđeg seruma (0,15 – 0,30 $\mu\text{g} / \text{mL}$), te 1,25 U Taq polimeraze (Invitrogen). Nakon početne denaturacije (5 min na 94 °C), uzorci DNA su najprije umnažani kroz 10 tzv. "touchdown" ciklusa, koji se sastoje od denaturacije (1 min na 94 °C), sparivanja (1 min na 65 do 56 °C [pri čemu se temperatura sa svakim slijedećim ciklusom snižava za 1 °C, te u posljednjem, desetom ciklusu iznosi 56 °C]), i produženja

lanca (3 min pri 72 °C). Nakon toga je uslijedilo 20 standardnih ciklusa: denaturacija (1 min na 94 °C), sparivanje (1 min na 55 °C), i produženje (3 min pri 72 °C), te završno produženje (7 min na 72 °C) nakon zadnjeg ciklusa. PCR produkti su kvantificirani gel elektroforezom uz primjenu standarda molekulskih težina (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen). Ukupno 800 ng PCR produkta svakog pojedinog uzorka aplicirano je (u jažice) 6%-tnog poliakrilamidnog gela denaturirajućeg gradijenta od 40 do 80% (gdje je 100% definirano kao 7 M ureea i 40% deionizirani formamid). Elektroforeza je provedena sustavom DGGE-2000 (CBS Scientific Company) tijekom 16 sati pri 100 V i 60 °C u TAE puferu pH 7,4 (40 mM Tris, 20 mM natrij acetat, 1 mM EDTA). Gel je bojan 20 minuta bojom za nukleinske kiseline SYBR Gold Safe (Molecular Probes), te ispran u TAE puferu. Gelovi su slikani Bio-Rad digitalnom kamerom, te potom obrađene korištenjem računalnog programa Quantity One ChemiDoc., koji prepoznaje (identificira) i kvantizira elektroforezom nastale/razvijene vrpcer. Budući da profil idealne vrpce odgovara obliku Gaussove krivulje, Gaussov model se može podesiti za profil, a zatim kvantificirati iz područja pod Gaussovom krivuljom. Analizom fotografija gelova računalni program stvara matrice podataka, u kojima je obilježeno postojanje i intenzitet pojedinih vrpcu na različitim udaljenostima od mjesta nanošenja svakog pojedinog uzorka. Podaci su transformirani arcsin funkcijom, a dana matrica se koristila za daljnju statističku analizu.

Sekvencioniranje DGGE vrpcu

Karakteristične (jačeg inteziteta) vrpcu PCR produkata izrezane su iz poliakrilamidnog gela pomoću sterilnog žileta i prenesene u mikrotubice s 20 µL ultra čiste vode i ostavljene preko noći na 4 °C, nakon čega je uslijedio ciklus smrzavanje/odmrzavanje. Nakon odmrzavanja 3 µL izlučene DNA iskorišteno je za reamplifikaciju s originalnim setom početnica (385f i 907r). 10 do 20 ng PCR produkta poslano je na komercijalno sekvencioniranje (Macrogen, Nizozemska). S ciljem određivanja sličnosti u primarnoj strukturi (sekvenci, slijedu nukleozida), a time i njihove taksonomske pripadnosti, dobivene sekvence uspoređene su sa sekvencama pohranjima u „GenBank” javnoj bazi podataka korištenjem BLAST algoritma (BLAST = “Basic Local Alignment Search Tool”).

2.5. Izračunavanje biomase fitoplanktona

Rovinj-Po profil

Da bi definirali doprinos pikofitoplanktona ukupnoj biomasi fitoplanktona u ekosustavu analizirane skupine preračunavane su u jedinice ugljika (gL^{-1}) korištenjem pretvorbenih faktora, i to: 60 fg C^{-1} po stanici za *Prochlorococcus*, te 200 fg C^{-1} po stanici za *Synechococcus* (Charpy i Blanchot, 1998) i $1500 \text{ fg C stanica}^{-1}$ za pikoeukariote (Zubkov i sur., 1998). Veličina stanice nanofitoplanktona mjerena je epifluorescentnim mikroskopom. Biovolumeni su izračunati korištenjem formule za volumen sfere, te zatim pretvoreni u jedinice ugljika koristeći faktor $0,22 \text{ pg C } \mu\text{m}^{-3}$ (Booth, 1993). Dobivene vrijednosti ukupnog Chl *a* za podatak sveukupne biomase fitoplanktona pretvorene su u jedinice ugljika koristeći opće pravilo pri kojem omjer C:Chl *a* iznosi 50 (Antia i sur., 1963).

Limski kanal

Analizirane populacije pikofitoplanktona Limskog kanala pretvorene su u jedinice ugljika (gL^{-1}) korištenjem identičnih pretvorbenih faktora korištenih za pikofitoplankton Rovinj-Po profila. Uzorci nanofitoplanktona (i mikrofitoplanktona) brojni su inverznim mikroskopom, njihovi biovolumeni izračunati su tako što je oblik stanice dodijeljen geometrijskim tijelima, nakon čega su na njima primjenjene standardne formule (Hillebrand i sur., 1999). Sadržaj ugljika fitoplanktona izračunat je iz srednje vrijednosti biovolumena stanica (Menden-Deuer i Lessard, 2000).

2.7. Statistička obrada podataka

Statistička analiza provedena je pomoću statističkog paketa SYSTAT 10.2. Prije statističke analize podaci abundancija logaritamski su transformirani [$\log_{10}(x + 1)$] kako bi dobili normalne distribucije. Za određivanje korelacije između abundancije populacija i ekoloških parametara korišteni su standardni parametarski testovi (analiza varijance-ANOVA, Pearson korelacije). Odnosi s $p < 0,05$ su definirani kao statistički značajni.

Za analizu odnosa sastavnica mikrobne zajednice matrica dobivena iz inteziteta pojedinih vrpc i DGGE gela korištena je za MDS (engl. „Multidimensional scaling“) i analizu glavnih sastavnica (engl. „Principal component analysis“-PCA), te klaster analizu upotrebom statističkog paketa Primer 6 (Clarke i Gorley, 2006).

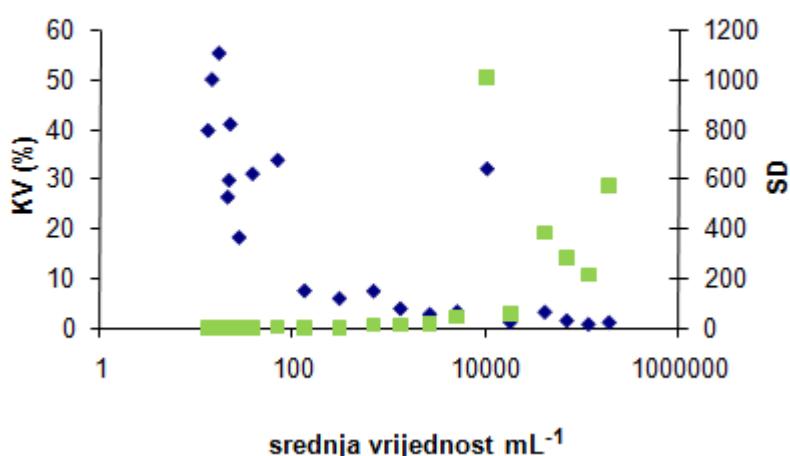
3. REZULTATI

3.1. Eksperimentalni dio rada na protočnom citometru

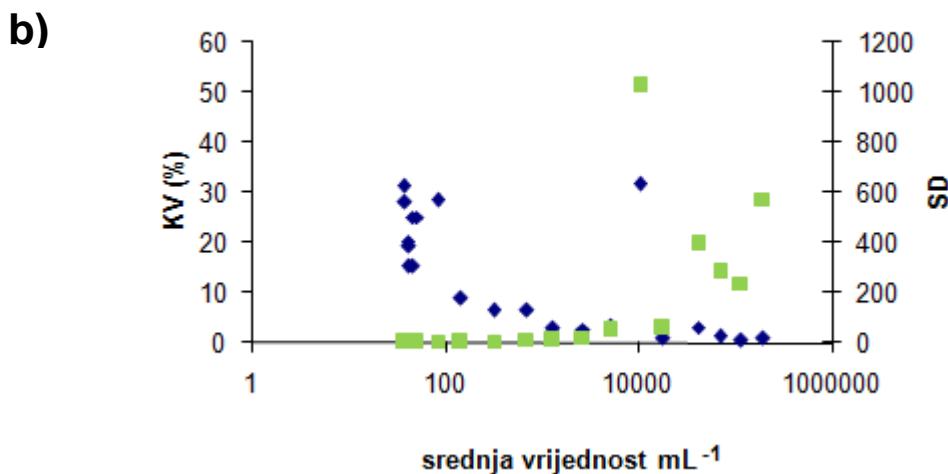
3.1.1.1. Eksperiment - Razrijedivanje fluorescentnih kalibracijskih kuglica

U prvih 8 koraka razrijedivanja KV je bio manji od 4%, te su koeficijenti varijacije za ukupan broj događaja kao i za kalibracijske kuglice bili gotovo isti, dok su standardne devijacije pokazivale slične trendove. Nakon 13 koraka razrijedenja kada je srednja vrijednost mjerene čestice iznosila $40 \text{ čestica mL}^{-1}$ koeficijenti varijacije su bili viši od 10% ($\text{KV}>10\%$), što možemo vidjeti i iz Slike 3.1.1.1. a) i b), gdje su prikazane prosječne vrijednosti vs. SD i KV.

a)



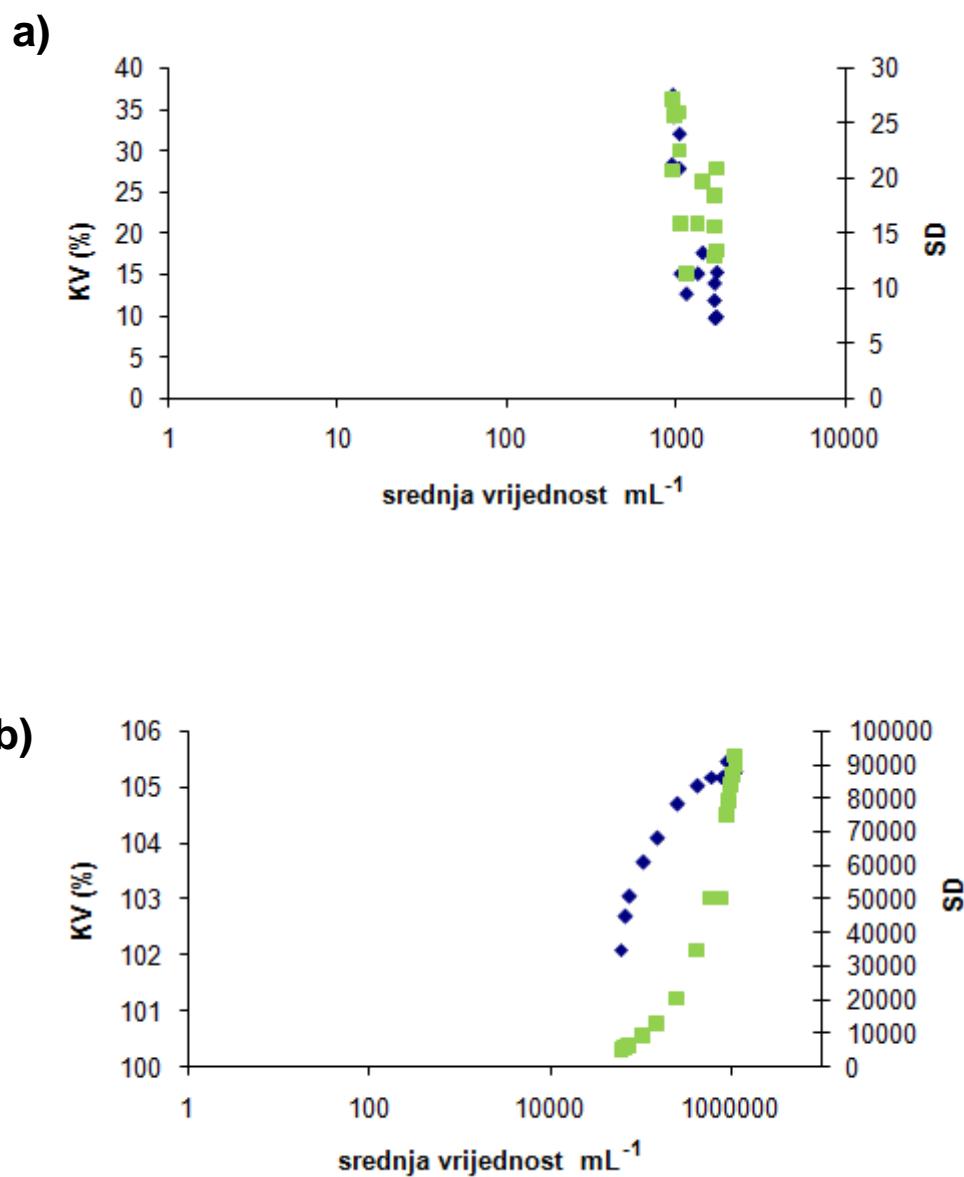
Slika 3.1.1.1. Prosječne vrijednosti čestica mjereni protičnim citometrom u eksperimentu razrijedivanja fluorescentnih kalibracijskih kuglica za
a) samo fluorescentne kalibracijske kuglice (plavi romb = prosječne vrijednosti vs. KV, zeleni kvadrat = prosječne vrijednosti vs. SD).



Slika 3.1.1.1. Prosječne vrijednosti čestica mjerena citometrom u eksperimentu razrijedivanja fluorescentnih kalibracijskih kuglica za b) sve čestice (plavi romb = prosječne vrijednosti vs. KV, zeleni kvadrat = prosječne vrijednosti vs. SD).

3.1.1.2. Eksperiment-Dodavanje gline

Prilikom korištenja FL4 kao „okidača signala“ broj čestica je imao sličan trend tijekom mjerjenja svih koraka. Korištenjem FSC „okidača signala“ broj čestica imao rastući trend (Slika 3.1.1.2.a) do praga „koincidencije“, kada je broj zastao na oko 17000 čestica, što odgovara vrijednosti od $2,1 \times 10^6$ stanica mL⁻¹, pri protoku čestica/stanica 1400 čestica u sekundi. Upozorenje koje instrument daje prilikom mjerjenja pre-koncentriranih uzoraka u ovom eksperimentu se pojavilo tijekom mjerjenja posljednje dvije serije, sa KV-om ukupnih događaja iznad 100% što upućuje na nisku preciznost mjerjenja (Slika 3.1.1.2.b).



Slika 3.1.1.2. Prosječne vrijednosti čestica mjereneih protočnim citometrom u eksperimentu dodavanja gline za a) samo FSC čestice, te b) sve čestice (plavi romb = prosječne vrijednosti vs. KV, zeleni kvadrat = prosječne vrijednosti vs. SD).

3.2. Mjerenja *in situ*

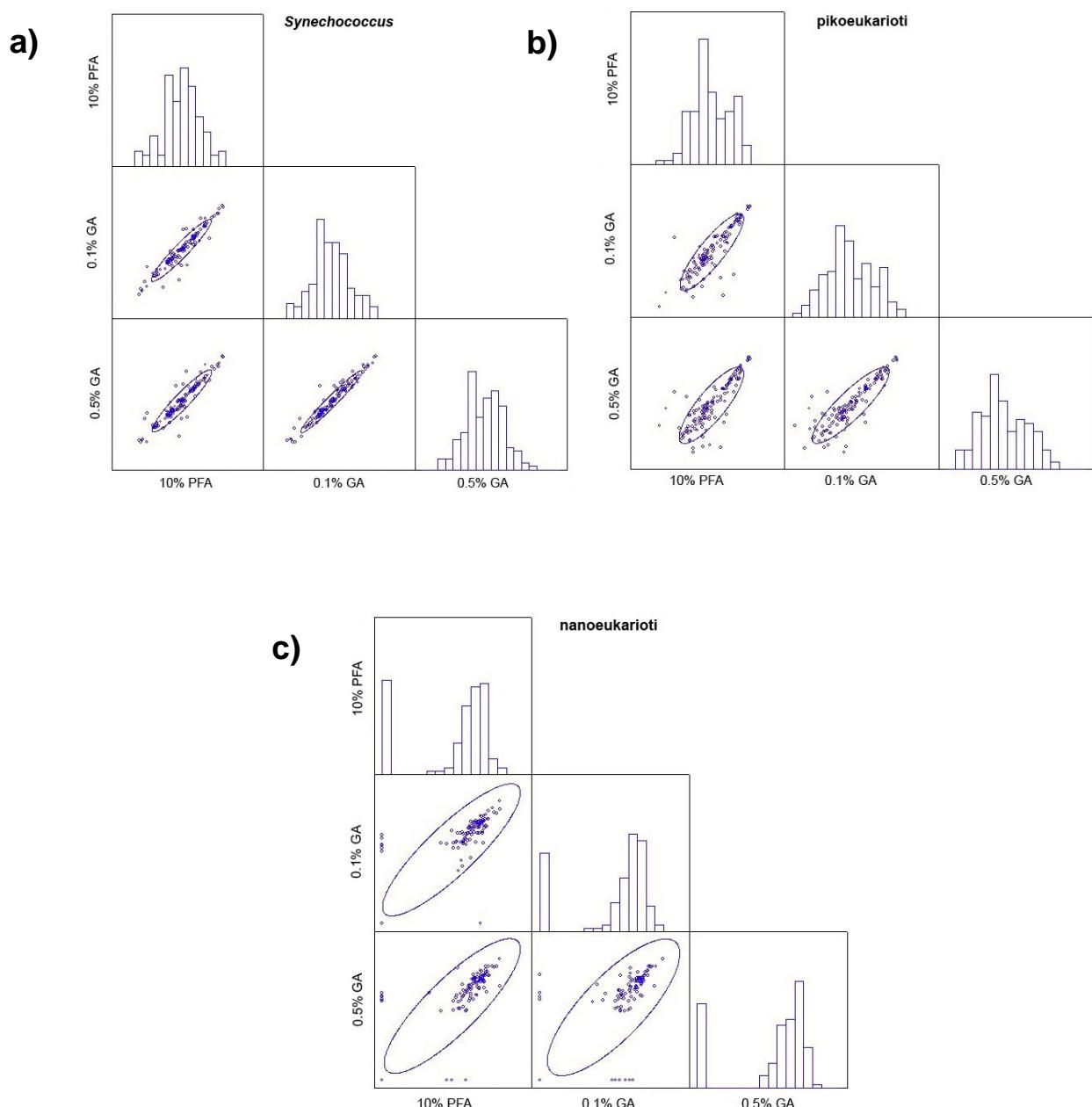
3.2.1. Metodološki dio

3.2.1.1. Usporedba učinka fiksativa na abundancije populacija fitoplanktona s prirodnih lokacija

Utvrđeno je da uzorci fiksirani dvama fiksativima značajno koreliraju ($p=0,000$) za sve testirane populacije (*Synechococcus*, pikoeukarioti, nanoeukarioti) (Slika 3.2.1.1.). Najveći faktori korelacija nađeni su za populaciju cijanobakterija *Synechococcus* (Tablica 3.2.1.1.) (Slika 3.2.1.1.).

Tablica 3.2.1.1. Pearsonovi koeficijenti korelacije između uzoraka testiranih različitim fiksativima (paraformaldehid- PFA; glutaraldehid-GA)

	Pearsonov faktor korelacije (R) za <i>Synechococcus</i>	Pearsonov faktor korelacije (R) za pikoeukariote	Pearsonov faktor korelacije (R) za nanoeukariote	p-vrijednost, n-broj testiranih varijabli
0,2 % PFA / 0,1% GA	0,949	0,871	0,866	$p=0,000; n=135$
0,2% PFA / 0,5% GA	0,938	0,832	0,847	
0,1% GA / 0,5% GA	0,972	0,876	0,787	



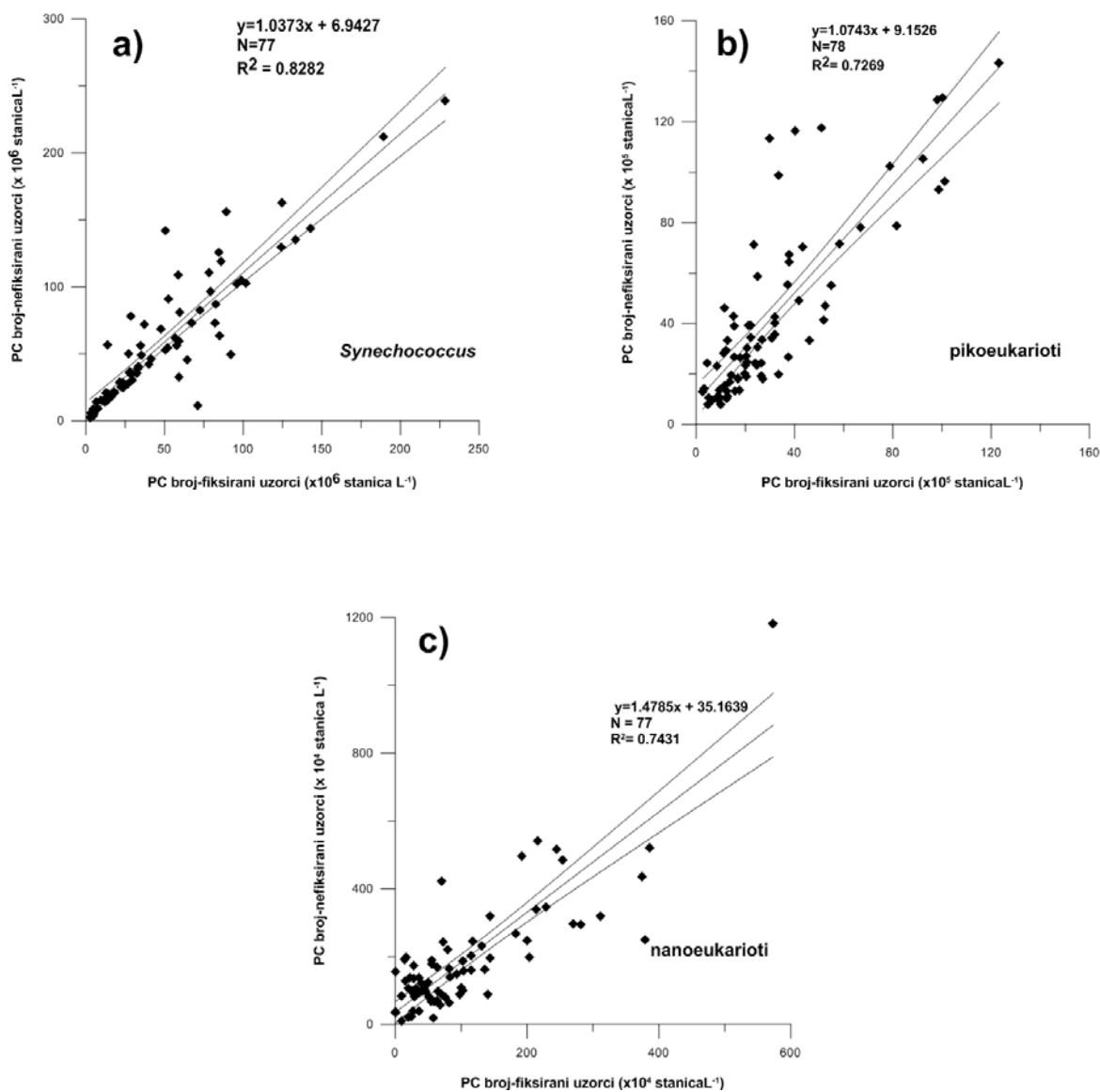
Slika 3.2.1.1. Graf matrice Pearsonovih koeficijenata korelacije za:

a) *Synechococcus*; b) pikoeukariota; c) nanoeukariota testiranih razlicitim fiksativima
(0,1% GA, 0,5% GA, 0,2% PFA)

3.2.1.2. Usporedba fiksiranih i nefiksiranih uzoraka

Usporedba nefisksiranih i fiksiranih uzoraka mjerenih protočnom citometrijom pokazala je značajnu korelaciju za *Synechococcus* ($R^2 = 0,82$, $n = 77$), pikoeukariote ($R^2 =$

$0,72$, $n = 78$) i nanoeukariote ($R^2 = 0,74$, $n = 77$) (Slika 3.2.1.) tijekom 6 mjeseci istraživanog perioda na sve tri postaje Limskog kanala (LIM1, LIM2, LIM3).

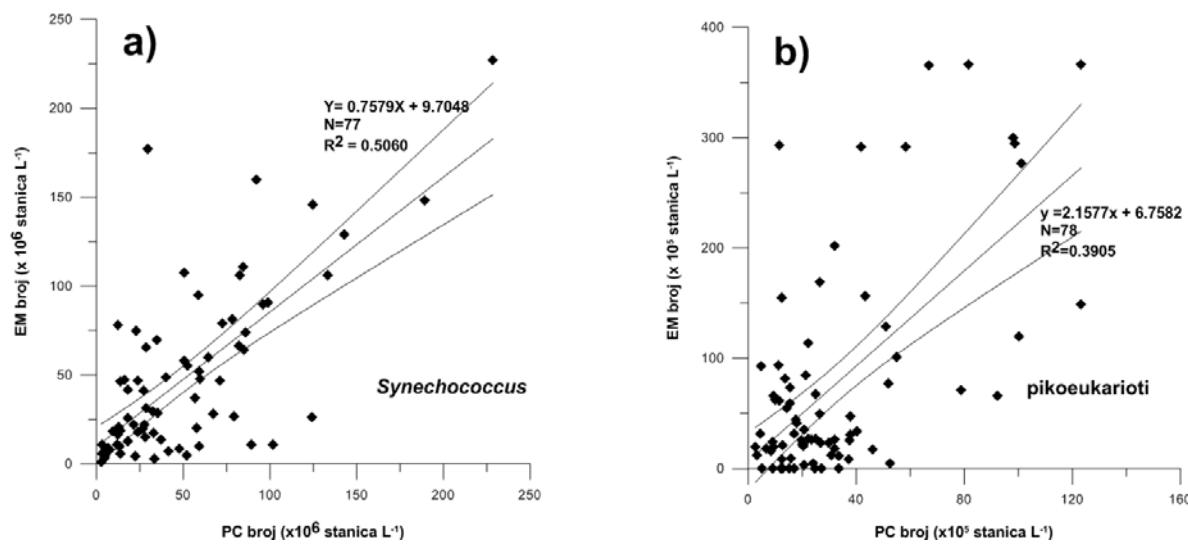


Slika 3.2.1.2. Korelacija nefiksiranih i fiksiranih uzoraka populacija:

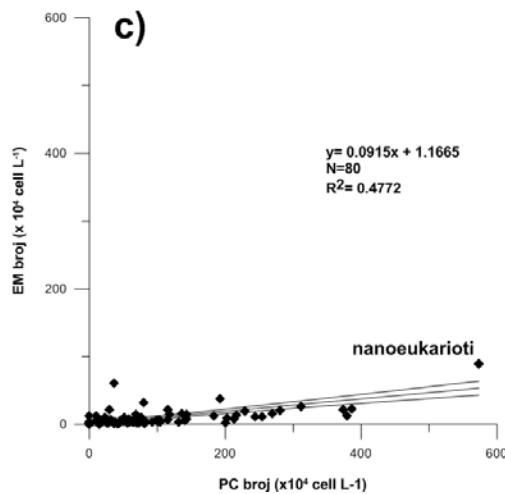
- a) *Synechococcus*; b) pikoeukarioti i c) nanoeukarioti između nefiksiranih uzoraka i uzoraka fiksiranih glutaraldehidom (GA)

3.2.1.3. Usporedba abundancija dobivenih epifluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom

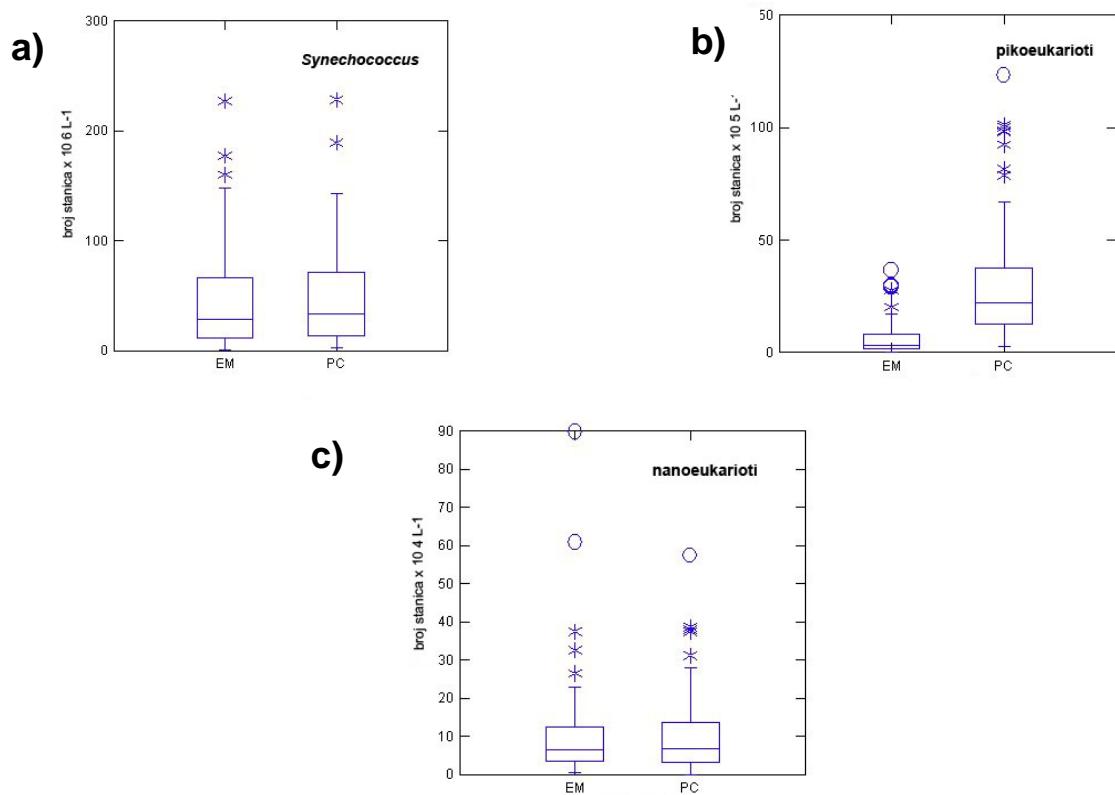
Rasponi vrijednosti za *Synechococcus*, pikoeukariote i nanoeukariote tijekom 6 mjeseci istraživanog perioda na sve tri postaje Limskog kanala (LIM1, LIM2, LIM3) definirale su veću osjetljivost protočne citometrije. Abundancije cijanobakterija *Synechococcus* (PC-mjerenja) kretale su se u rasponu od $2,6 \times 10^6$ – $2,3 \times 10^8$ stanica L^{-1} (nefiksirani uzorci) odnosno $2,5 \times 10^6$ – $2,2 \times 10^8$ stanica L^{-1} (fiksirani uzorci), dok su njihove abundancije dobivene EM-om varirale od $9,9 \times 10^5$ – $2,2 \times 10^8$ stanica L^{-1} . Za razliku od cijanobakterija *Synechococcus*, abundancije pikoeukariota mjerene PC-om varirale su za dva reda veličine (nefiksirani uzorci: $8,0 \times 10^5$ – $1,4 \times 10^7$ stanica L^{-1} , fiksirani uzorci: $2,6 \times 10^5$ – $1,2 \times 10^7$ stanica L^{-1}). Abundancije pikoeukariota mjerene EM u usporedbi s PC-om pokazale su ekstremne varijacije (od 6 redova veličine) 0 – $3,6 \times 10^6$ stanica L^{-1} . Vrijednosti abundancija nanoeukariota mjerenih PC-om kretale su se 0 – $1,1 \times 10^7$ stanica L^{-1} za nefiksirane uzorke, te od 0 – $5,0 \times 10^6$ stanica L^{-1} za fiksirane uzorke), a one dobivene EM-om 0 – $9,0 \times 10^6$ stanica L^{-1} . Usporedba rezultata abundancija pojedinih populacija fitoplanktona mjerenih PC-om i EM-om definirala je značajnu, no slabu korelaciju za *Synechococcus* ($R^2 = 0,50$, $n = 77$), pikoeukariote ($R^2 = 0,39$, $n = 78$) i nanoeukariote ($R^2 = 0,47$, $n = 80$) (Slike 3.2.1.3. i 3.2.1.4.).



Slika 3.2.1.3. Korelacija abundancija populacija: a) *Synechococcus* i b) pikoeukariota dobivenih metodom epifluorescentne mikroskopije i protočne citometrije



Slika 3.2.1.3. Korelacija abundancija: a) *Synechococcus*; b) pikoeukariota i c) nanoeukariota dobivenih metodom epifluorescentne mikroskopije i protočne citometrije.

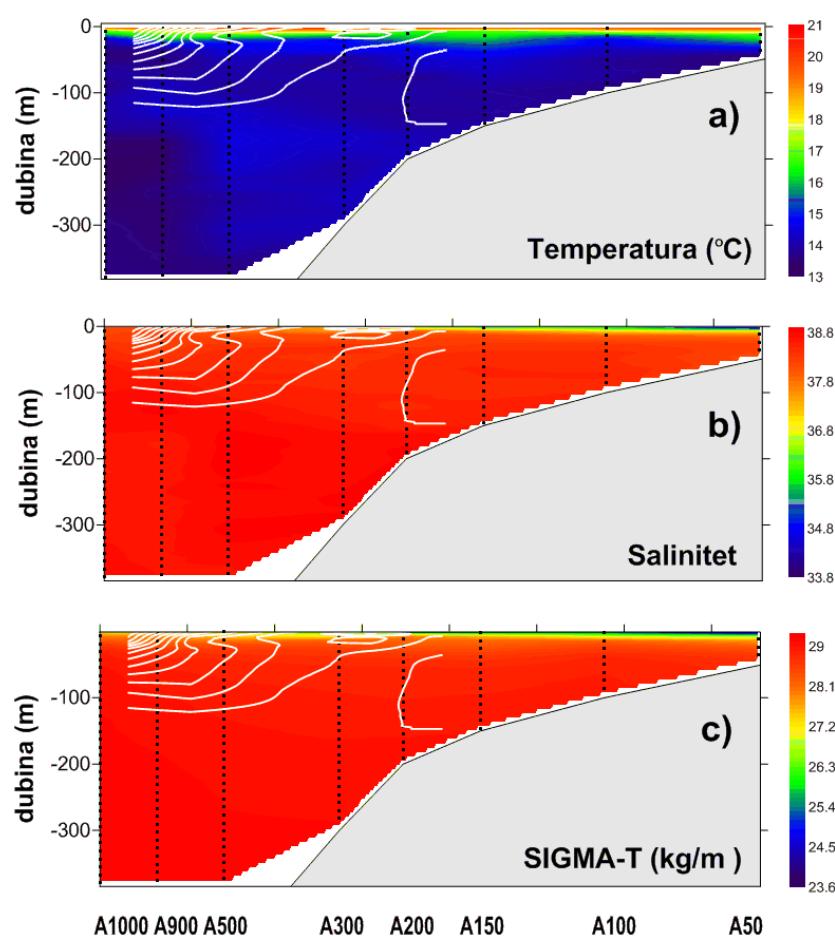


Slika 3.2.1.4. Box-Whisker graf abundancija c) nanoeukariota mjerenih epifluorescentnim mikroskopom (EM) i protočnim citometrom (PC) (* - označava vrijednosti tri puta veće od interkvartilnog raspona; o – označava vrijednosti izvan svih raspona = „outliers“)

3.2.2. Sastav pikoplanktona u odnosu na termohalinu cirkulaciju u području albanske granične zone (južni Jadran) u kasno proljeće

Hidrografija

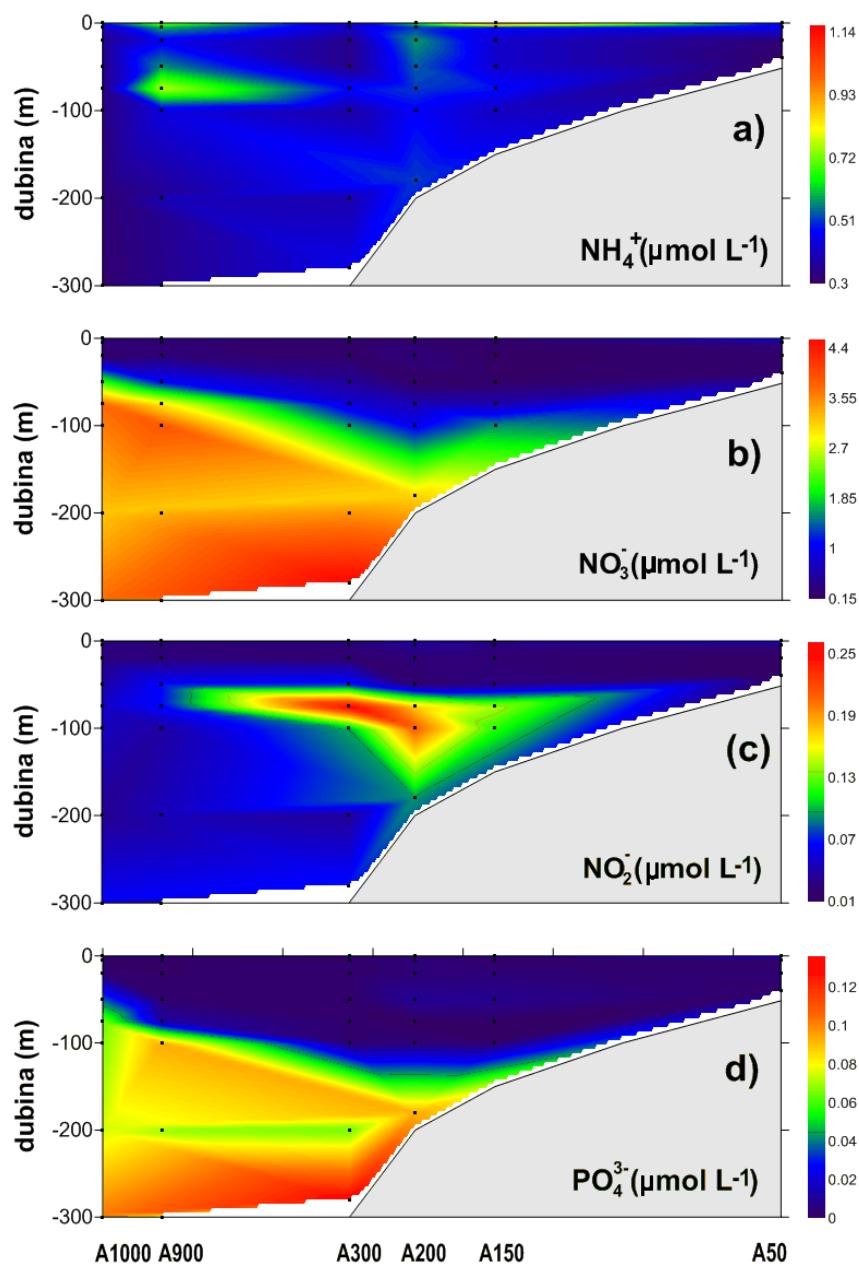
Temperatura, salinitet i gustoća (Sigma-T) vrijednosti pokazali su visoku stratifikaciju u površinskom sloju (Slika 3.2.2.1.). Temperatura vode kretala se od 13,2 °C (A1000, 220 m) do 20,9 °C (A200, površina), dok je salinitet varirao između 33,8 (površinski sloj na A50) i 38,9 (A500, 210 m).



Slika 3.2.2.1. Prostorna raspodjela: a) temperatura; b) saliniteta i c) gustoća (SIGMA-T) na istraživanom profilu u južnom Jadranu. Bijele linije označavaju izoterme od 14 °C (a) i izohaline od 38,7 (b) što ukazuje na jezgru LIW upliva.

Temperaturni profili u kasno proljeće pokazali su toplinsku slojevitost u prvih 40 m na čitavom istraživanom profilu albanske granične zone. Horizontalni termohalini gradijent definirao je granični sloj između EAC-a u obalnom području i u otvorenom moru. Salinitet površinskog sloja iznad kontinentalnog šelfa bio niži uslijed dotoka slatke vode iz albanskih rijeka. Saliniteti viši od 38,7 i temperature iznad 14,0 °C ukazali su na jezgru ingressije LIW-a uslijed djelovanja EAC-a u sloju između 100 i 350 m, zapadno od postaje A200 (Slika 3.2.2.1.). Relativne geostrofičke struje su bile općenito pozitivne, što ukazuje na priljev vode iz Južnojadranske kotline preko čitavog profila (nije prikazano). Najjaču snagu struje su dostigle blizu površine na „off-shore“ postajama, dosegnuvši 20 cm/s u potpovršinskom sloju između postaja A900 i A1000. Ovaj maksimum EAC-a usko je vezan za horizontalne gradijente gustoće između voda otvorenog Jadrana i ruba kontinentalnog šelfa, uzrokovanog uplivom LIW-a u srednjem sloju (Slika 3.2.2.1.).

Koncentracije hranjivih soli su bile općenito niske u površinskom sloju (osim NH_4^+ , koji su najvećum srednju vrijednost od $1,14 \mu\text{mol L}^{-1}$ dosegli na postaji A150) te su se postupno povećavale s dubinom, dosegnuvši maksimalne vrijednosti od $0,08 \mu\text{mol L}^{-1}$ za PO_4^{3-} na 200 m, $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ za NO_3^- na 300 m i $0,14 \mu\text{mol L}^{-1}$ za NO_2^- na, 75 m (Slika 3.2.2.2.). Nutriklina je detektirana u sloju između 50 i 150 m dubine.

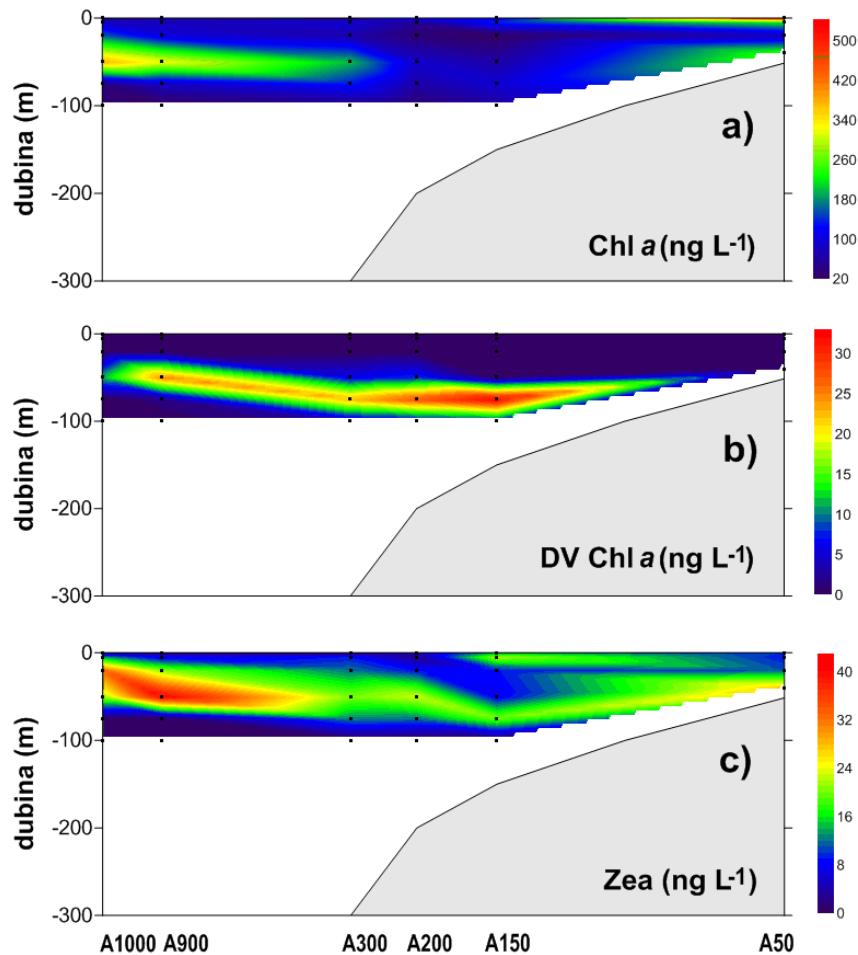


Slika 3.2.2.2. Prostorna raspodjela: a) NH_4^+ ; b) PO_4^{3-} ;
c) NO_3^- i d) NO_2^- duž profila u južnom Jadranu.

Klorofil *a* i pigmenti biomarkeri

Koncentracije Chl *a* bile su vrlo niske, varirajući od 17 ng L^{-1} do 525 ng L^{-1} . Prostorna raspodjela slijedila je slojevitost vodenog stupca, s dva maksimuma: jedan (525 ng L^{-1}) u površinskom sloju na obalnoj postaji A50 i drugi tzv. dubokomorski maksimum

(DCM) ($\text{Chl } a > 300 \text{ ng L}^{-1}$) na postajama otvorenog mora A900 i A1000 u sloju od 50-75 m dubine (Slika 3.2.2.3.). Na svim postajama s razvijenim DCM-om (A300, A900 i A1000) maksimum Chl a korelira s maksimumom zeaksantina, dok se na postajama A900 i A1000 maksimum Chl a podudara i s maksimumom DV Chl a .

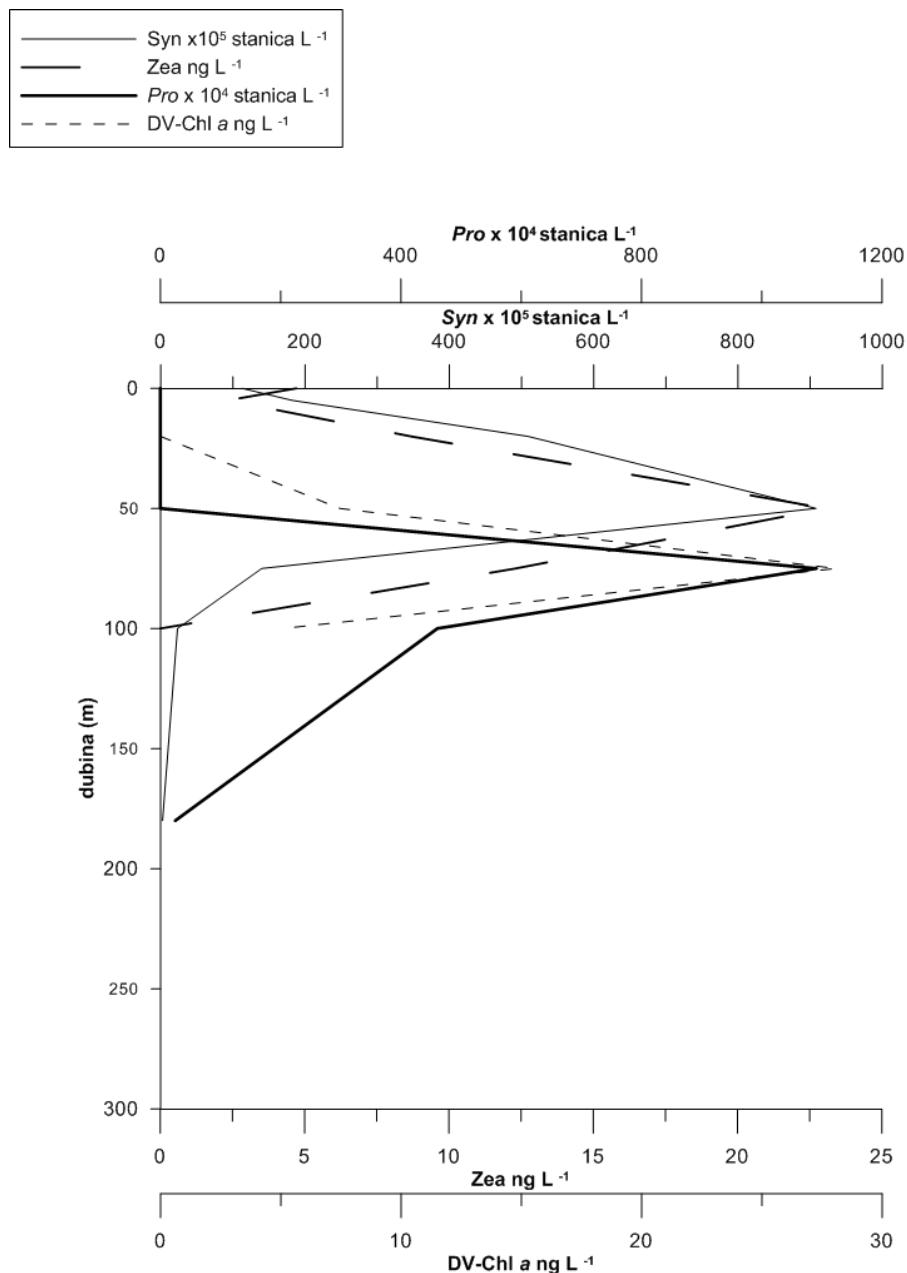


Slika 3.2.2.3. Prostorna raspodjela: a) Chl a ; b) DV Chl a i c) Zeaksantina (Zea) duž profila u južnom Jadranu

Koncentracije DV Chl a su bile uglavnom jako niske (Slika 3.2.2.3.b), sa zabilježenim maksimumom na postaji A200. Vertikalna raspodjela DV Chl a i Zea pokazuje značajnu korelaciju s abundancijom cijanobakterija rodova *Prochlorococcus* i *Synechococcus* (Slika 3.2.2.4.).

Raspodjela Chl a značajno je korelirala s distribucijom abundancija pikoeukariota ($p < 0,01$, $R = 0,58$, $N = 31$) i cijanobakterija *Synechococcus* ($p < 0,005$, $R = 0,61$, $N = 32$), dok

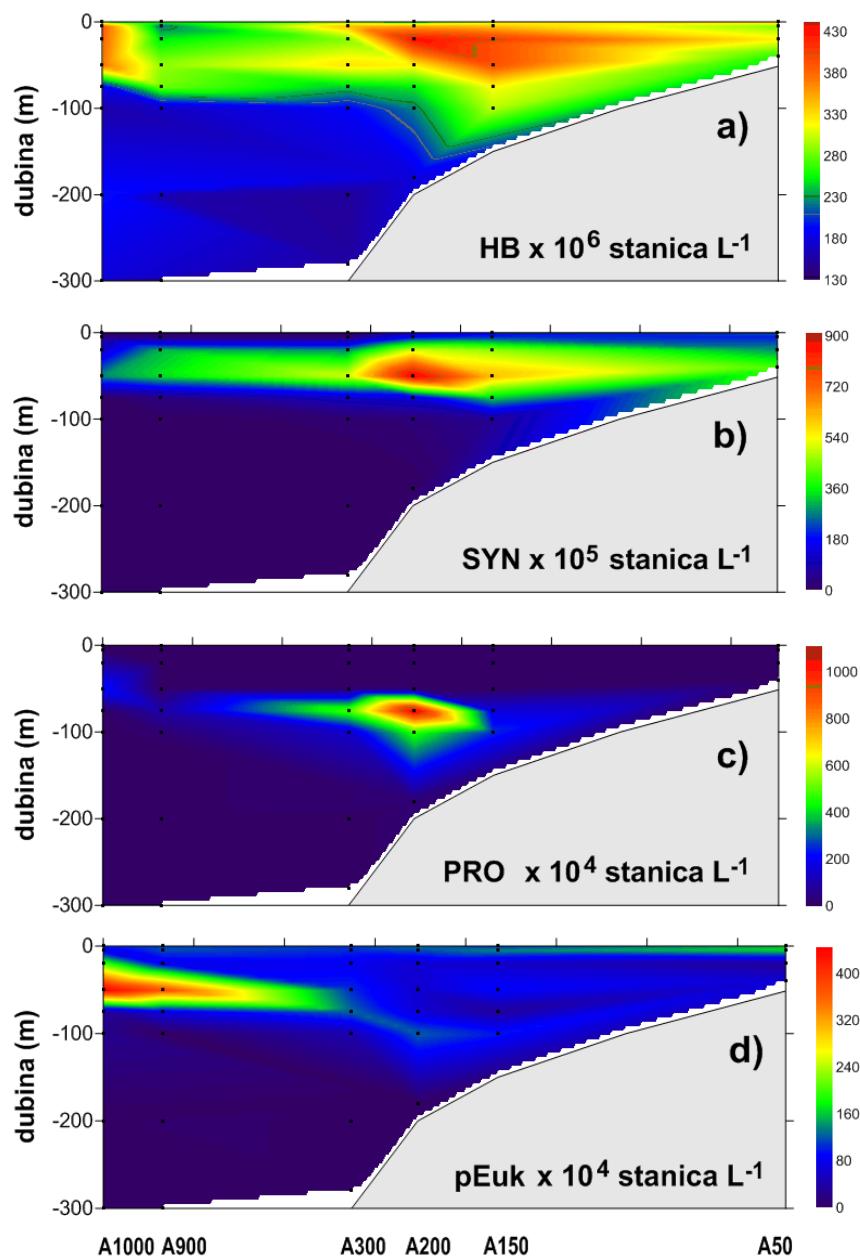
je raspodjela Zea korelirala samo sa abundancijom cijanobakterija *Synechococcus* ($p < 0.01$, $R = 0,61$, $N = 24$).



Slika 3.2.2.4. Vertikalna raspodjela cijanobakterija *Prochlorococcus* (*Pro*) i *Synechococcus* (*Syn*), DV Chl *a* i Zea na postaji A200.

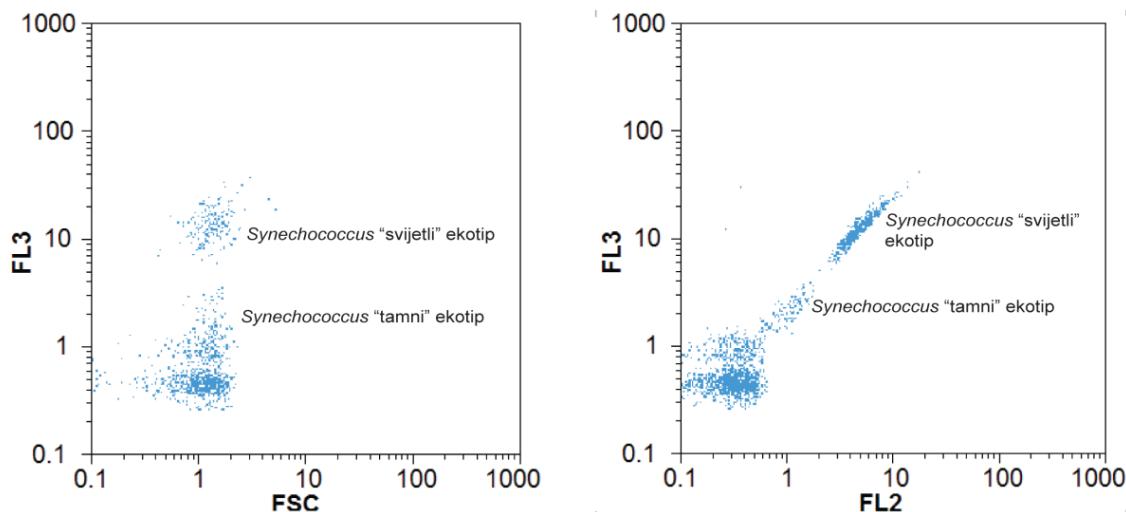
Pikoplankton

Heterotrofne bakterije brojčano su dominirale zajednicom pikoplanktona duž profila, od 130×10^6 stanica L⁻¹ (postaja A900) do 430×10^6 stanica L⁻¹ (postaja A200) (Slika 3.2.2.5.a).



Slika 3.2.2.5. Prostorna raspodjela abundancija: a) heterotrofnih bakterija (HB);
b) *Synechococcus* (SYN); c) *Prochlorococcus* (PRO) i
d) pikoeukariota (pEuk) duž profila u južnom Jadranu.

Cijanobakterije roda *Synechococcus* su gotovo u potpunosti prevladavale autotrofnim dijelom pikoplanktona (općenito > 80%), s većim abundancijama u površinskom sloju (do 50 m), te s maksimumom na postaji A200 (900×10^5 stanica L⁻¹) (Slika 3.2.2.4., Slika 3.2.2.5.b). Abundancije heterotrofnih bakterija i cijanobakterija *Synechococcus* značajno su pozitivno korelirale ($R = 0,74$, $p > 0,001$, $n = 36$), te su obje negativno korelirale s nitratima (heterotrofne bakterije - nitrati: $R = -0,61$, $p < 0,005$, $n = 34$; cijanobakterije - nitrati: $R = -0,77$, $p < 0,001$, $n = 37$). Značajna negativna korelacija je također pronađena za heterotrofne bakterije i fosfate ($R = -0,70$, $p < 0,001$, $n = 37$). Rezultati dobiveni primjenom protočne citometrije, u uzorcima s postaja A200 i A300 na dubini od 75 m, ukazuju na prisutnost dvije različite podskupine roda *Synechococcus* i specifičnim sadržajem pigmenata odnosno pripadajućim signalima u narančastom (FL2) i crvenom (FL3) dijelu spektra (Slika 3.2.2.6.)



Slika 3.2.2.6. Različite podskupine roda *Synechococcus* („tamni“ i „svijetli“ ekotip) na osnovu pripadajućih signala u narančastom (FL2) i crvenom (FL3) dijelu spektra na postaji A200 na 75 m dubine

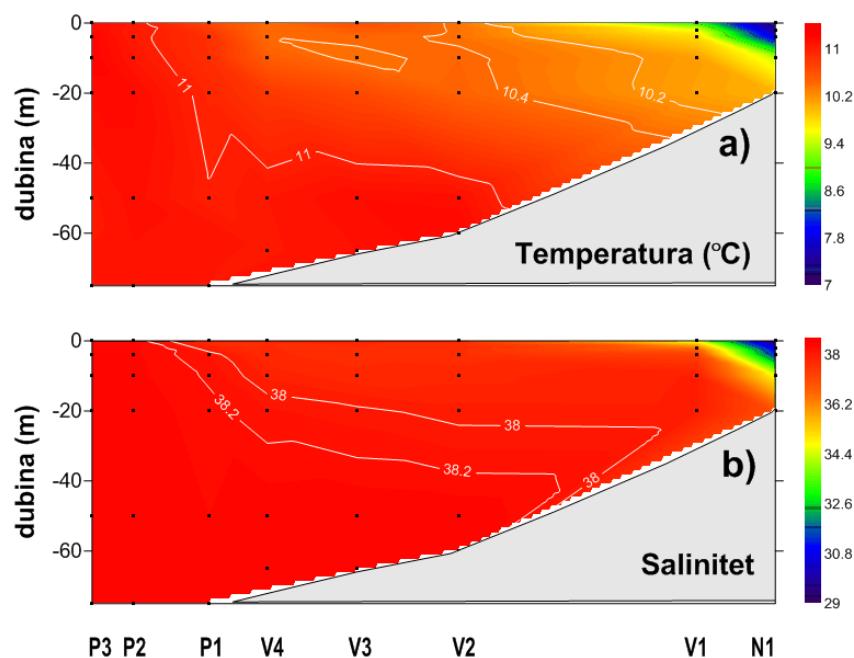
Vertikalna raspodjela cijanobakterije *Prochlorococcus* otkrila je oštri maksimum u sloju između 50 i 75 m, te njihovu potpunu odsutnost iz površinskog sloja (Slika 3.2.2.5.c), što su potvrdili i podaci o sadržaju pigmenata (Slika 3.2.2.4.b). Prostorna raspodjela im je bila prilično necjelovita s maksimalnim abundancijama na postaji A200 (75 m - 750×10^4 stanica L⁻¹), dok na postaji A50, koja se nalazi najbliže obali, nisu detektirani (Slika 3.2.2.5.c). Cijanobakterije *Prochlorococcus* nisu značajno korelirale s niti jednim okolišnim

parametrom. Prostorna raspodjela pikoeukariota je bila uglavnom ujednačena u gornjem dijelu vodenog stupca, s najvišim abundancijama na postaji koja se nalazila najbliže otvorenom moru (A1000 na 50 m – 350×10^4 stanica L⁻¹) (Slika 3.2.2.5.d).

3.2.3. Raspodjela fitoplanktona u termohalinom gradijentu uz sjevero-istočnu obalu Jadrana (zimski aspekt)

Termohaline karakteristike i struktura vodenog stupca

Vodeni stupac je na osnovu saliniteta, temperature (Slika 3.2.3.1) i fitoplanktonske biomase podijeljen u tri sloja: površinski sloj, dubok oko 10 m; potpovršinski sloj između 10 i 40 m; te duboki sloj ispod 40 m dubine.



Slika 3.2.3.1. Prostorna raspodjela: a) temperatura i b) salinitet duž profila u sjeveroistočnom Jadranu

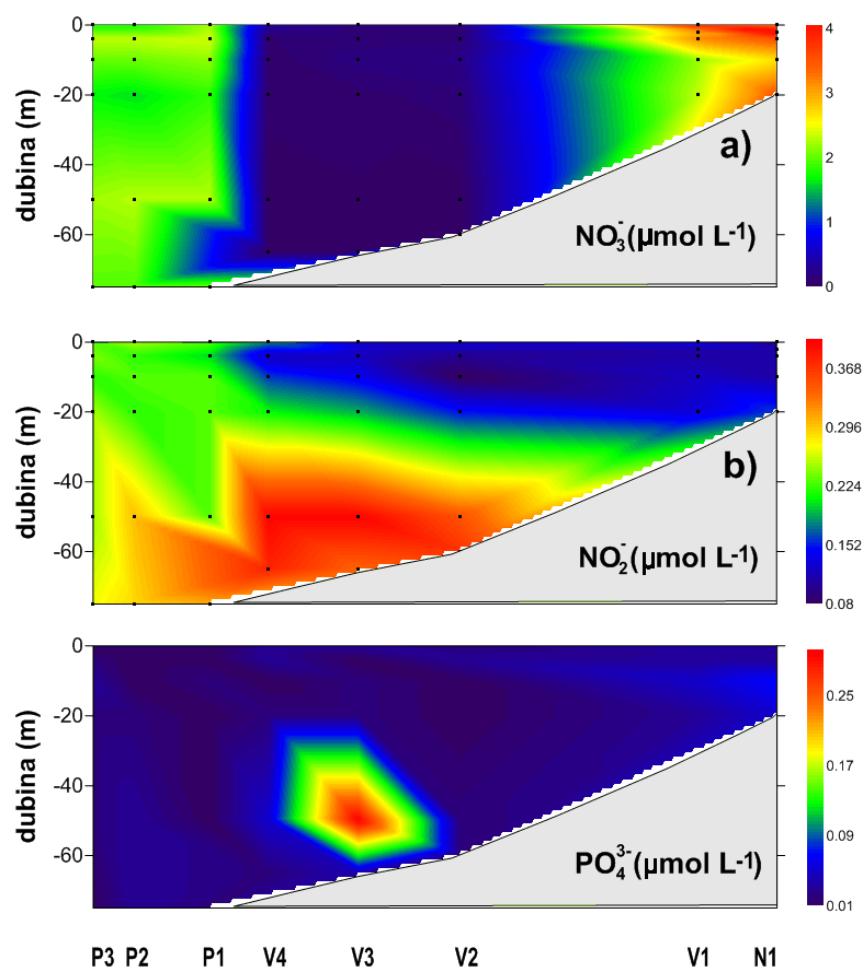
Fizikalno-kemijske karakteristike pokazale su tri različita režima, prvi u južnom dijelu Velebitskog kanala (postaje V1-V2), drugi u srednjem dijelu Velebitskog kanala (postaje V2-P1), a posljednji u Paškom kanalu (stations P1-P3).

Južni dio Velebitskog kanala pokazao je karakteristike vanjskog dijela djelomično izmješanog ušća, s površinskim slojem nižeg saliniteta, kao posljedica odlijeva rijeke Zrmanje. U potpovršinskom sloju zabilježeni su veći saliniteti, kao posljedica utjecaja voda sa sjeverne strane kanala. U srednjem dijelu Velebitskog kanala je zabilježeno postojanje tri

sloja. Temperatura mora u vodenom stupcu varirala je od 10,2 do 11,6 °C. U sloju od 20 do 40 m, salinitet se povećao s 37,7 na 38,4, dok na dubinama većim od cca 50 m salinitet i temperature su bili stabilni. Prema CTD mjeranjima, površinska temperatura i salinitet smanjili su se od Paškog kanala ($T=10,8-11,2$ °C, $S=37,5-37,7$) prema srednjem dijelu Velebitskog kanala ($T=9-10,5$ °C, $S=34$ do 37,3) (Slika 3.2.3.1.). U unutrašnjem dijelu Velebitskog kanala između postaja V1 i N1 (10,3 km udaljenosti) došlo je do naglog pada površinske temperature (od 8,91 prema 7,13 °C) i slanosti (34,43 – 29,12). Između Velebitskog i Paškog kanala (između otoka Raba i obale) zamijećen je također lagani pad saliniteta, a posljedica je ulaska svježe vode nižeg saliniteta porijeklom iz obližnjih vrulja. Na 20 m dubine, slanost i temperatura na južnog dijela Velebitskog kanala, kao i estuarija rijeke Zrmanja ostali su stabilni.

Hranjive soli

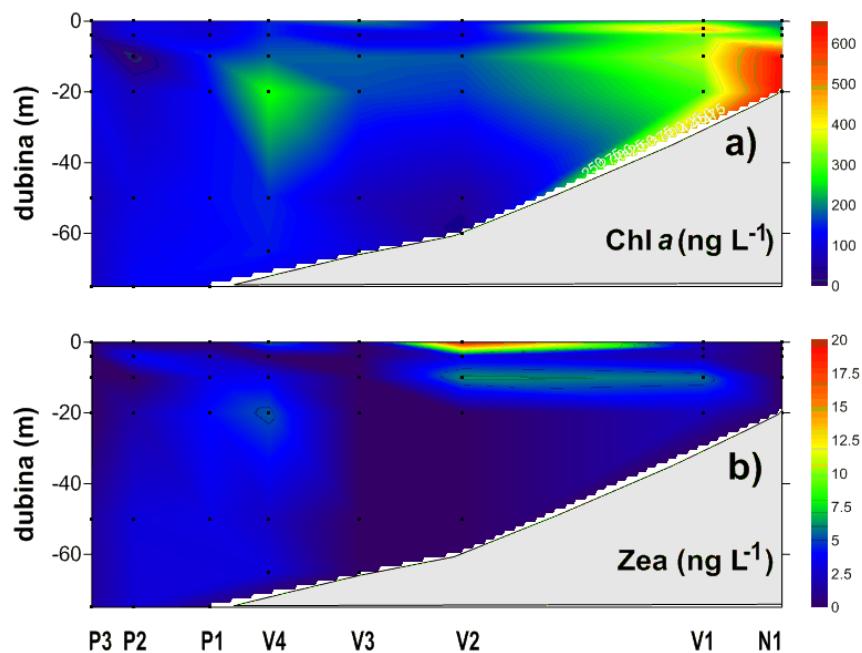
Koncentracije DIN-a i fosfata (PO_4^{3-}) u sloju od 0-20 m općenito se povećao 2-5 puta od vanjskog prema unutrašnjem dijelu kanala (Slika 3.2.3.2.). Raspodjela hranjivih soli razlikovala se u području između Paškog kanala i srednjeg dijela Velebitskog kanala (postaje P1-V4), gdje je DIN bio do 50% manji, a PO_4^{3-} nešto viših vrijednosti od susjednih postaja.



Slika 3.2.3.2. Prostorna raspodjela: a) NO_3^- ; b) NO_2^- i c) PO_4^{3-} duž profila u sjeveroistočnom Jadranu.

Klorofil *a* i pigment biomarker zeaksantin

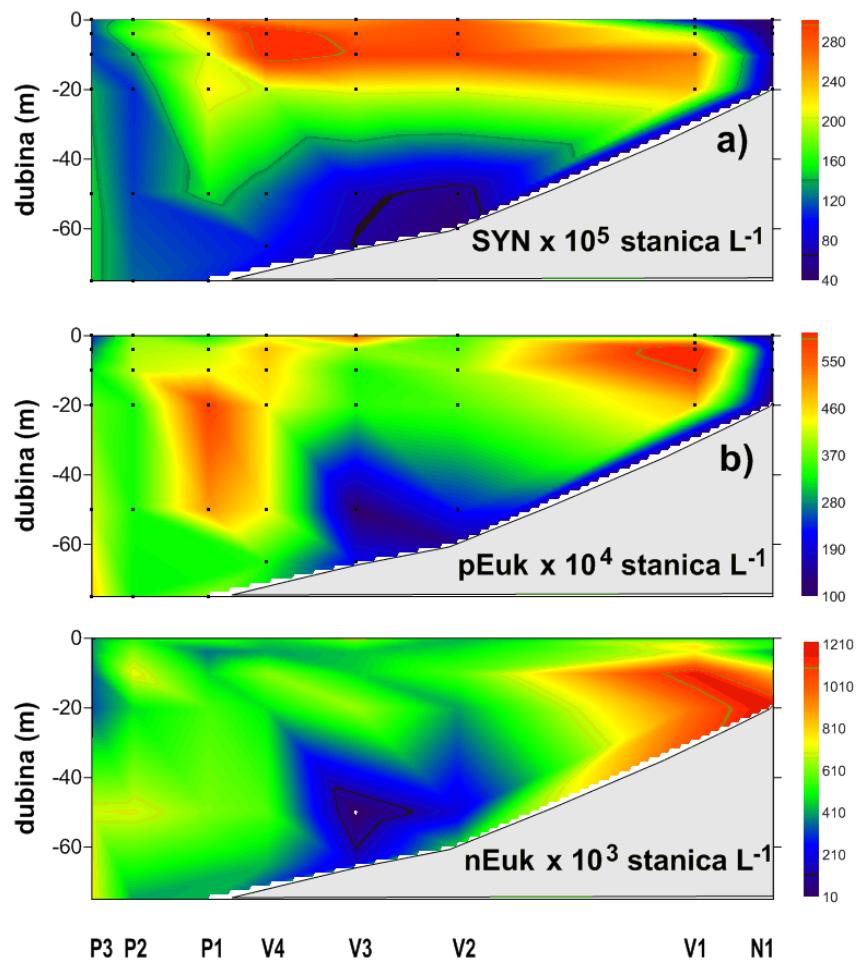
Vertikalna raspodjela klorofila u Velebitskom kanalu, kao i u unutarnjem dijelu Paškog kanala, u sloju od 20 - 40 m, bila je obilježena potpovršinskom akumulacijom s maksimom na dubini od oko 20 m (Slika 3.2.3.3.). Vrijednosti zabilježene u potpovršinskom maksimumu bile su 2-3 puta veće nego na površini u Paškom kanalu i na Sjevernom Velebitskom kanalu, a 2-4 puta veće nego one zabilježene u južnom dijelu Velebitskog kanala. Koncentracije Chl *a* povećale su se i do 10 puta od vanjskog prema unutarnjem dijelu sustava ($48,37 - 483,39 \text{ ngL}^{-1}$), dosegnuvši najviše koncentracije na postaji N1 ($647,1 \text{ ngL}^{-1}$). Zeaksantin je često bio ispod razina detekcije, dok su veće vrijednosti zabilježene u površinskom sloju s maksimumom od $19,86 \text{ ngL}^{-1}$ na postaji V2.



Slika 3.2.3.3. Prostorna raspodjela klorofila *a* (Chl *a*) i zeaksantina (Zea) duž profila u sjeveroistočnom Jadranu.

Abundancije fitoplanktona

Maksimalnim vrijednostima klorofila najvećim dijelom pridonijele su populacije dijatomeje, dinoflagelata i nanoflagelata u unutarnjem dijelu Velebitskog kanala i estuarija rijeke Zrmanje (podaci nisu prikazani). Nanoeukarioti najviše vrijednosti pokazali su u unutarnjem dijelu Velebitskog kanala te u estuariju rijeke Zrmanje gdje su dosegli svoj maksimum od 12×10^5 stanica L^{-1} . Uzduž promatranog profila zabilježene su tri akumulacije pikoplanktona, jedna površinska i dvije potpovršinske. Površinska akumulacija u centralnom dijelu kanala (od postaje P1 do postaje V3), najvećim dijelom je bila posljedicom visokih abundancija cijanobakterija *Synechococcus*, dok su potpovršinske akumulacije u južnom dijelu Velebitskog kanala - postaja V1 te u Paškom kanalu (u sloju od 20-40 m dubine) posljedicom visokih abundancija pikoeukariota (Slika 3.2.3.4.).



Slika 3.2.3.4. Prostorna raspodjela abundancija: a) *Synechococcus*; b) pikoeukariota i c) nanoeukariota duž profila u sjeveroistočnom Jadranu.

3.2.4. Autotrofne zajednice piko- i nanoplanktona na Rovinj-Po profilu u sjevernom Jadranu

Hidrografska obilježja Rovinj-Po profila

Najviše vrijednosti temperature zabilježene su u površinskom sloju svih postaja, za razliku od saliniteta koji je pokazao obrnuti trend (Tablica 3.2.4.1.). U listopadu na postaji SJ101 u površinskom sloju zabilježen je pad saliniteta (Tablice 3.2.4.1 i 3.2.4.2.), neposredno nakon povećanja protoka rijeke Po, što je rezultiralo povećanjem ukupne biomase (Chl *a*; Tablica 3.2.4.1.). U istom periodu zabilježene su i najveće abundancije piko- fototrofa (Slike 3.2.4.1. i 3.2.4.2.).

Tablica 3.2.4.1. Srednjaci i rasponi temperature, saliniteta, otopljenog anorganskog dušika (DIN-a), fosfata (PO_4^{3-}) i klorofila (Chl *a*) na 0 i 10 m, te 2 m iznad dna na postajama SJ107, SJ103, SJ101 i SJ108 na Rovinj-Po profilu u razdoblju lipanj-prosinac 2006. godine

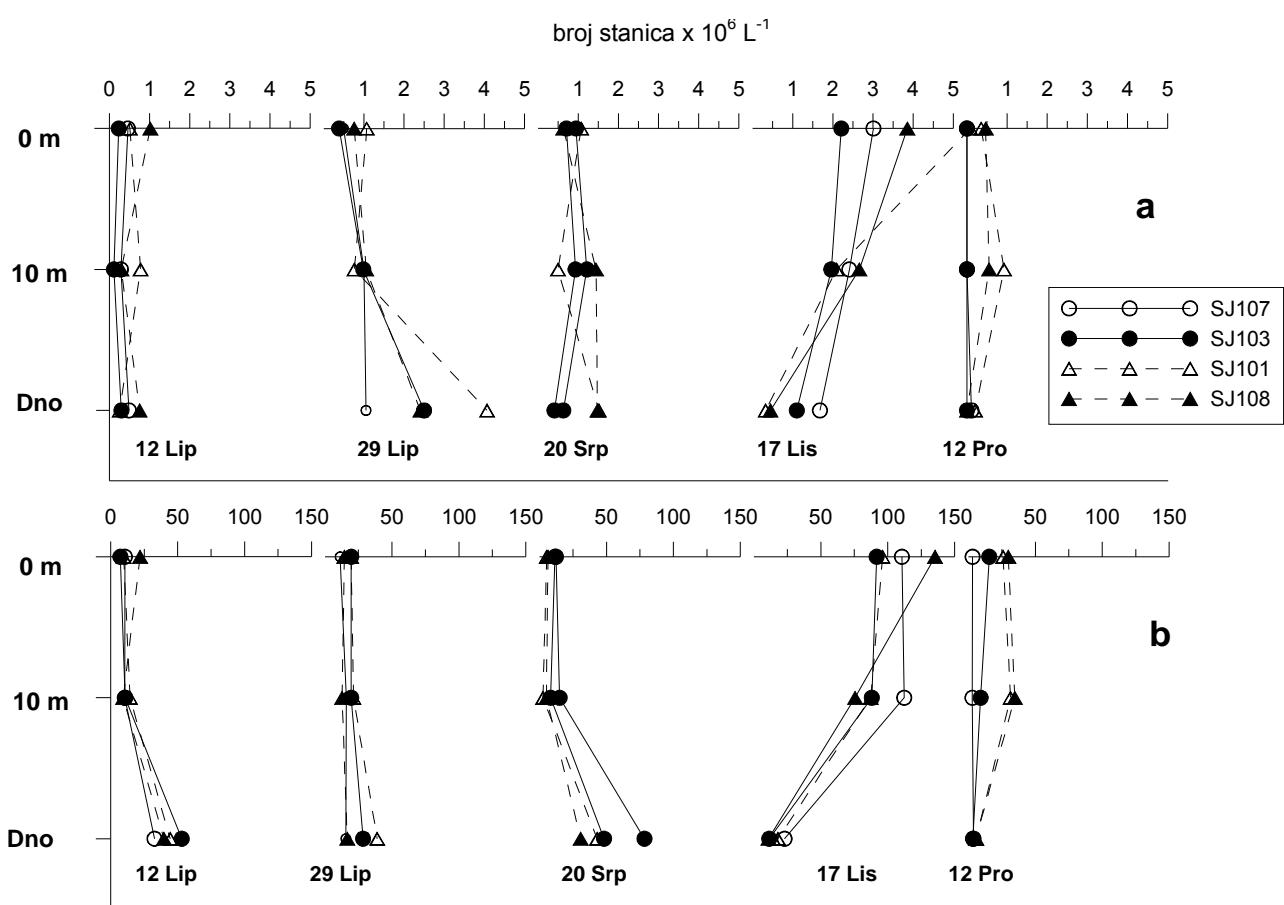
	SJ107	SJ103	SJ101	SJ108
Temperatura/$^{\circ}\text{C}$				
0 m	21,6 (16,1 – 26,7)	21,7 (15,3 – 27,3)	21,5 (14,6 – 27,5)	22,2 (14,5 – 27,8)
10 m	19,9 (16,1 – 24,9)	19,9 (15,9 – 24,7)	19,8 (14,7 – 25,5)	19,5 (14,5 – 24,9)
Dno	13,9 (11,8 – 16,1)	14,4 (11,3 – 16,6)	14,5 (11,2 – 18,4)	13,8 (11,7 – 16,2)
Salinitet				
0 m	37,4 (36,6 – 38,1)	37,1 (36,3 – 38,0)	36,4 (33,6 – 37,9)	36,7 (36,2 – 37,1)
10 m	37,7 (37,0 – 38,1)	37,7 (36,8 – 38,0)	37,4 (36,6 – 38,0)	37,4 (36,9 – 37,9)
Dno	38,3 (38,2 – 38,3)	38,2 (38,1 – 38,3)	38,2 (38,0 – 38,4)	38,2 (37,7 – 38,4)
DIN/$\mu\text{mol L}^{-1}$				
0 m	0,97 (0,63 – 1,42)	1,62 (0,89 – 3,55)	3,93 (0,58 – 11,06)	2,07 (0,76 – 5,61)
10 m	0,93 (0,58 – 1,46)	1,30 (0,77 – 2,46)	2,27 (0,65 – 6,11)	1,78 (0,69 – 5,47)
Dno	2,01 (0,89 – 6,11)	1,73 (0,91 – 3,32)	2,91 (0,91 – 8,68)	3,03 (1,09 – 7,16)
$\text{PO}_4^{3-}/\mu\text{mol L}^{-1}$				
0 m	0,02 (0,00 – 0,04)	0,02 (0,00 – 0,05)	0,04 (0,01 – 0,06)	0,04 (0,01 – 0,05)
10 m	0,02 (0,00 – 0,04)	0,02 (0,00 – 0,05)	0,02 (0,00 – 0,04)	0,02 (0,00 – 0,07)
Dno	0,10 (0,04 – 0,29)	0,23 (0,07 – 0,47)	0,27 (0,08 – 0,64)	0,36 (0,19 – 0,76)
Chl <i>a</i>/$\mu\text{g L}^{-1}$				
0 m	0,26 (0,07 – 0,65)	0,29 (0,07 – 0,56)	0,77 (0,15 – 2,38)	0,60 (0,15 – 1,29)
10 m	0,28 (0,08 – 0,68)	0,26 (0,06 – 0,53)	0,36 (0,06 – 0,82)	0,44 (0,04 – 1,36)
Dno	0,39 (0,25 – 0,46)	0,72 (0,44 – 1,08)	0,60 (0,39 – 0,94)	0,70 (0,40 – 0,91)

Tablica 3.2.4.2. Srednjaci i rasponi temperature, saliniteta i klorofila a (Chl *a*) u površinskom sloju profila. Protok rijeke Po (definiran kao prosječni protok tjedna prije datuma uzorkovanja)

	Lipanj 12	Srpanj 29	Srpanj 20	Listopad 17	Prosinc 12
Temperatura/ $^{\circ}\text{C}$	19,7 (18,9 – 20,7)	26,4 (25,9 – 27,0)	27,1 (25,7 – 27,8)	20,3 (19,20 – 20,7)	15,1 (14,5 – 16,1)
Salinitet	37,7 (37,1 – 38,0)	36,8 (36,3 – 37,6)	36,6 (36,2 – 37,7)	36,1 (33,6 – 37,0)	37,3 (36,8 – 38,1)
Chl <i>a</i> / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,24 (0,07 – 0,61)	0,11 (0,07 – 0,15)	0,18 (0,10 – 0,23)	1,07 (0,52 – 2,38)	0,80 (0,41 – 1,29)
Protok rijeke Po / m^3s^{-1}	353	237	244	1053	1208

Abundancije analiziranih populacija

Abundancije cijanobakterija roda *Prochlorococcus* pokazale su ujednačenu raspodijelu duž trofičkog gradijenta u sjevernom Jadranu tijekom čitavog perioda istraživanja, bez statistički značajne razlike između postaja (ANOVA, $F = 1,360$, $p = 0,264$) ili dubina duž čitavog profila ($F = 0,010$, $p = 0,990$). Abundancija cijanobakterija roda *Prochlorococcus* bila je najveća u pridnenom sloju. U periodu od lipnja do listopada zabilježen je uzlazni trend abundancija cijanobakterija *Prochlorococcus* u rasponu od $0,2 - 8 \times 10^6$ stanica L^{-1} s najvećom abundancijom u površinskom sloju u listopadu (Slika 3.2.4.1.).



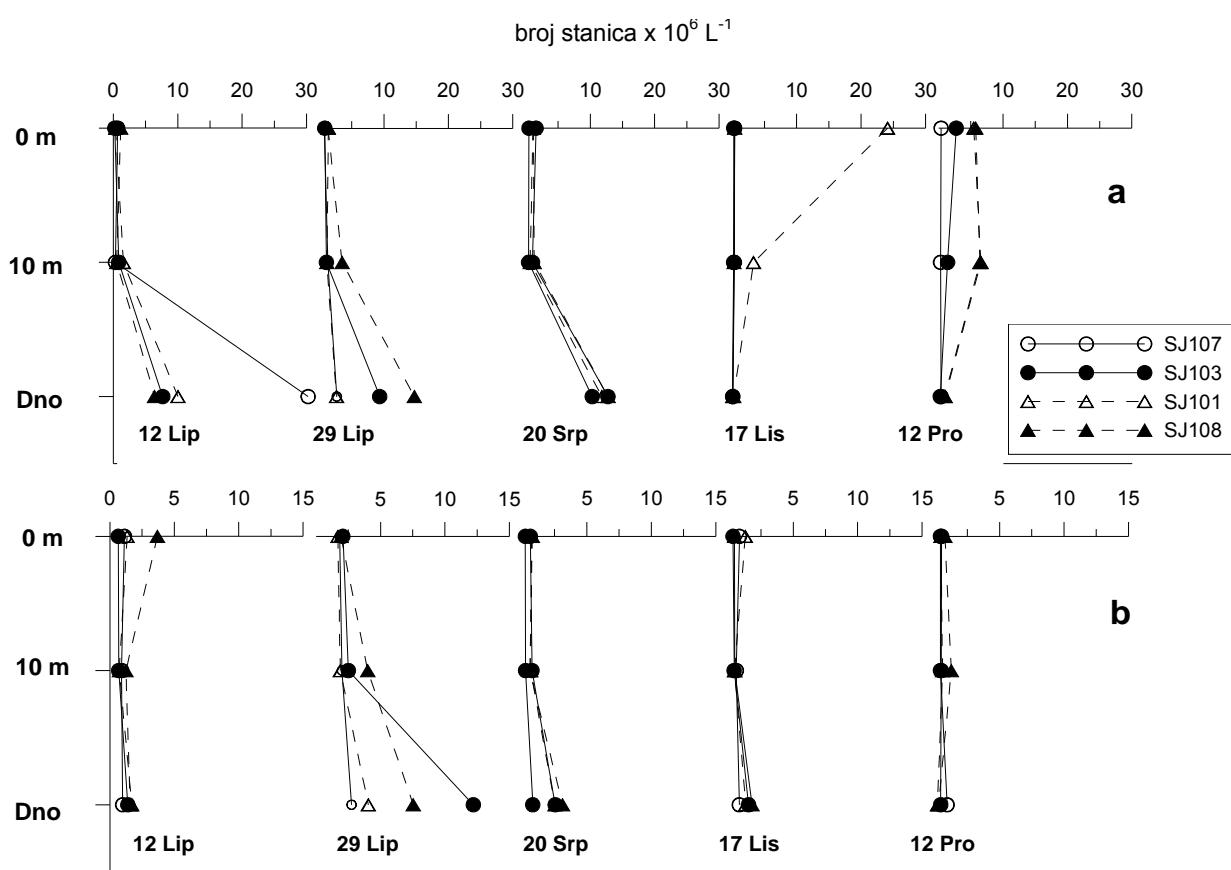
Slika 3.2.4.1. Raspodjela abundancija: a) *Prochlorococcus* i b) *Synechococcus* u vodenom stupcu od lipnja do prosinca 2006.

U prosincu na istočnoj postaji SJ107 i postaji SJ103, koja se nalazi u središnjem dijelu profila, abundancije cijanobakterija *Prochlorococcus* drastično su pale do granice detekcije

($<0,2 \times 10^6$ stanica L $^{-1}$). Budući da su zabilježene abundancije ovih mikroorganizama bile konstantno niže od abundancija ostalih sastavnica pikoplanktona, njihov udio u ukupnoj biomasi pikoplanktona bio je tek 2-3%. Nisu utvrđene statistički značajne korelacije između abundancija populacije *Prochlorococcus*, hranjivih soli, temperature ili saliniteta.

Abundancije populacije *Synechococcus* bile su više u listopadu nego u ljetnom periodu. Povećani protok rijeke Po ($1053 \text{ m}^3 \text{s}^{-1}$) uzrokovao je najniže zabilježene vrijednosti saliniteta, kao i najviše izmjerene vrijednosti hranjivih soli i Chl *a* na profilu (Tablica 3.2.4.1.). Pritom je abundancija populacije *Synechococcus* s 10×10^6 stanica L $^{-1}$ u lipnju, dosegla 100×10^6 stanica L $^{-1}$ u listopadu (Slika 3.2.4.1.). Tijekom ljeta, populacija *Synechococcus* je bila najbrojnija u pridnenom sloju, dok su u listopadu zauzimali površinski sloj, do 10 m dubine. Raspodjela abundancija ovih mikroorganizama nije pokazala značajne razlike među postajama ($F = 0,129$, $p = 0,943$). Razlike po dubinama, prethodno spomenute, nisu bile statistički značajne s obzirom na suprotne obrasce distribucije u ljeto i jesen. Isto tako nisu pronađene statistički značajne korelacije između abundancija cijanobakterije *Synechococcus* i drugih parametara. Tijekom istraživanog perioda cijanobakterije roda *Synechococcus* općenito su bile najbrojniji organizmi čineći i 80% populacije pikofitoplanktona, uz samo nekoliko iznimaka kada su zbog visokih abundancija pikoeukariota činili oko 50% ukupnih abundancija pikofitoplanktona. Međutim, doprinos cijanobakterija *Synechococcus* ukupnoj pikoplanktonskoj biomasi bio je jako sličan doprinosu pikoeukariota.

U pridnenom sloju pikoeukarioti su najvišu abundanciju od 15×10^6 stanica L $^{-1}$ dostigli tijekom ljeta, dok su tijekom jeseni bili brojniji u površinskom sloju, te su u listopadu na zapadnoj postaji SJ101 zabilježene njihove maksimalne vrijednosti od 25×10^6 stanica L $^{-1}$ (Slika 3.2.4.2.).



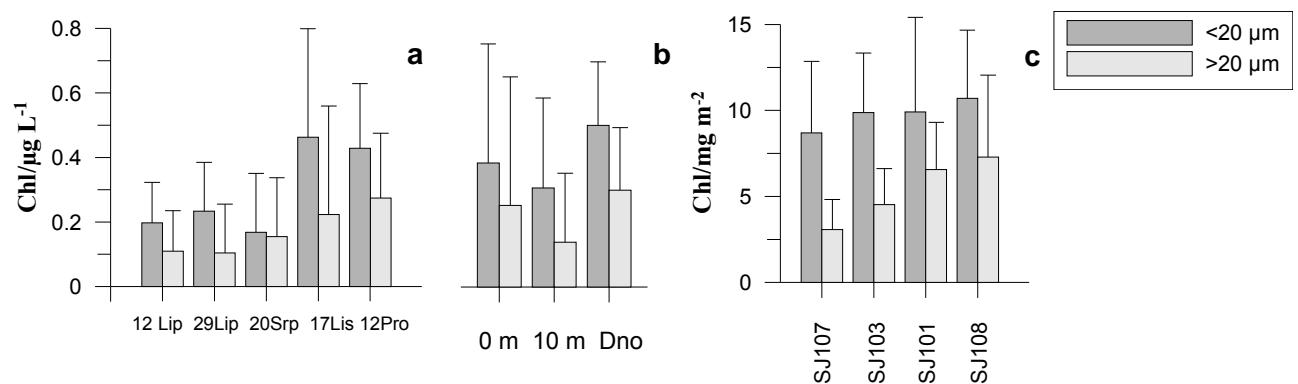
Slika 3.2.4.2. Raspodjela abundancija: a) pikoeukariota i b) nanoeukariota u vodenom stupcu od lipnja do prosinca 2006. godine.

Visoke abundancije pikoeukariota zabilježene su samo na postaji SJ107 u listopadu 2006. godine, što je predstavljalo jedino značajnije odstupanje od niskih abundancija pikoeukariota zabilježenih na svim drugim postajama i mjernim dubinama uzduž profila od lipnja do listopada 2006. godine. U nekoliko navrata, abundancije pikoeukariota su dostigle abundancije cijanobakterija, naročito pri dnu, međutim doprinos pikoeukariota ukupnoj biomasi je bio uglavnom uvijek veći (i do 90%), osim u listopadu kada su cijanobakterije prevladale. Populacije pikoeukariota značajno su korelirale s PO_4^{3-} i DIN kako pri površini, tako i pri dnu ($R = 0,751$, $p = 0,045$ i $R = 0,835$, $p = 0,002$).

Nanoeukarioti su bili mnogo brojniji pri dnu nego na površini tijekom čitavog istraživanog perioda osim u prosincu kada je njihova prisutnost bila minimalna (Slika 3.2.4.2.). Njihove abundancije su se kretele u rasponu od $0,18 - 12,72 \times 10^6$ stanica L^{-1} , s najvišim vrijednostima krajem lipnja.

Usporedba biomasa po skupinama

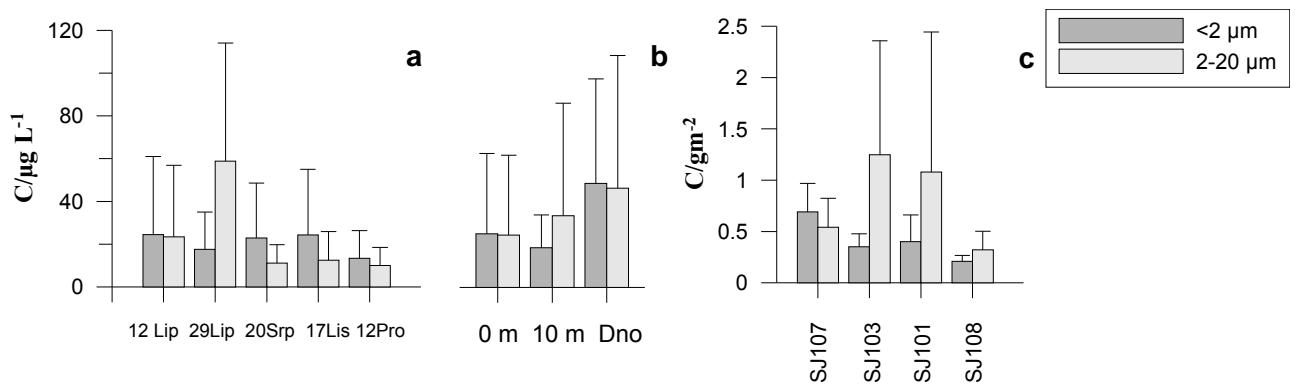
Odnosi između različitih frakcija fitoplanktona i ukupne biomase pokazali su značajnu pozitivnu korelaciju biomase cijanobakterija ($R = 0,450$, $p = 0,002$) i pikoeukariota ($R = 0,363$, $p = 0,026$) s ukupnom biomasom fitoplanktona, dok se korelacije nanoeukariota ili populacije *Prochlorococcus* s ukupnom biomasom nisu pokazale statistički značajne. Nano- frakcija klorofila ($<20 \mu\text{m}$) bila je na svim postajama i dubinama viša od mikro-frakcije ($> 20\mu\text{m}$) tijekom čitavog perioda istraživanja (Slika 3.2.4.3.)



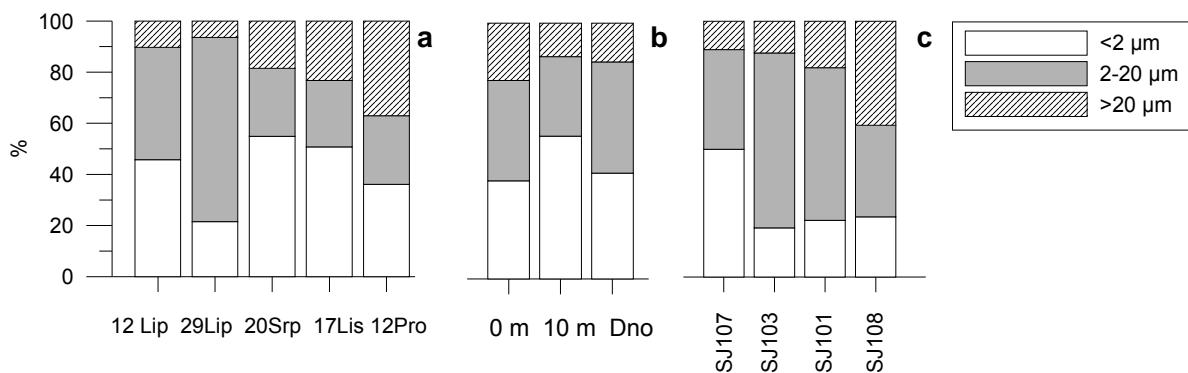
Slika 3.2.4.3. Prosječni sadržaj klorofila dviju frakcija ($>20 \mu\text{m}$ i $<20 \mu\text{m}$) sa standardnom devijacijom za a) svaki teren; b) dubinu i c) prosječni integrirani sadržaj klorofila za svaku postaju.

Piko- frakcija je imala veći doprinos od nano-frakcije u ukupnoj biomasi u svim mjesecima, osim 29. lipnja. Najveći doprinos piko-frakcije među postajama zabilježen je na postaji SJ107, a najmanji na najeutrofnjoj postaji profila, postaji SJ108 (Slika 3.2.4.4.).

Prosječni doprinosi mikro-, nano- i piko-frakcije ukupnoj biomasi iznosili su 19%, 43% odnosno 38% te varirali među mjesecima, dubinama, i postajama. (Slika 3.2.4.5.). Najveći doprinos nanoeukariota ukupnoj biomasi uspoređujući sve navedene datume uzorkovanja zabilježen je u lipnju (ANOVA $F = 4,537$, $p = 0,003$), dok su usporedbom svih četiriju postaja, pikoeukarioti najveći udio biomase imali na oligotrofnoj istočnoj postaji SJ107 (ANOVA, $F = 5,969$, $p = 0,006$).



Slika 3.2.4.4. Prosječne biomase ($\mu\text{gC L}^{-1}$) piko- ($<2 \mu\text{m}$) i nano- frakcije ($2-20 \mu\text{m}$), za: a) svaki datum uzorkovanja; b) dubinu i c) prosječne integrirane vrijednosti (gC m^{-2}) za svaku postaju.

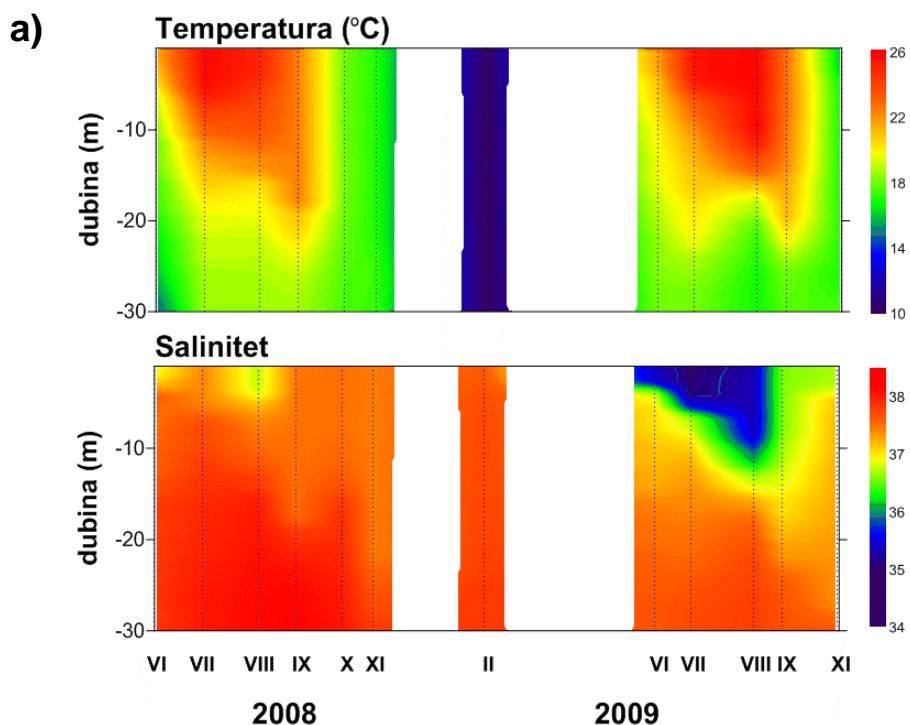


Slika 3.2.4.5. Procjena doprinosa piko-, nano-i mikro- frakcije ukupnoj fitoplanktonskoj biomasi za: a) svaki datum uzorkovanja; b) dubinu i c) prosječne integrirane vrijednosti (gC m^{-2}) za svaku postaju.

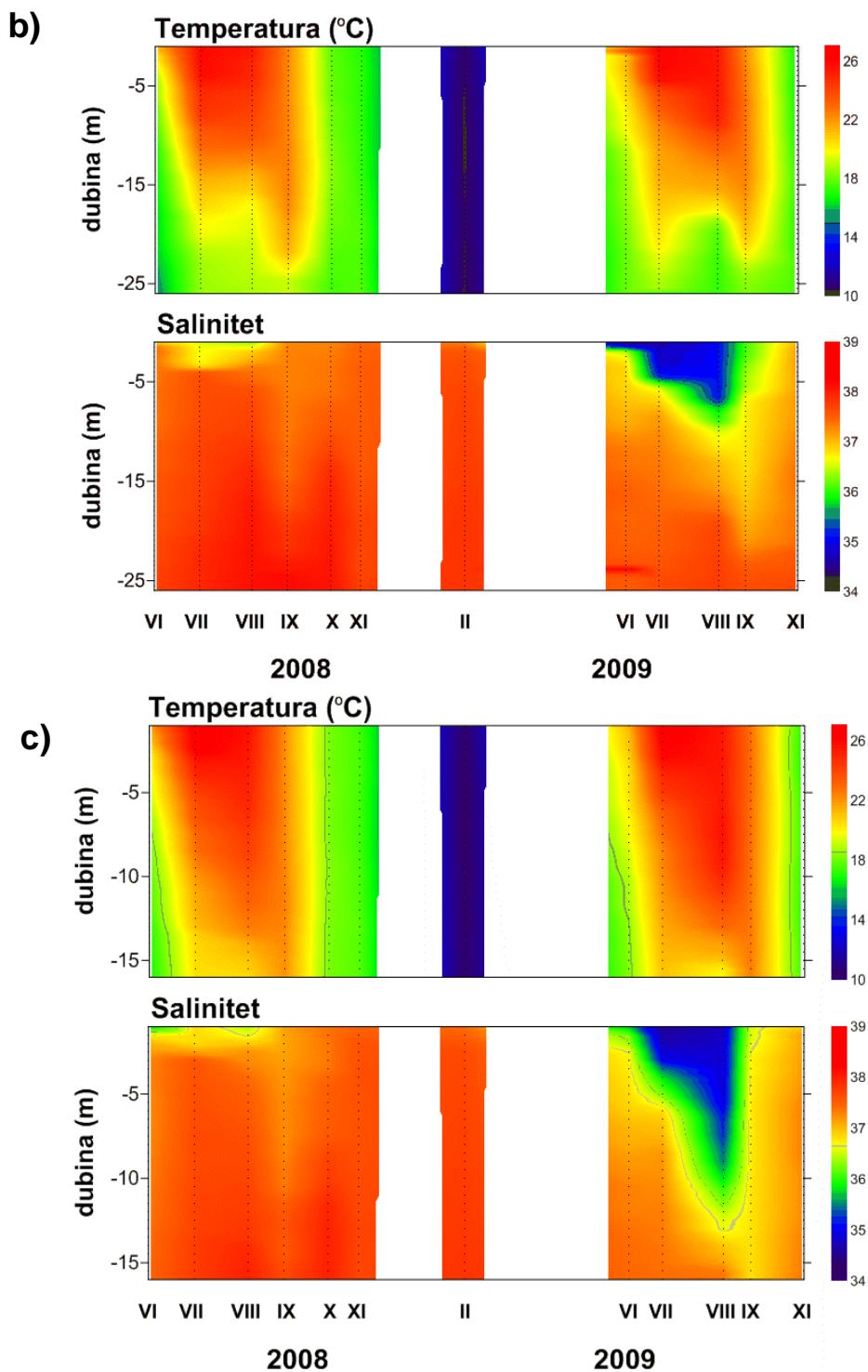
3.2.5. Sezonska dinamika autotrofne zajednice u Limskom kanalu

Fizikalno-kemijski čimbenici

Tijekom ljeta 2008. i 2009. godine voden stupac je bio raslojen, dok je tijekom jeseni zabilježen proces vertikalnog miješanja (Slika 3.2.5.1.a, b, c).



Slika 3.2.5.1. Prostorna raspodjela temperature i saliniteta za postaju
a) LIM1 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.



Slika 3.2.5.1. Prostorna raspodjela temperature i saliniteta za postaje:

b) LIM2 i c) postaju LIM3 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.

Srednje vrijednosti nitrata (NO_3^-), nitrita (NO_2^-), amonijaka (NH_4^+), fosfata (PO_4^{3-}) i silikata (SiO_4) za sve tri postaje prikazani su u Tablici 3.2.5.1.

Tablica 3.2.5.1. Srednjaci (\pm standardne devijacije) i rasponi ($\mu\text{mol L}^{-1}$) nitrata (NO_3^-), nitrita (NO_2^-), amonijaka (NH_4^+), otopljenog anorganskog dušika (DIN), fosfata (PO_4^{3-}) i silikata (SiO_4) u Limskom kanalu tijekom istraživanja.

Date	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	DIN	PO_4^{3-}	SiO_4
Lip-08	1,54 ($\pm 2,45$)	0,06 ($\pm 0,05$)	0,46 ($\pm 0,35$)	2,06 ($\pm 2,48$)	0,07 ($\pm 0,06$)	4,19 ($\pm 3,66$)
	0,20-8,27	0,01-0,15	0,12-1,15	0,38-8,68	0,02-0,27	0,77-11,21
Srp-08	0,83 ($\pm 1,45$)	0,05 ($\pm 0,03$)	0,29 ($\pm 0,24$)	1,16 ($\pm 1,46$)	0,03 ($\pm 0,05$)	3,29 ($\pm 1,98$)
	0,05-4,86	0,01-0,10	0,12-0,92	0,20-5,15	0,00-0,17	1,26-7,33
Kol-08	1,36 ($\pm 2,11$)	0,12 ($\pm 0,08$)	0,86 ($\pm 0,83$)	2,34 ($\pm 2,33$)	0,06 ($\pm 0,10$)	4,20 ($\pm 3,56$)
	0,06-7,88	0,03-0,31	0,20-2,72	0,30-8,63	0,00-0,33	0,44-12,29
Ruj-08	1,70 ($\pm 2,28$)	0,11 ($\pm 0,07$)	1,23 ($\pm 1,02$)	3,05 ($\pm 2,48$)	0,07 ($\pm 0,15$)	2,96 ($\pm 2,79$)
	0,07-8,92	0,04-0,28	0,26-4,15	0,38-9,99	0,00-0,54	0,83-9,52
Lis-08	1,18 ($\pm 0,71$)	1,20 ($\pm 1,57$)	0,46 ($\pm 0,12$)	2,84 ($\pm 2,10$)	0,08 ($\pm 0,13$)	5,91 ($\pm 5,73$)
	0,37-2,56	0,11-4,70	0,31-0,70	0,83-7,84	0,01-0,46	1,24-19,51
Stu-08	2,48 ($\pm 0,68$)	1,84 ($\pm 0,61$)	0,35 ($\pm 0,08$)	4,67 ($\pm 1,21$)	0,14 ($\pm 0,10$)	7,28 ($\pm 1,75$)
	1,49-3,65	0,51-2,55	0,27-0,53	3,03-6,63	0,05-0,41	5,15-11,21
Velj-09	5,23 ($\pm 7,25$)	0,50 ($\pm 0,09$)	0,31 ($\pm 0,16$)	6,03 ($\pm 7,38$)	0,07 ($\pm 0,08$)	5,71 ($\pm 6,49$)
	1,06-20,25	0,40-0,66	0,12-0,58	1,68-21,27	0,00-0,25	1,15-19,16
Lip-09	1,63 ($\pm 2,62$)	0,10 ($\pm 0,03$)	0,71 ($\pm 0,42$)	2,44 ($\pm 2,85$)	0,06 ($\pm 0,06$)	2,58 ($\pm 2,61$)
	0,06-7,93	0,06-0,15	0,20-1,64	0,32-8,94	0,01-0,19	0,27-8,18
Srp-09	0,24 ($\pm 0,23$)	0,05 ($\pm 0,04$)	0,61 ($\pm 0,64$)	0,90 ($\pm 0,86$)	0,08 ($\pm 0,05$)	1,97 ($\pm 2,85$)
	0,06-0,70	0,00-0,15	0,22-2,07	0,30-2,92	0,01-0,18	0,06-8,91
Kol-09	1,08 ($\pm 0,64$)	0,11 ($\pm 0,07$)	1,20 ($\pm 1,12$)	2,39 ($\pm 1,51$)	0,08 ($\pm 0,08$)	3,99 ($\pm 4,24$)
	0,11-2,23	0,03-0,28	0,18-3,84	0,43-5,60	0,03-0,27	0,95-11,79
Ruj-09	0,77 ($\pm 0,85$)	0,13 ($\pm 0,17$)	0,93 ($\pm 1,19$)	1,82 ($\pm 2,04$)	0,08 ($\pm 0,16$)	5,43 ($\pm 5,13$)
	0,05-2,34	0,03-0,52	0,26-3,91	0,48-6,77	0,00-0,57	2,16-18,61
Stu-09	5,02 ($\pm 6,01$)	0,70 ($\pm 0,13$)	0,70 ($\pm 0,14$)	6,42 ($\pm 6,10$)	0,12 ($\pm 0,14$)	11,94 ($\pm 6,99$)
	1,46-23,10	0,50-0,98	0,46-0,94	2,53-24,76	0,01-0,39	6,58-30,80

Tijekom priljeva slatke vode u veljači 2009. (Tablica 3.2.5.1.) koncentracije DIN-a dosegle su prilično visoke vrijednosti u površinskom sloju na svim postajama, međutim maksimalna koncentracija zabilježena je u studenom 2009. na postaji LIM3 ($24,76 \mu\text{mol L}^{-1}$). Raspodjela nitrata i nitrita nije se značajno razlikovala između tri istraživane postaje, no najviše

koncentracije nitrata zabilježene su u površinskom sloju na postaji LIM3, a nitrita u pridnenom sloju na LIM2. Koncentracije amonijaka su bile općenito više u pridnenom sloju, gdje su na postaji LIM2 u rujnu 2008. dosegli maskimalnu vrijednost od $4,15 \mu\text{mol L}^{-1}$. Koncentracije fosfata su na čitavom profilu tijekom istraživanog perioda bile iznimno niske, često i ispod granice detekcije (npr. na postaji LIM1 u srpnju i rujnu), dok je najviša koncentracija ($0,57 \mu\text{mol L}^{-1}$) utvrđena u pridnenom sloju u rujnu 2009. na postaji LIM2. Zabilježene koncentracije silikata su bile općenito veće u odnosu na koncentracije drugih hranjivih soli, varirajući od $0,06 \mu\text{mol L}^{-1}$ u srpnju 2009. do iznimno visoke vrijednosti od $30,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ u studenom 2009. godine.

Klorofil a (Chl a)

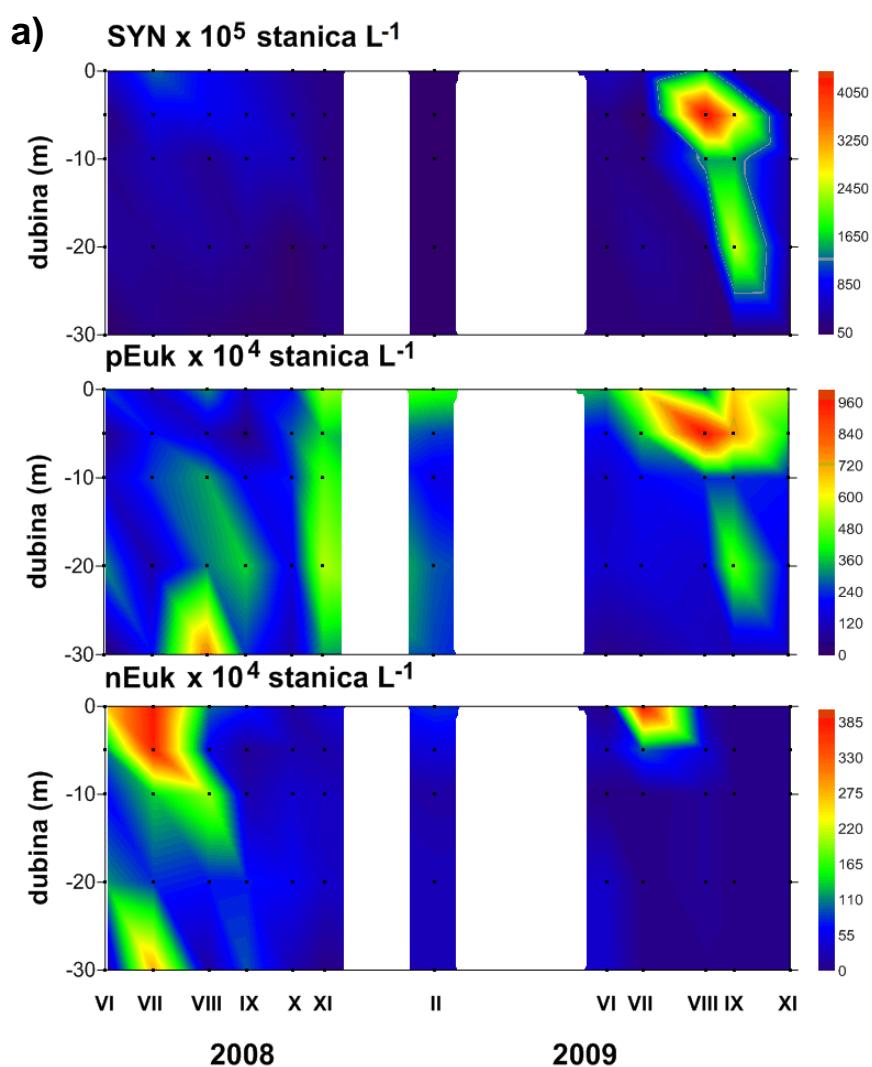
Najviše vrijednosti integriranog klorofila zabilježene su u kolovozu 2008 za postaju LIM1, dok su najviše vrijednosti za postaje LIM2 i LIM3 zabilježene u studenom 2009. (Tablica 3.2.5.2.). Na svim postajama najniže vrijednosti klorofila su zabilježene u veljači 2009.

Tablica 3.2.5.2. Vrijednosti ukupnog i nano-klorofila (mg m^{-2}) integrirane za čitav voden stupac u Limskom kanalu tijekom istraživanog perioda

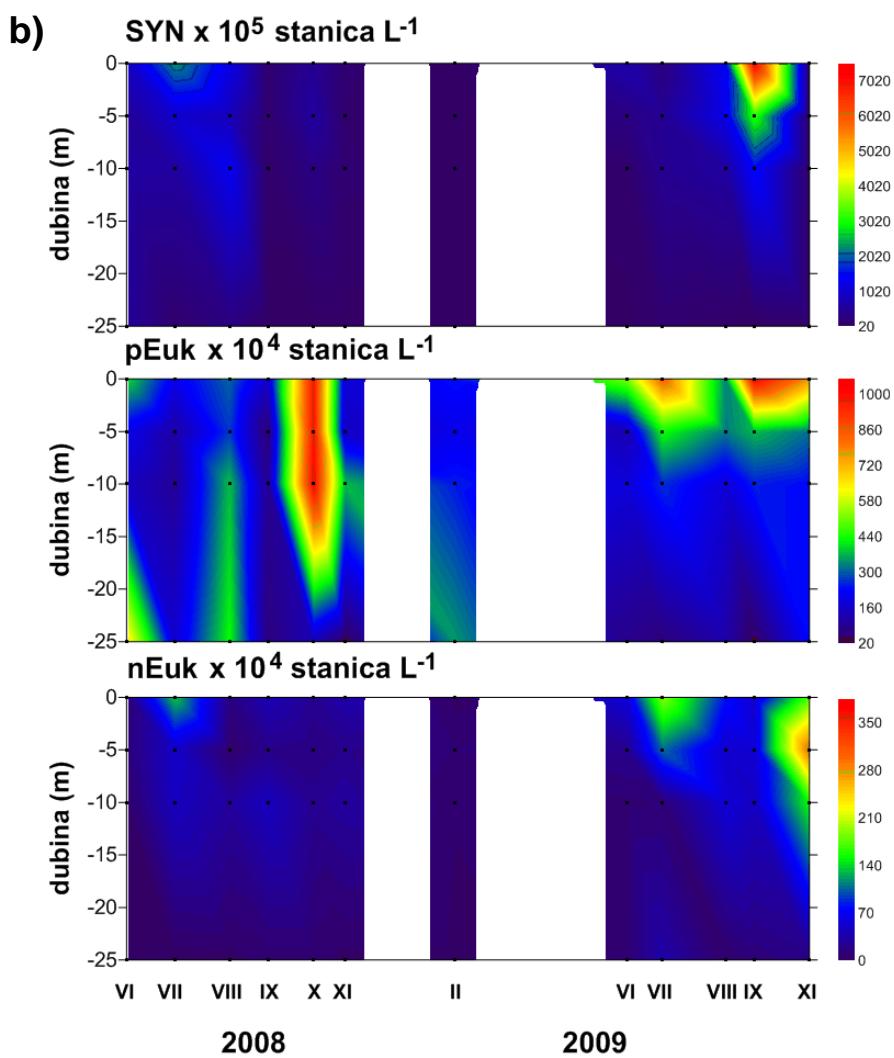
Date	LIM1		LIM2		LIM3	
	Ukupni Chl a	Nano Chl a	Ukupni Chl a	Nano Chl a	Ukupni Chl a	Nano Chl a
Lip-08	13.35	10.52	11.90	11.14	14.47	12.63
Srp-08	20.24	14.08	25.57	15.97	12.63	11.12
Kol-08	33.87	21.77	16.63	11.56	12.40	8.89
Ruj-08	26.41	13.51	19.21	12.87	14.93	12.82
Lis-08	22.91	14.23	23.41	16.72	29.53	17.53
Stu-08	20.37	14.34	17.20	13.89	14.35	10.04
Velj-09	8.32	7.47	7.95	6.39	5.74	4.89
Lip-09	21.64	9.20	35.18	17.31	17.52	7.78
Srp-09	18.33	13.77	17.18	13.64	14.20	12.20
Kol-09	19.32	15.80	32.04	21.98	20.86	15.83
Ruj-09	16.99	16.38	21.81	19.92	23.08	20.46
Stu-09	30.48	17.95	56.73	16.57	33.50	20.53

Sastav i veličinska struktura fitoplanktona

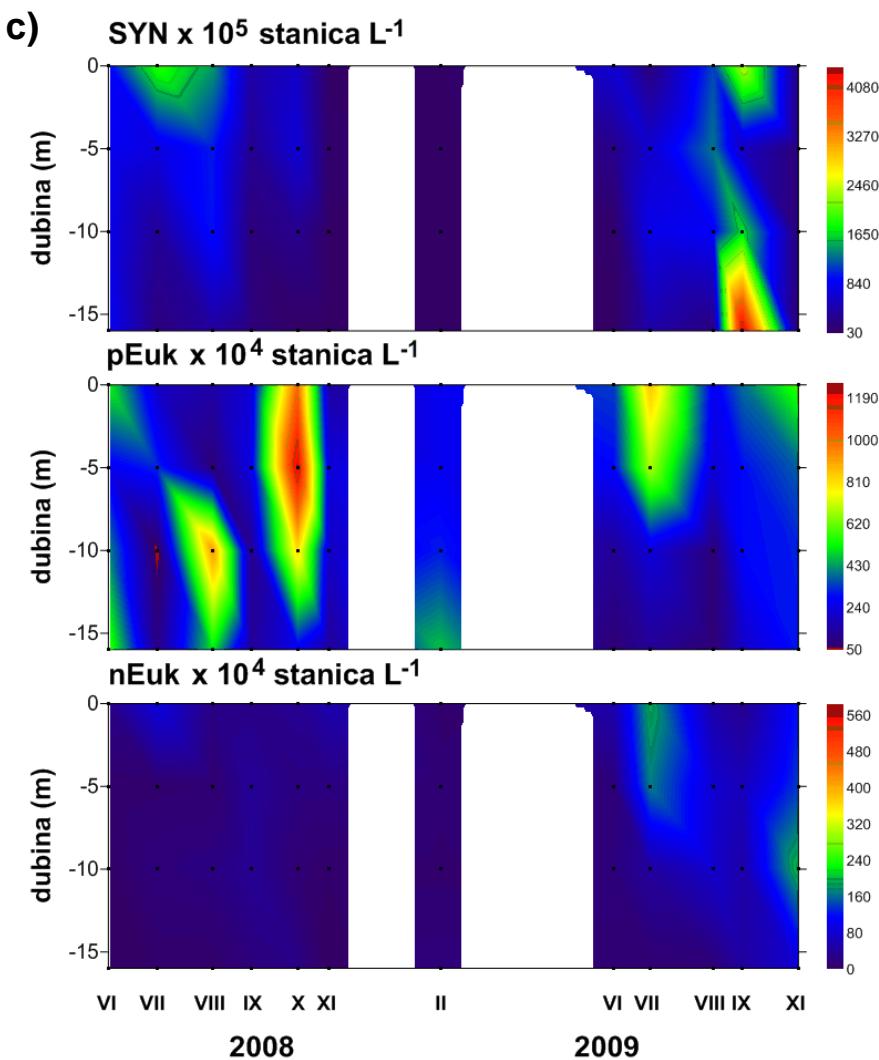
U razdoblju od lipnja 2008. do studenog 2009. godine autotrofnom zajednicom Limskog kanala abundancijom je dominirao pikofitoplankton, dok je biomasom dominirao mikrofitoplankton. Abundancija pikofitoplankton bila je veća u jesenskom razdoblju, s izraženim maksimumom cijanobakterija roda *Synechococcus* u rujnu 2009. ($7,2 \times 10^8$ stanica L $^{-1}$), te pikoeukariota u listopadu 2008. ($1,4 \times 10^7$ stanica L $^{-1}$) (Slika 3.2.5.2.).



Slika 3.2.5.2. Prostorna raspodjela abundancija cijanobakterija *Synechococcus* (SYN), pikoeukariota (pEuk) i nanoeukariota (nEuk) na a) postaji LIM1 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.

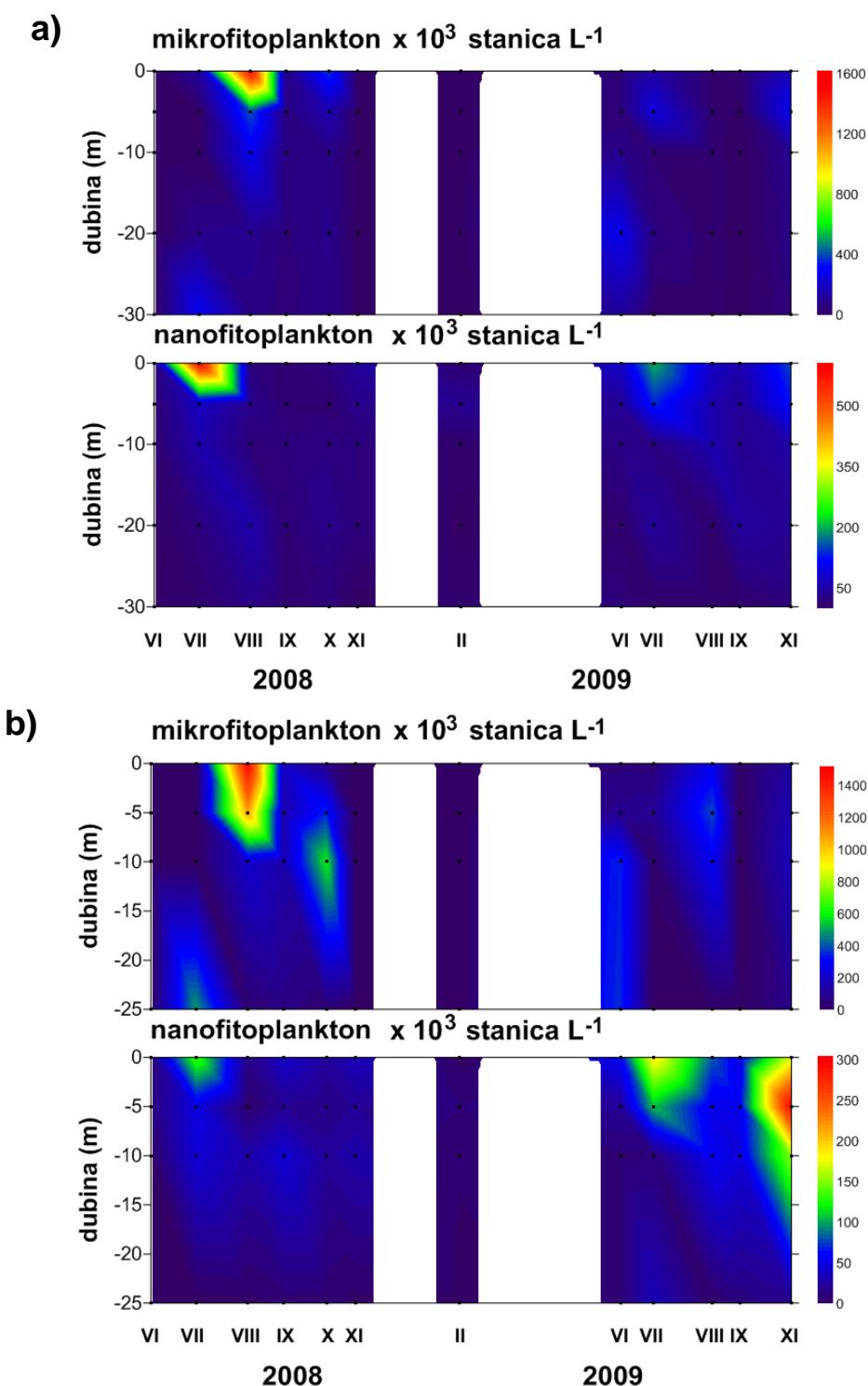


Slika 3.2.5.2. Prostorna raspodjela abundancija cijanobakterija *Synechococcus* (SYN), pikoeukariota (pEuk) i nanoeukariota (nEuk) na b) postaji LIM2 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.

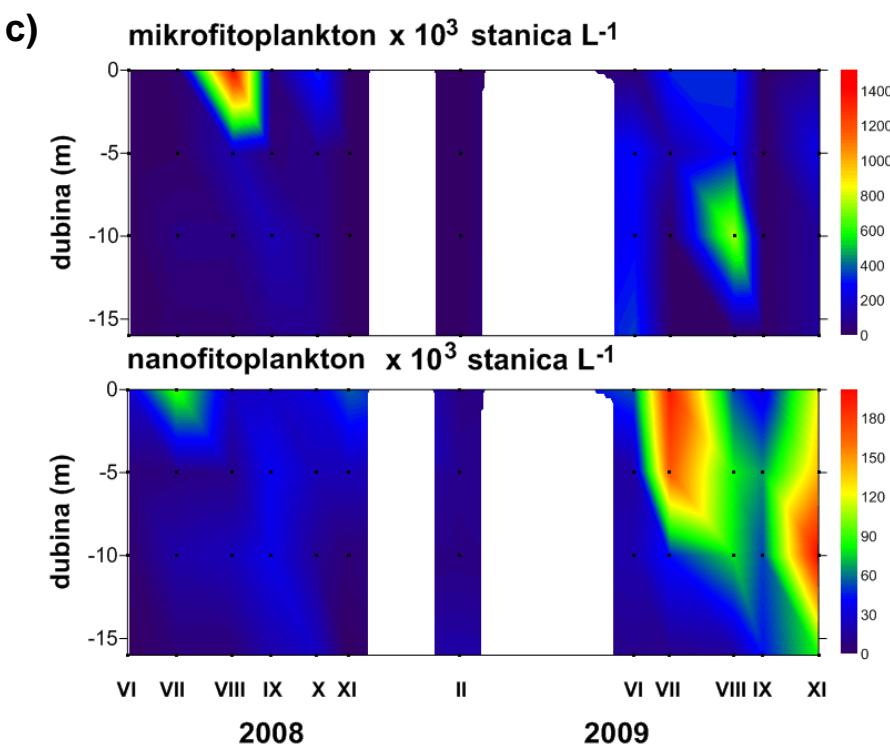


Slika 3.2.5.2. Prostorna raspodjela abundancija cijanobakterija *Synechococcus* (SYN), pikoeukariota (pEuk) i nanoeukariota (nEuk) na c) postaji LIM3 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.

U studenom 2008., broj pikoeukariota drastično je smanjen na $2,6 \times 10^5$ stanica L⁻¹. Nanoeukarioti (tj. mali nanofitoplankton, mjereni PC-om) dosegli su maksimalne vrijednosti u lipnju 2008. ($5,7 \times 10^6$ stanica L⁻¹) (Slika 3.2.5.2.c), dok su za mikro-i nanofitoplankton najviše vrijednosti zabilježene u ljetnom periodu (kolovoz 2008. srpanj 2008.) (Slika 3.2.5.3.). Najistaknutija skupina unutar mikrofitoplanktona bile su dijatomeje s maksimalnom abundancijom ljeti na postaji LIM1 (podaci nisu prikazani).

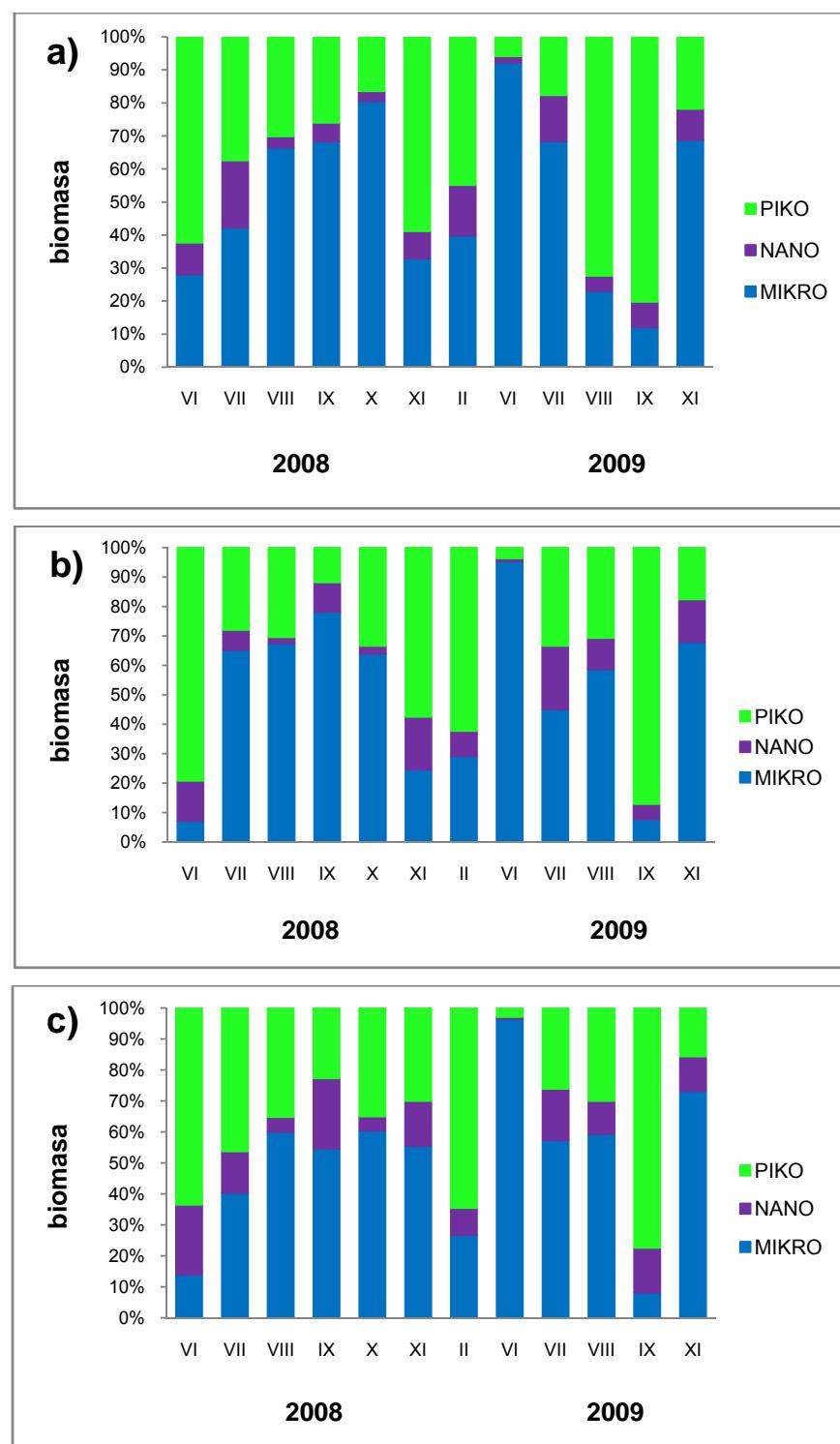


Slika 3.2.5.3. Prostorna raspodjela abundancija mikrofitoplanktona i nanofitoplanktona na postajama: a) LIM1 i b) LIM2 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.



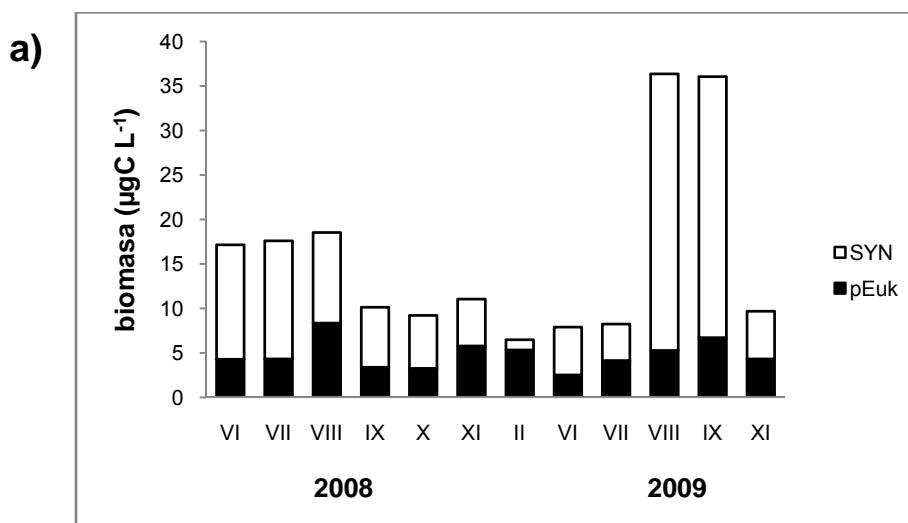
Slika 3.2.5.3. Prostorna raspodjela abundancija mikrofitoplanktona i nanofitoplanktona na postaji c) LIM3 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.

Tijekom ljetnog perioda 2008. i 2009. godine zabilježene su promjene u dominaciji biomasom. Dominacija pikofitoplanktona iz lipnja 2008. godine prekinuta je dominacijom mikro-frakcije od rujna 2008. do lipnja 2009. godine, da bi zatim ponovno, u rujnu 2009. biomasom prevladavao pikofitoplankton. U lipnju 2008. godine pikofitoplankton je dominirao s 62% udjela u ukupnoj biomasi na postaji LIM1, 79% na postaji LIM2, te 63% na postaji LIM3. U lipnju 2009. godine mikrofitoplankton je doprinosio s preko 90 % udjela u ukupnoj biomasi u Limskom kanalu na svim postajama. U rujnu 2008. godine mikro-frakcija je dominirala s nešto manjim udjelima (s 68%, 78 %, te 54% udjela na postajama LIM1, LIM2 i LIM3), dok je u rujnu 2009. godine piko-frakcija činila 80% udjela u ukupnoj biomasi na postaji LIM1, 87% na postaji LIM2, te 77% na postaji LIM3. Obje frakcije su imale maksimume na postaji LIM2 - mikrofitoplankton u pridnenom sloju u lipnju 2009. (415,6 $\mu\text{gC L}^{-1}$), a pikofitoplankton u površinskom sloju u rujnu 2009. godine (159,5 $\mu\text{gC L}^{-1}$) (Slika 3.2.5.4.).

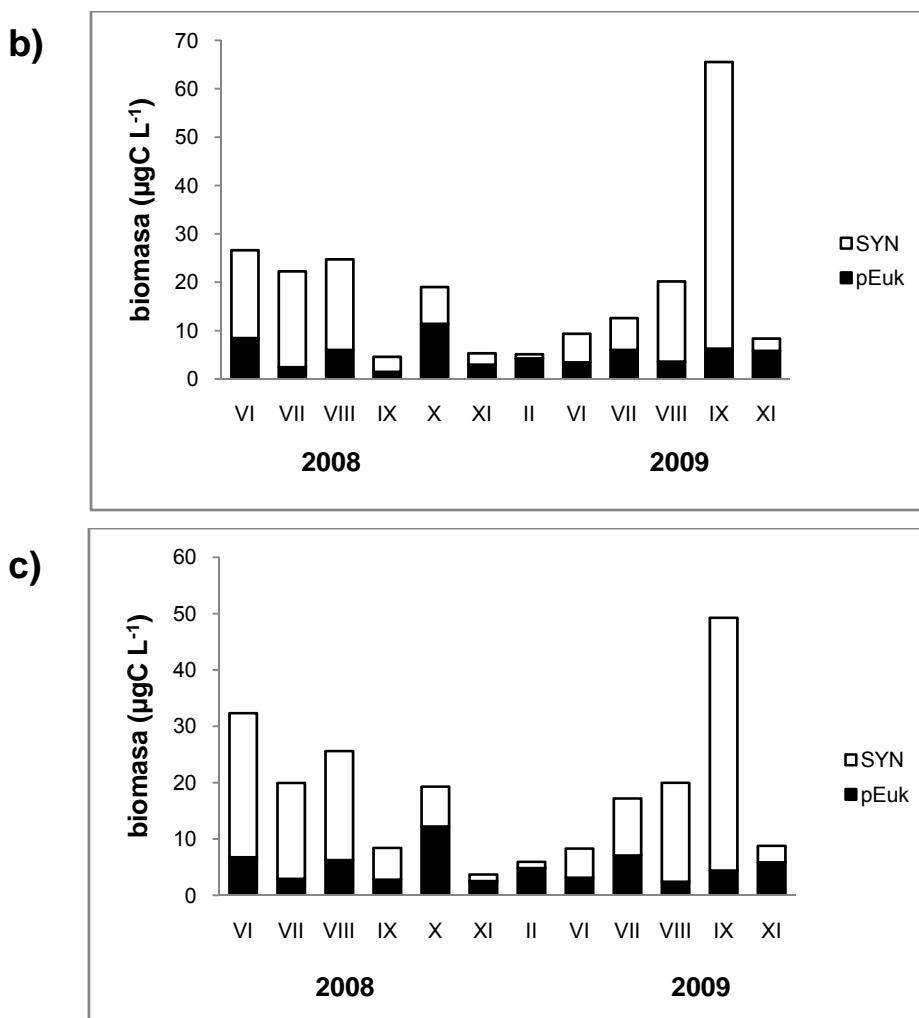


Slika 3.2.5.4. Procjena doprinosa piko-, nano-i mikro- frakcije ukupnoj fitoplanktonskoj biomasi na postajama: a) LIM1; b) LIM2 i c) LIM3 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.

Prosječni doprinos pikofitoplanktona ukupnoj biomasi tijekom čitavog istraživanog perioda iznosio je 39%, nanoplanktona 10% i mikroplanktona 51%. Biomasom mikrofitoplanktona dominirale su različite dijatomeje, dok je *Synechococcus* dominirao pikofitoplanktonskom biomasom (Slika 3.2.5.5.). Biomasa dijatomeja kretala se u rasponu od 0,1 do $441,2 \mu\text{gC L}^{-1}$, dok je biomasa *Synechococcus* populacije varirala rasponom od 0 do $144,2 \mu\text{gC L}^{-1}$. Biomasa nanofitoplanktona razlikovala se između postaja i sezona tijekom perioda istraživanja (ANOVA, $F = 3,122$, $p < 0,05$). Najviše vrijednosti zabilježene su u srpnju 2009. Na postajama LIM1 i LIM3 nano- frakcijom biomase dominirali su dinoflagelati, dok su na postaji LIM2 prevladavali kokolitoforidi (podaci nisu prikazani).



Slika 3.2.5.5. Prosječne biomase roda *Synechococcus* (SYN) i pikoeukariota (pEuk) na postaji a) LIM1 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.



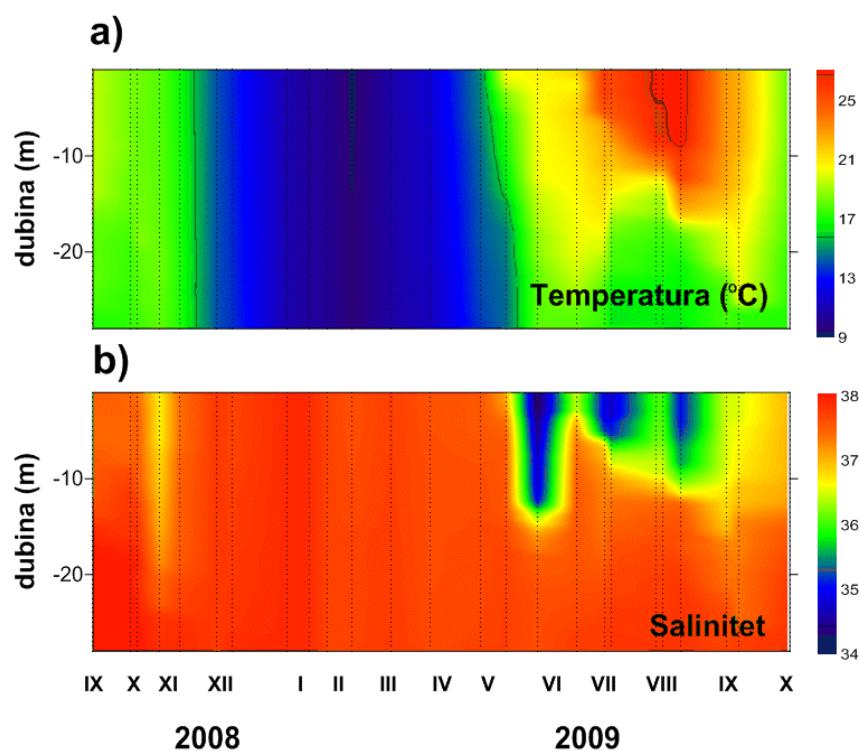
Slika 3.2.5.5. Prosječne biomase roda *Synechococcus* (SYN) i pikoeukariota (pEuk) na postajama b) LIM2 i c) LIM3 u Limskom kanalu od lipnja 2008. do studenog 2009. godine.

Populacija cijanobakterije roda *Synechococcus* pokazala je pozitivnu korelaciju s temperaturom ($R = 0,38$, $p < 0,001$, $N = 156$), te negativnu korelaciju s fosfatima ($R = -0,31$, $p < 0,001$, $N = 156$). Statistički značajne razlike abundancija odnosno biomasa piko-, nano- i mikrofitoplanktona između postaja LIM1, LIM2 i LIM3 nisu uočene.

3.2.6. Sezonske varijacije u strukturi pikoplanktonske zajednice u obalnoj zoni sjevernog Jadrana (postaja RV001)

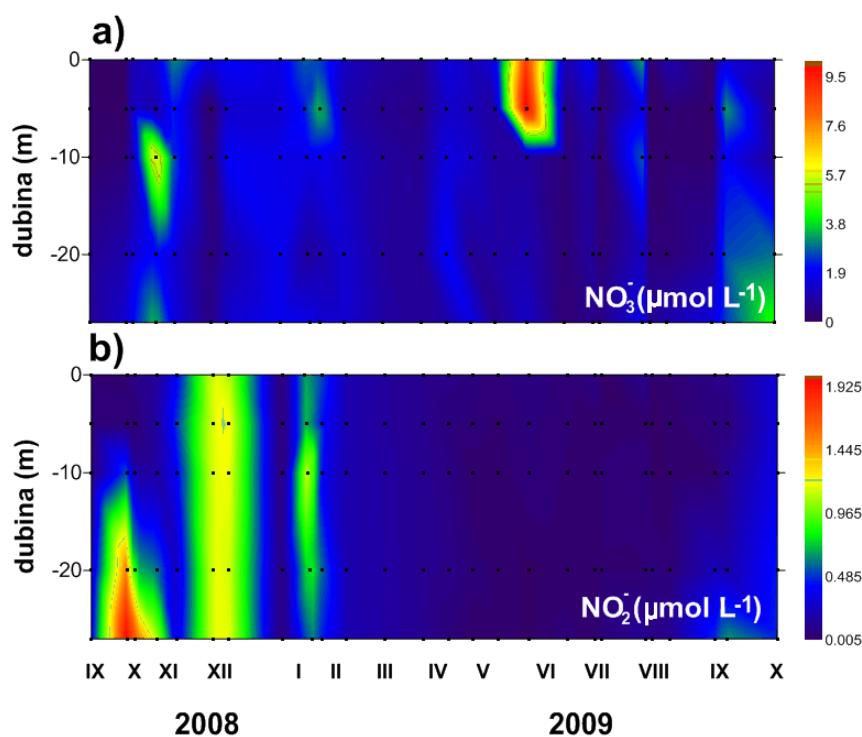
Fizikalno-kemijske osobitosti mora istraživane postaje

Tijekom perioda istraživanja od rujna 2008. do listopada 2009. godine na postaji RV001 temperatura morske vode kretala se u rasponu od 9,3 °C (veljača 2009., 5 m) do 27,5 °C (kolovoz 2009., površina), dok se salinitet kretao između 34,22 (lipanj 2009, površina) i 38,18 (rujan 2009., dno). Vrijednosti temperature i saliniteta pokazale su uobičajeni sezonski trend s izraženim periodom stratifikacije vodenog stupca koji je počeo krajem svibnja, a završio krajem rujna (Slika 3.2.6.1). Salinitet je bio ujednačen tijekom čitave godine sa značajnim padom na 2 m dubine u periodu proljeće-ljeto (Slika 3.2.5.1.b), tipičnim za ovo područje (Ivančić i sur., 2010).

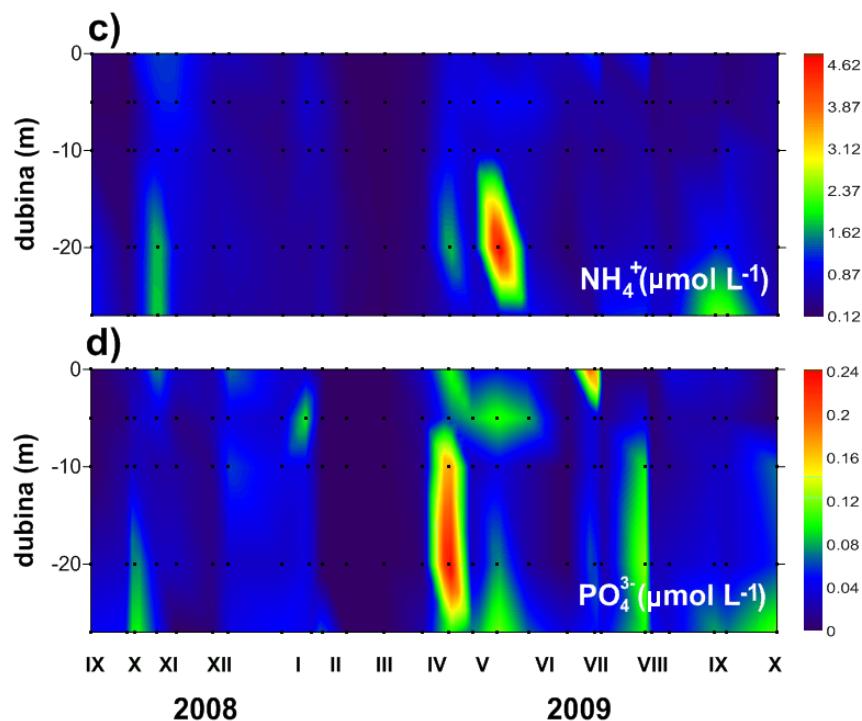


Slika 3.2.6.1. Temperatura (a) i salinitet (b) na postaji RV001 od rujna 2008. do listopada 2009. godine.

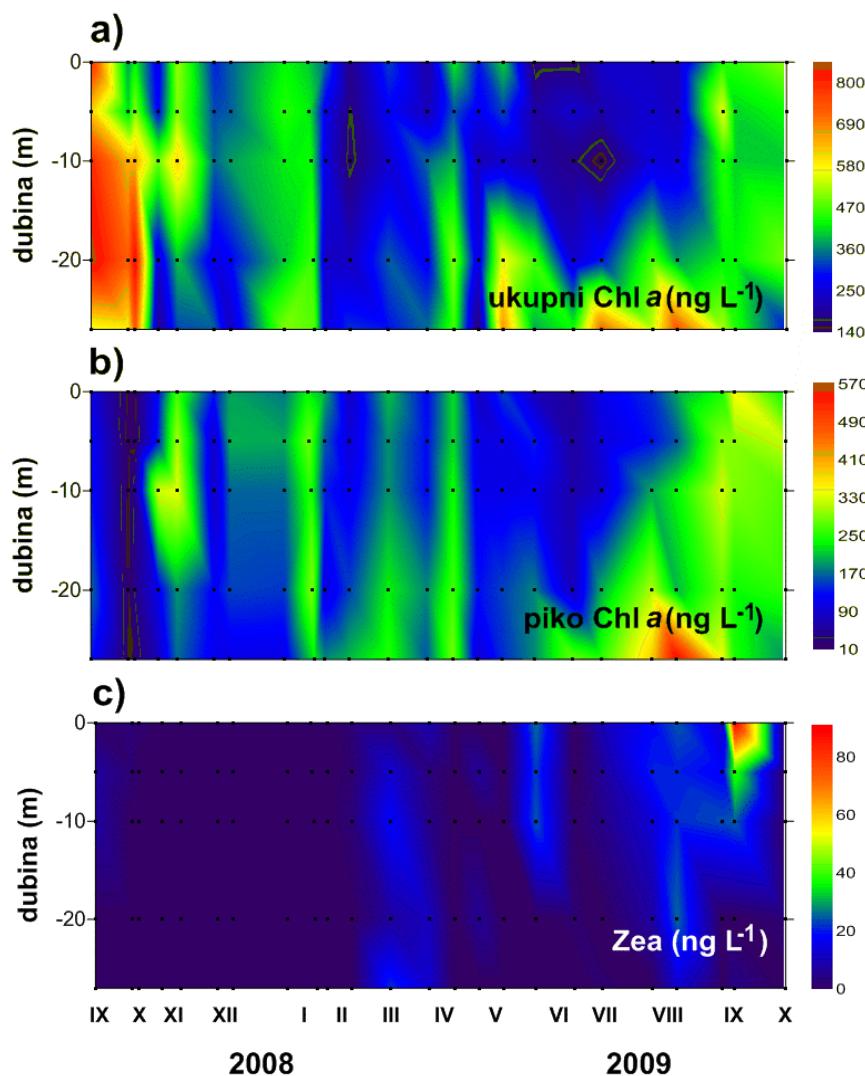
Najniže vrijednosti koncentracija hranjivih soli zabilježene su u površinskom sloju ($0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$ za NO_3^- u prosincu, $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ za NO_2^- u kolovozu, na 5 metara i $0,12 \mu\text{mol L}^{-1}$ NH_4^+ u listopadu na površini). Zabilježene koncentracije fosfata su bile vrlo niske, osobito u veljači i ožujku, s vrijednostima ispod granica detekcije ($<0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$) duž čitavog vodenog stupca. Najveća vrijednost za fosfate ($0,26 \mu\text{mol L}^{-1}$) zabilježena je u travnju na 20 m. U periodu stratifikacije vrijednosti hranjivih soli postupno su se povećale, dosegnuvši maksimalne vrijednosti u pridnenom sloju $0,26 \mu\text{mol L}^{-1}$ za PO_4^{3-} u travnju, $5,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ za NH_4^+ u svibnju (20 m), te $2,07 \mu\text{mol L}^{-1}$ za NO_2^- u listopadu (27 m). Iznimku čine nitrati s maksimalnim dosegnutim vrijednostima od $10,34 \mu\text{mol L}^{-1}$ u lipnju, na 5 m u lipnju (Slika 3.2.6.2.).



Slika 3.2.6.2. Koncentracije hranjivih soli na postaji RV001 od rujna 2008. do listopada 2009.: a) NO_3^- ; b) NO_2^-



Slika 3.2.6.2. Koncentracije hranjivih soli na postaji RV001 od rujna 2008. do listopada 2009.: c) NH_4^+ i d) PO_4^{3-} .



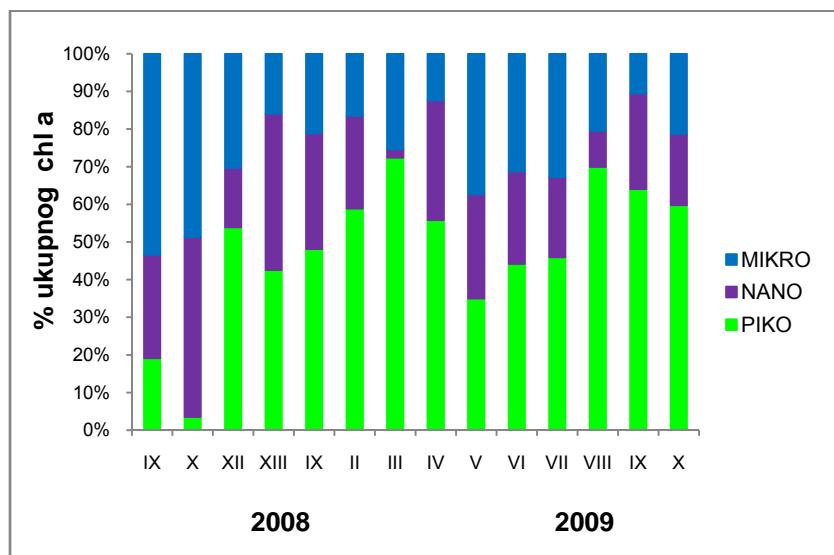
Slika 3.2.6.3. Vertikalna raspodjela koncentracija klorofila *a* (Chl *a*):a) ukupni Chl *a*; b) piko Chl *a* i c) zeaksantina (Zea) na postaji RV001 od rujna 2008. do listopada 2009.

Koncentracije Chl *a* bile su općenito vrlo niske, varirajući u rasponu od najviših 853,10 ng L⁻¹ u rujnu 2008. godine do najnižih 130 ng L⁻¹ u srpnju 2009. godine (Slika 3.2.6.3.a i b).

Piko frakcija klorofila (<3 um) varirala je od 14 ng L⁻¹ u listopadu 2008. godine do 569 ng L⁻¹ dosegnutim u kolovozu 2009. godine. Uspoređujući udjele piko-, nano- i mikro- frakcija u ukupnoj količini klorofila, uočava se cjelogodišnja dominacija piko-frakcije s najvišim prosječnim doprinosom od 72% u ožujku 2009. Jedina iznimka bio je period fitoplanktonskog cvata početkom jeseni 2008. kada je mikro- frakcija činila gotovo 88% ukupnog klorofila (Slika 3.2.6.4.). Statistički značajne korelacije između raspodjela klorofila

i abundancija populacije *Synechococcus* ili pikoplanktona nisu uočene, dok su heterotrofne bakterije korelirale s piko- frakcijom klorofila ($p < 0,05$, $R = 0,286$, $n = 107$).

Vrijednosti biomarkera zeaksantina bile su iznimno niske tijekom čitavog perioda uzorkovanja, često na granici detekcije. Najveće vrijednosti ($89,28 \text{ ng L}^{-1}$) uočene su u površinskom sloju u rujnu 2009 godine (Slika 3.2.6.3. c).

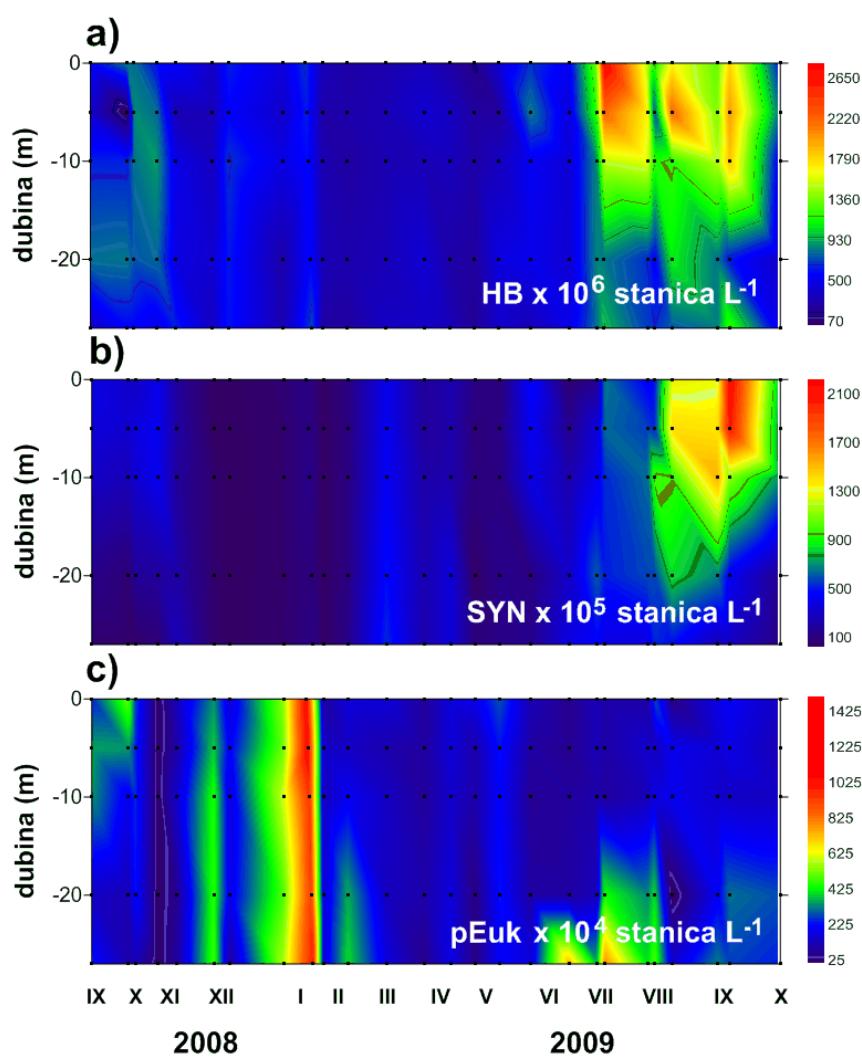


Slika 3.2.6.4. Prosječni integrirani sadržaj piko-, nano- i mikro- frakcije Chl *a* tijekom perioda rujan 2008. - listopad 2009. na postaji RV001.

Abundancije pikoplanktona

Pikoplanktonskom zajednicom brojčano su dominirale heterotrofne bakterije . Njihove abundancije su varirale od 3.8×10^7 stanica L^{-1} (u svibnju 2009. godine na 5 m dubine), do 270×10^7 stanica L^{-1} (u kolovozu 2009. godine u površinskom sloju) (Slika 3.2.6.5 a). Cijanobakterije roda *Synechococcus* dominirale su autotrofnom zajednicom (općenito $> 80\%$) s abundancijama od 2.4×10^7 stanica L^{-1} (u prosincu 2008. godine na 10 m) do 21.0×10^7 stanica L^{-1} (u rujnu u površinskom sloju) (Slika 3.2.6.5.b). Abundancije heterotrofnih bakterija i cijanobakterija *Synechococcus* su značajno pozitivno korelirale s temperaturom ($p > 0,001$, $R = 0,70$, $n = 129$; $p < 0,001$, $R = 0,60$, $n = 130$), te negativno sa salinitetom ($p < 0,001$, $R = -0,59$, $n = 130$; $p < 0,001$, $R = -0,49$, $n = 130$). Uočena je i

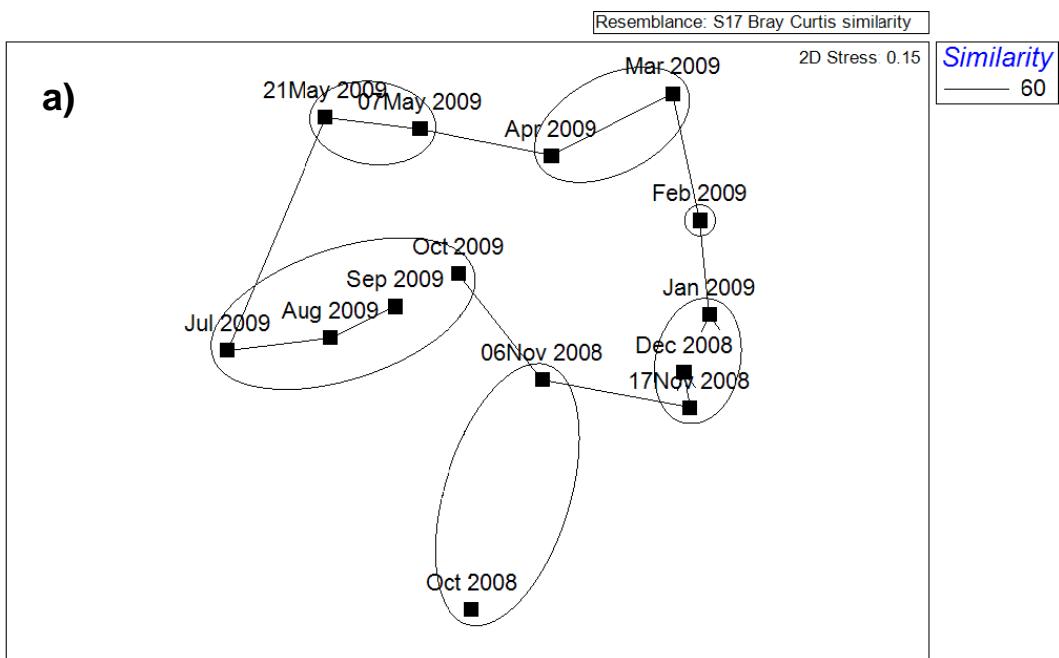
negativna korelacija abundancija *Synechococcus* s nitritima ($p < 0,001$, $R = -0,45$, $n = 131$). Nadalje, izmjerene abundancije pikoeukariota su bile jako niske, s najvišim vrijednostima zabilježenim u zimskim mjesecima, do 10^7 stanica L^{-1} u siječnju na 5 metara dubine (Slika 3.2.6.5.c). Abundancija pikoeukariota značajno je korelirala sa salinitetom ($p < 0,05$, $R = 0,308$).



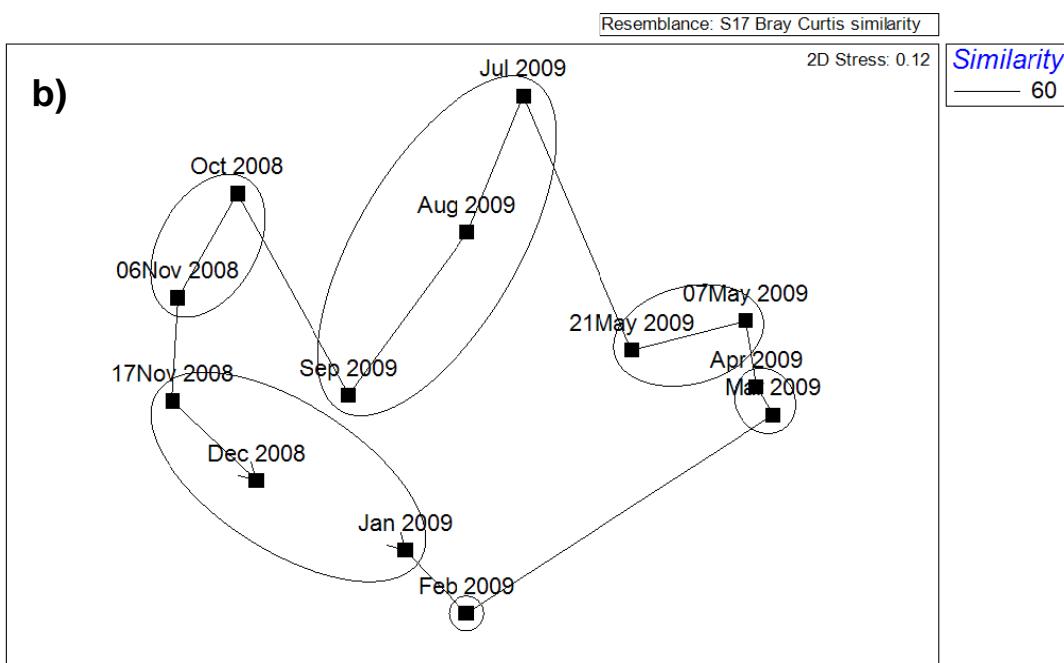
Slika 3.2.6.5. Abundancije različitih skupina pikoplanktona na postaji RV001 od rujna 2008. do listopada 2009.: a) heterotrofne bakterije (HB);
b) *Synechococcus* (SYN) i c) pikoeukarioti (pEuk).

Struktura pikoplanktonskih zajednica

Struktura pikoplanktonskih zajednica analizirana je prema matrici napravljenoj na osnovu intenziteta detektiranih vrpcu na gelovima (prisutnost / odsutnost vrpce u kombinaciji s njihovim intenzitetom) MDS-om (multidimenzionalno skaliranje) i klaster analizom. Prema MDS analizi struktura pikoplanktona slijedila je sezonski ciklus (Slika 3.2.6.6.a,b) kako u površinskim tako i u pridnenim uzorcima.



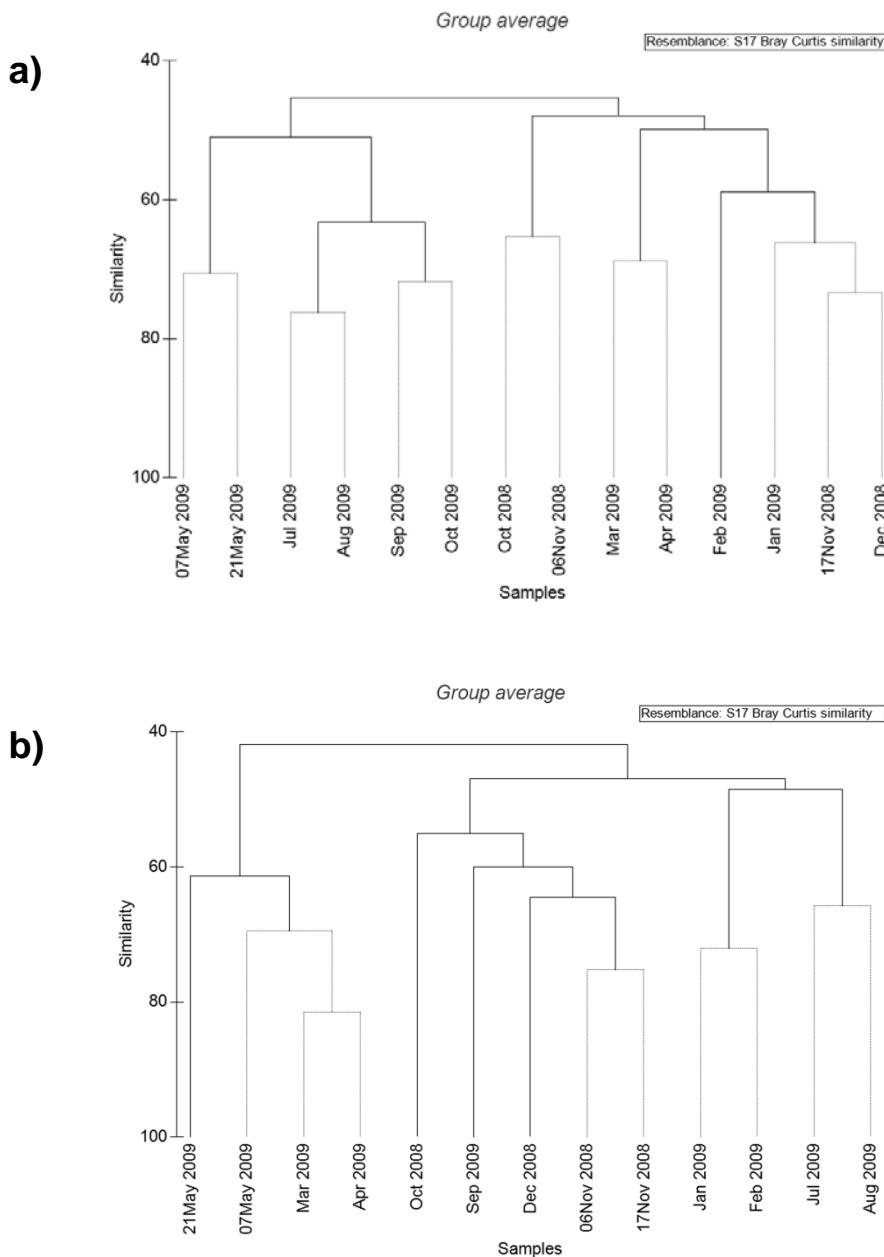
Slika 3.2.6.6. MDS dijagram koji predstavlja promjene u pikoplanktonskoj zajednici tijekom jedne sezone za a) površinsku populaciju.



Slika 3.2.6.6. MDS dijagram koji predstavlja promjene u pikoplanktonskoj zajednici tijekom jedne sezone za b) pridnenu populaciju.

Broj razvijenih vrpca definirao je broj operativnih taksonomske jedinice (engl. operational taxonomic units = OTU) tj. vrsta, koji je bio veći u površinskim uzorcima (61 vrpca), nego u pridnenim uzorcima (pedeset i jedna vrpca). Utvrđeni OTU-i razlikovali su se u periodu proljeće-ljeto i jesen-zima ukazujući na razlike u pikoplanktonskoj strukturi u razdobljima raslojenosti i vertikalnog miješanja vodenog stupca.

Razlike između površinskih i pridnenih populacija određene su klaster analizom, koja je provedena na osnovu matrice prisutnosti / odsutnosti različitih tipova vrpca. Površinske populacije grupirale su se u dvije glavne grupe, što indirektno ukazuje na dva različita perioda stabilnosti vodenog stupca - raslojenost i vertikalno miješanje. Skupina "raslojenost" dodatno se podijelila u dvije podskupine – klastere: kasno proljeće i ljeto. Skupina "vertikalno miješanje" sadrži dvije podskupine: prva je dodatno podijeljena na klastere: rano proljeće i zima, a druga klaster-jesen 2008. Pridnene populacije su podijeljene u dvije glavne skupine, no različite od površinskih skupina, iako su također upućivale na periode raslojenosti i vertikalnog miješanja vodenog stupca. Skupina „vertikalno miješanje“ sastoji se od zima-rano proljeće klastera, a skupina „raslojenost“ sadrži kasno ljeto u jednoj grupi, a kasno proljeće i zimu u drugoj grupi Slika 3.2.6.7. a,b).



Slika 3.2.6.7. Klaster dijagram koji prikazuje razlike u pikoplanktonskoj zajednici tijekom jedne sezone: a) površinska populacija; b) pridnena populacija.

Nakon analize svih dobivenih vrpci, devetnaest vrpci iz površinskih uzoraka i četrnaest vrpci iz pridnenih uzoraka je izrezano iz gela i sekvencionirano. Korištenjem BLAST algoritma utvrđena je sličnost izoliranih sekvenci s sekvencama pohranjenim u „GeneBank“-u. Većina vrpci pokazalo je visoku sličnost (91 do 100%) s kultiviranim vrstama iz „GeneBank“-a (Tablica 3.2.6.1.).

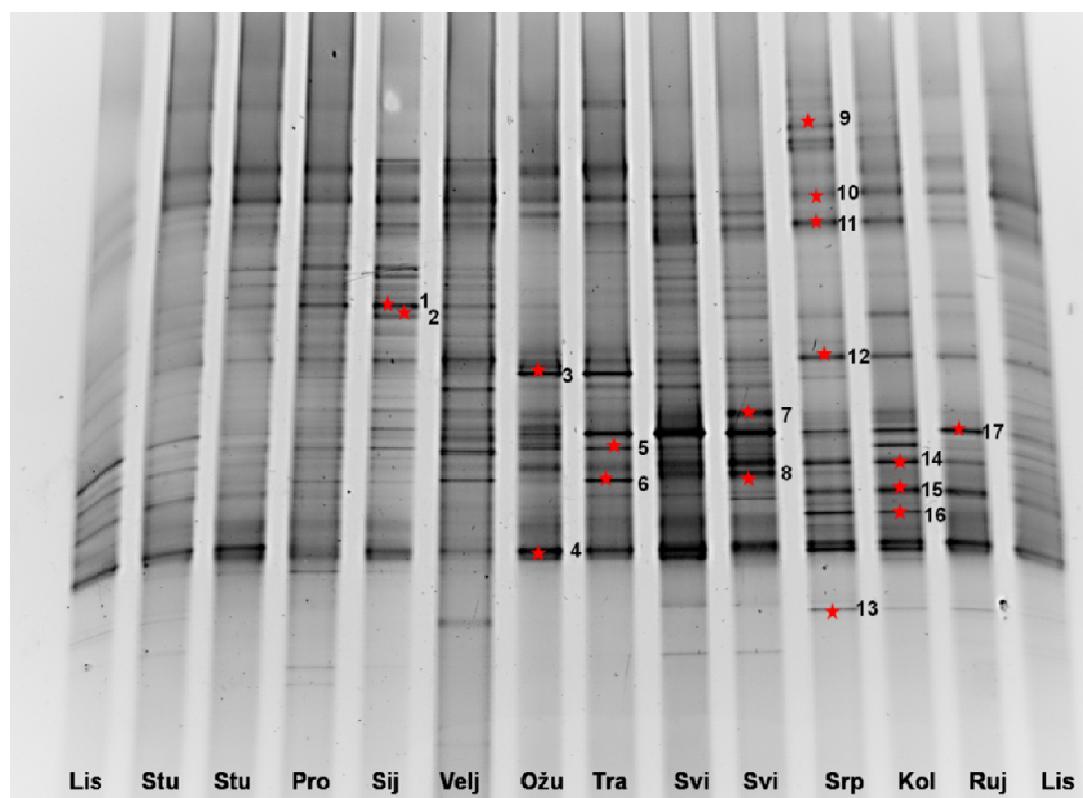
Tablica 3.2.6.1. Filogenetska pripadnost sekvenci DGGE vrpci

Broj vrpce	Broj zvjezdice na Slici 3.2.6.8.	Najближи „match“ (kultura ili uzorak iz prirode)	Broj sekvence u Banci Gena	Broj baza	Sličnost s postojećom kulturom (%)	Taksonomska grupa	Kultura najbliža sekvencama
RV-24	2a	<i>Yonghaparkia</i> sp. MOLA 360	AM945590.1	377	96	Actinobacteria	<i>Yonghaparkia</i> sp. <i>MOLA 360</i>
RV-57	13a	<i>Microbacteriaceae bacterium</i> CL-Dokdo102	FJ214966.1	464	94,9	Actinobacteria	<i>Microbacteriaceae bacterium</i>
RV-52	8a; 7b	<i>Synechococcus</i> sp. CC9902	CP000097.1	534	99,5	Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i> sp.
RV-45	14a	<i>Synechococcus</i> WH7803	CT971583.1	530	95,8	Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i> sp.
RV-5	9a	Uncultured marine bacterium clone MOLA	GU204718.1	513	100	Alphaproteobacteria	uncultured
RV-30	3a	<i>Rhodobacteraceae</i> bacterium RCA23	GQ468661.1	629	98,5	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales	<i>Rhodobacteraceae</i> bacterium
RV-48	15a	<i>Rhodovulum strictum</i> strain MB-G2	NR_025845.1	593	86	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales	<i>Rhodovulum strictum</i>
RV-34	7a	<i>Thalassobius aestuarii</i> strain F84013	HQ908719.1	627	92,1	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales	<i>Thalassobius aestuarii</i>
RV-37	16a;5b	<i>Sulfitobacter dubius</i> strain F71056	HQ908665.1	518	99,5	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales	<i>Sulfitobacter dubius</i>
RV-11	10a	<i>Candidatus Pelagibacter ubique</i> clone fosmid	EU410957.1	643	97,1	SAR11	<i>Candidatus Pelagibacter ubique</i>
RV-13	11a	Uncultured SAR11 cluster alpha proteobacterium	AM748227.1	526	97	SAR11	uncultured
RV-28	12a; 1b	<i>Candidatus Punicespirillum marinum</i> IMCC1322	CP001751.1	390	88	SAR116	<i>Candidatus Punicespirillum marinum</i>
RV-39	5a	<i>Erythrobacter aquimaris</i> strain D4017	FJ161254.1	523	93,9	Proteobacteria, Alphaproteobacteria	<i>Erythrobacter aquimaris</i>
RV-43	8a	Uncultured <i>Pseudomonas</i>	AF195482.1	406	93,6	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas mendocina</i> (EU043329.1)
RV-23	1a	<i>Micromonas pusilla</i> strain P7/1, plastid.	EF051747.1	262	98,8	Eukaryota; Prasinophyceae	<i>Micromonas pusilla</i>
RV-12		uncultured	FN433329.1	461	98,7	Bacteroidetes	uncultured

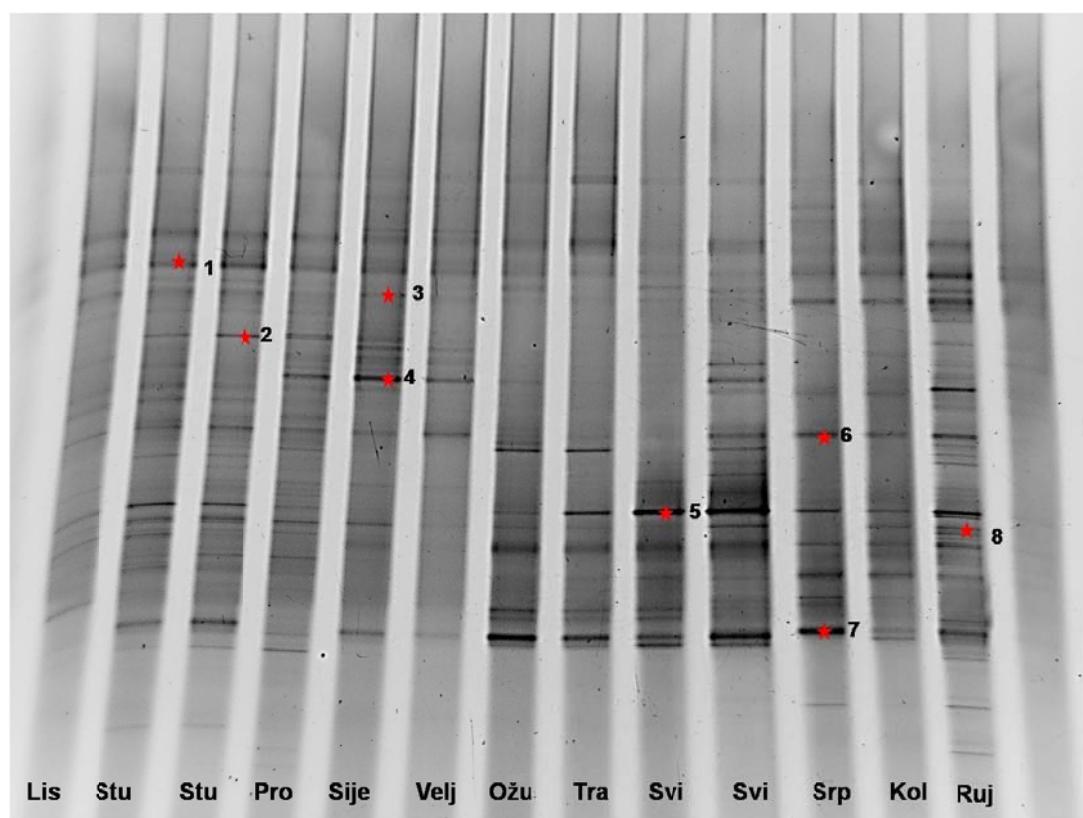
	2b	Flavobacteria bacterium, CLONE					
RV-10	3b	Uncultured alpha proteobacterium clone, PARTIAL SEQ	AY663892.1	420	98,2	Proteobacteria; Alphaproteobacteria	<i>uncultured</i>
RV-8	7b	Candidatus Pelagibacter ubique clone fosmid	EU410957.1	423	98	SAR11	<i>Candidatus Pelagibacter ubique</i>
RV-33	8b	Rhodobacteraceae bacterium	FN811289.1	544	87,7	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales	Rhodobacteraceae bacterium
RV-16	4b	Micromonas pusilla strain, plastid.	EF051747.1	542	86,7	Eukaryota; Prasinophyceae	<i>Micromonas pusilla</i>

Od devetnaest sekvencioniranih vrpci iz površinskih uzoraka, dvanaest je pripadalo Alphaproteobacteria, od kojih devet rodu Rhodobacterales, dva vrsti SAR11 i jedan vrsti SAR116. Od četrnaest sekvencioniranih vrpci pridnenih uzoraka osam je pokazalo visoku sličnost s Alphaproteobacteria (šest s Rhodobacterales, jedna SAR11 i jedna SAR116). Sumirano dobivene sekvence su pokazale da se pikoplanktonska zajednica u površinskom sloju sastojala od četiri različite (taksonomske) skupine: Actinobacteria (Actinomyceta), cijanobakterija (*Synechococcus* sp.), Alphaproteobacteria (Rhodobacterales, SAR11, SAR116 i Sphingomonadales) i Gammaproteobacteria (Pseudomonadales) (Slika 3.2.6.8.)

a)

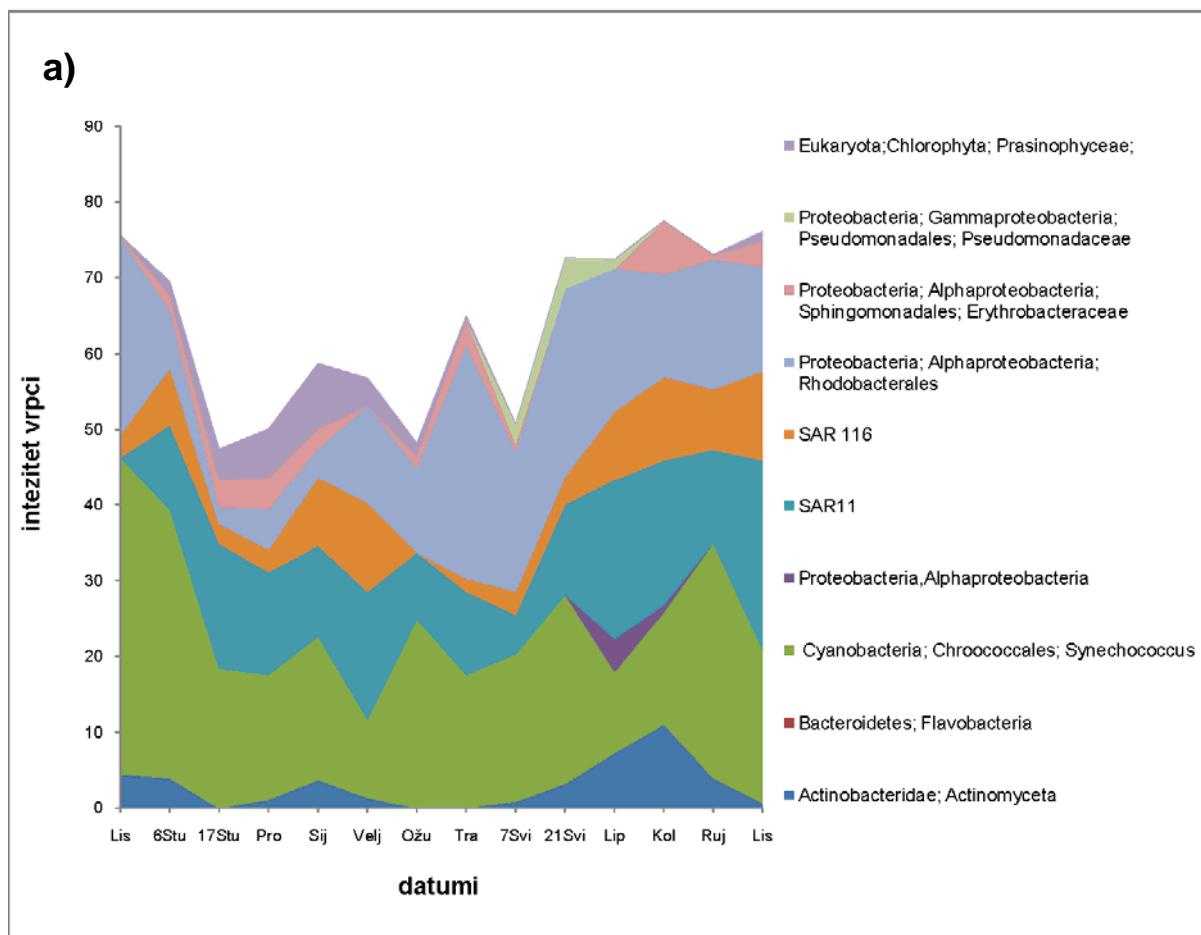


b)

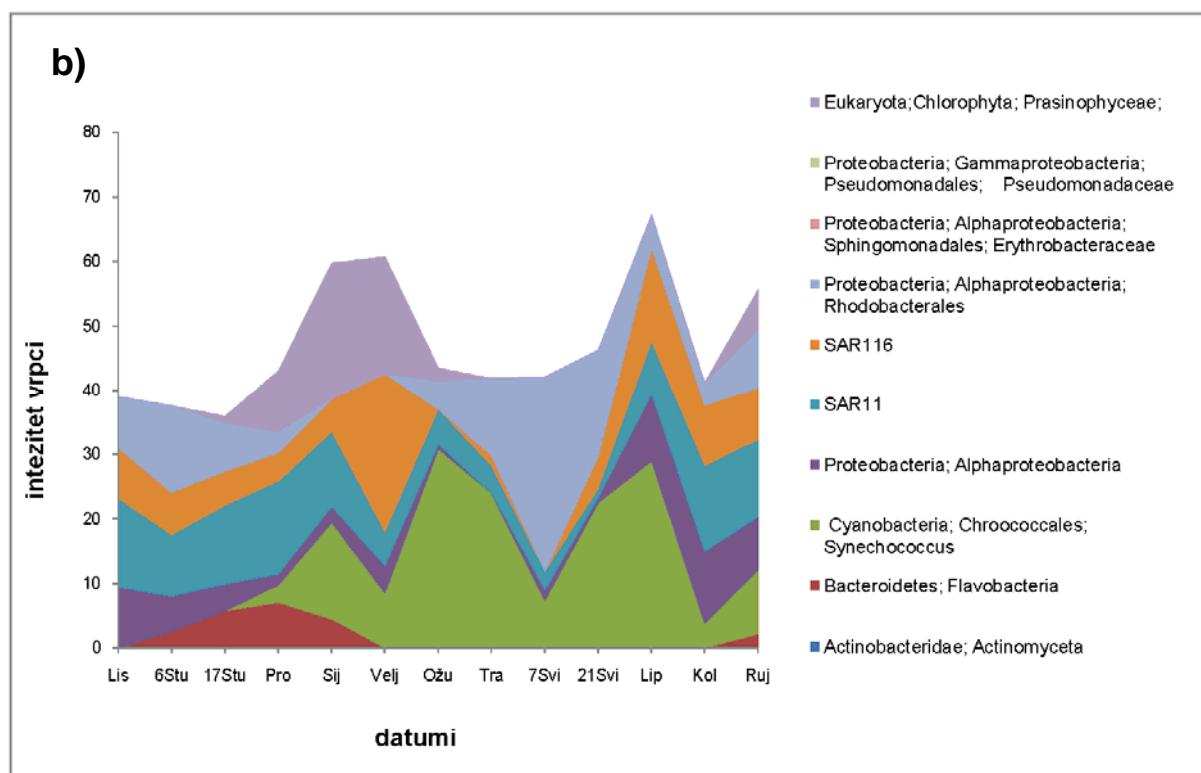


Slika 3.2.6.8. Specifično razvijene vrpce na DGGE gelovima, od kojih su sekvencionirane vrpce označene su zvjezdicama: a) površinska populacija; b) pridnena populacija (pripadnost vrpcu navedena je u Tablici 3.2.6.1.)

Pripadnici klase Alphaproteobacteria dominirali su bakterijskom zajednicom, ali među taksonomskim skupinama *Synechococcus* su bili dominantni s najvišim zabilježenim intenzitetom vrpcu tijekom čitave sezone (osim u travnju, kada su ih nadvladali Rhodobacterales, te veljače, srpnja, kolovoza i listopada kada je prevladavao SAR11) (Slika 3.2.6.9.a).



Slika 3.2.6.9. Relativna brojnost različitih filogenetskih skupina (na osnovi inteziteta DGGE vrpcu) tijekom sezonskog ciklusa na postaji RV001 : a) površinska populacija



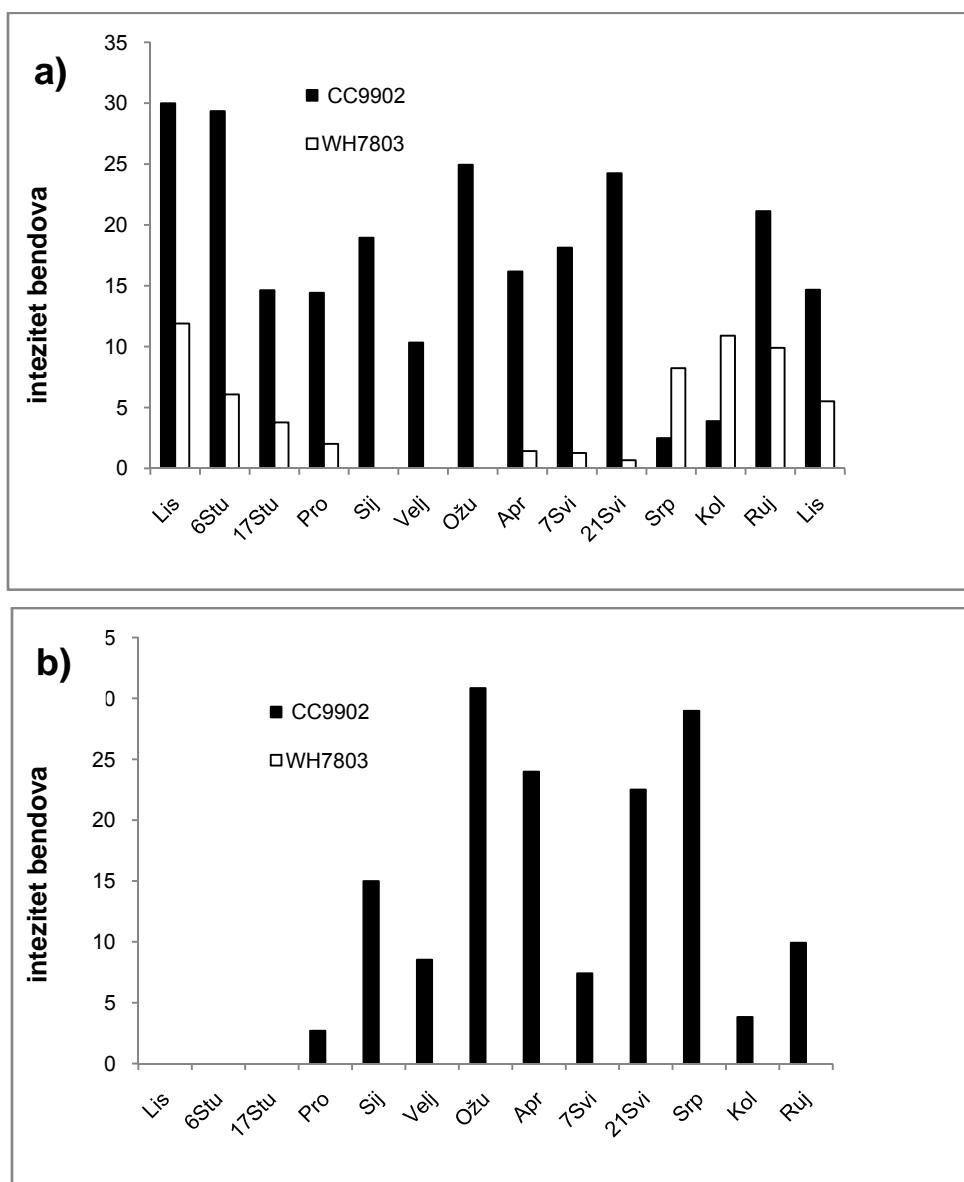
Slika 3.2.6.9. Relativna brojnost različitih filogenetskih skupina (na osnovi inteziteta DGGE vrpci) tijekom sezonskog ciklusa na postaji RV001 : b) pridnena populacija.

Nekoliko sekvencioniranih vrpci odgovaralo je eukariotima, i to plastidima vrste *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) s 9,5% ukupnog intenziteta vrpci.

Pridnena populacija je bila sastavljena od ovih skupina: Bacteroidetes (Flavobacteria), cijanobakterije (*Synechococcus* sp.) i Alphaproteobacteria (Rhodobacterales, SAR11 i SAR116). Prema ukupnom intezitetu vrpci, za *Synechococcus* je zabilježen najveći doprinos od 25,1%. *Synechococcus* su bili dominantna populacija u siječnju, ožujku i travnju, 21. svibnja i srpnju 2009. godine, međutim u listopadu i studenom 2008 nisu detektirani (Slika 3.2.6.9.b). U periodu kada *Synechococcus* nisu dominirali pridnenom populacijom dominirali su rodovi soja Alphaproteobacteria, uglavnom SAR11 (osim 6. studenog i 7. svibnja Rhodobacterales, te SAR 116 u veljači).

Pronađene su dvije različite vrste cijanobakterija *Synechococcus* (Slika 3.2.6.9.), jedan tip s visokom sličnosti s vrstom *Synechococcus* CC9902 (zvjezdica 8 na Slici 3.2.6.8.a, zvjezdica 7 na 3.2.6.8.b), prisutni na površini i u pridnenom sloju (Slika 3.2.6.10.a). Drugi tip pokazao je visoku sličnost s vrstom *Synechococcus* WH7803 (zvjezdica 14 na Slici 3.2.6.8.a),

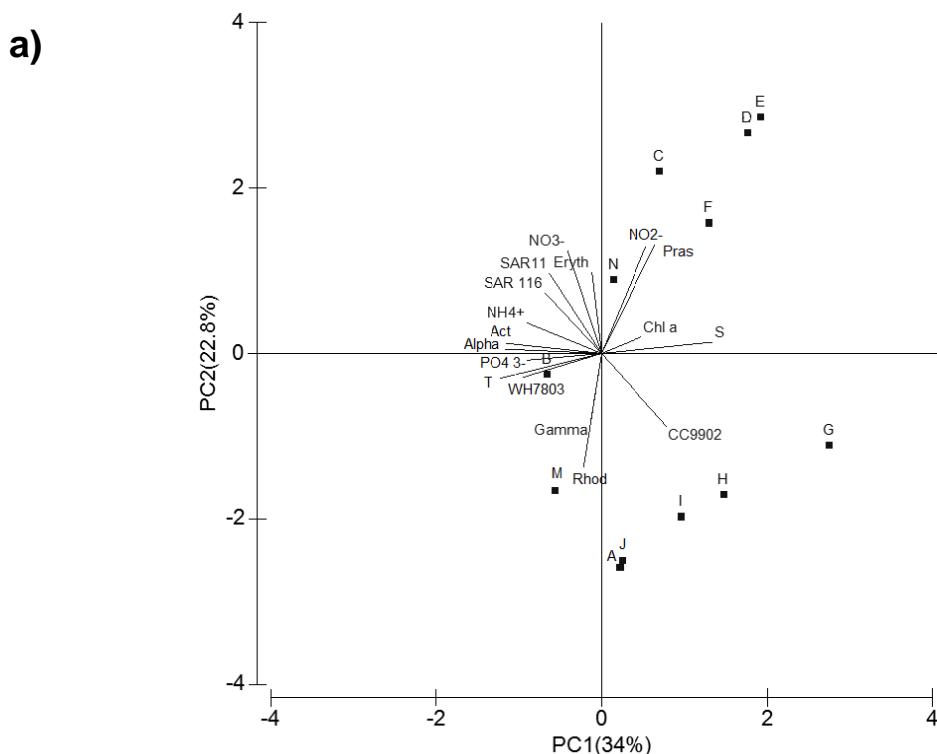
prisutan samo u površinskom sloju tijekom cijelog perioda uzorkovanja, osim u siječnju, veljači i ožujku (Slika 3.2.6.10.b).



Slika 3.2.6.10. Sezonska raspodjela *Synechococcus* CC9902 i WH7803 u a) površinskom; b) pridnenom sloju na postaji RV001

PCA odnosa ekoloških čimbenika (fizički i kemijski čimbenici, te brojnost bakterioplanktona izvedena iz intenziteta sekvencioniranih DGGE vrpcu) u površinskom i pridnenom sloju (Slika 3.2.6.11.a i b) ukazala je na pet glavnih komponenti (PC-ovi) sa svojstvenim

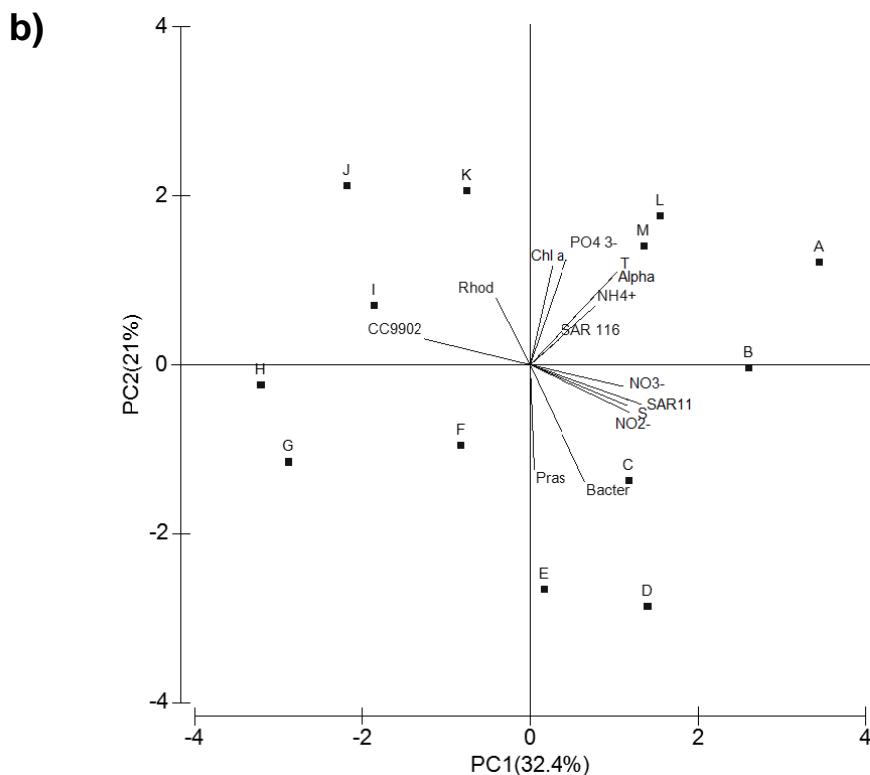
vrijednostima <1 , koje su vrijedile za 83,1% i 87,9% ukupne varijance za površinske i pridnene uzorke.



Slika 3.2.6.11. PCA analiza odnosa različitih okolišnih čimbenika u:

a) površinskom sloju u razdoblju od listopada 2008 do listopada 2009

(A-Lis 2008; B-06Stu 2008; C-17Stu 2008; D- Pro2008; E-Sije 2009; F- ; G- Ožu 2009; H-Tra 2009; I-07Svi 2009; J-21Svi 2009; K- Srp 2009; L- Kol 2009; M- Ruj 2009; N- Lis 2009
T-temperatura; S-salinitet; PO_4^{3-} - fosfati; NO_3^{2-} -nitrati; NO_2^- -nitriti; NH_4^+ - amonijak; Chl *a*-klorofil; Act- Actinobacteridae; Bacter- Bacteroidetes; WH7803- *Synechococcus* WH7803; CC9902- *Synechococcus* CC9902; Alpha- Alphaproteobacteria; SAR11; SAR116; Rhod-Rhodobacterales; Eryth- Erythrobacteraceae; Gamma- Gammaprotoebacteria; Pras-Prasinophyceae)



Slika 3.2.6.11. PCA analiza odnosa različitih okolišnih čimbenika u:

b) pridnenom sloju u razdoblju od listopada 2008 do rujna 2009

U površinskim uzorcima prva glavna komponenta (PC1) činila je 34% ukupne varijance, te su je najvećim dijelom objasnili fizički čimbenici: temperatura negativno i salinitet pozitivno. Abundancije bakterije Actinobacteria, Alphaproteobacteria, WH7803 i SAR 116 su pokazali visoku korelaciju s temperaturom, dok su CC9902 i Prasinophyceae pokazale pozitivne koeficijente sa salinitetom. Druga glavna komponenta (PC2) iznosila je 22,8% ukupne varijance, te je najvećim dijelom objašnjena hranjivim solima: nitratima i nitritima koji su visoko korelirali s populacijama Prasinophyceae, Erythrobacteraceae, SAR11 i SAR116. U pridnenim uzorcima PC1 iznosio je 32,4% ukupne varijance te je objašnjen salinitetom i nitritima. Alphaproteobacteria i SAR11 pozitivno su korelirali sa salinitetom, dok su CC9902 i Rhodobacterales korelirali negativno. PC2 u pridnenim uzorcima iznosio je 21 % s najvećim pozitivnim koeficijentom fosfata i klorofila skojima su najbolje korelirali. Alphaproteobacteria i Rhodobacterales. Bacteroidetes i Prasinophyceae su pokazale negativne koeficijente korelirajući s nitritima i salinitetom.

4. RASPRAVA

4.1. Metodološki aspekt metode protočne citometrije

4.1.1. Preciznost mjerenja instrumenta

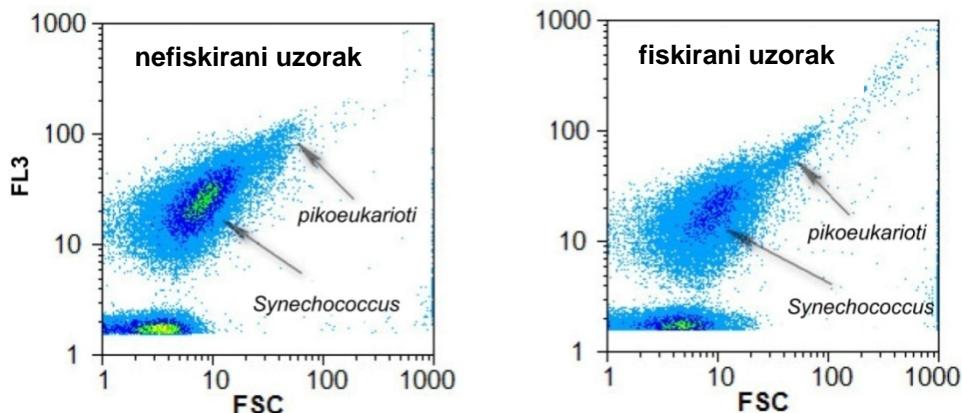
Pouzdanost protočne citometrije ogleda se u velikoj osjetljivosti, točnosti i preciznosti mjerenja raspršenja i fluorescencije specifičnih valnih duljina uzrokovanih prolaskom uzorka kroz tanki snop ekscitacijskog svjetla (Shapiro, 2003). Iz različitih eksperimenata razrjeđivanja i koncentriranja fluorescentnih kuglica utvrđeno je da protočni citometar ima ograničenja, koja se očituju u brzini protoka čestica/stanica koja mora biti niža od „praga koincidencije“ (Gasol i del Giorgio, 2000). Visoka koncentracija čestica omogućuje rezultate veće statističke značajnosti, međutim prilikom prolaska jako koncentriranog uzorka kroz protočni citometar veća je mogućnost da će dvije čestice/stanice proći neopaženo kao jedna velika. Taj fenomen nazvan „koincidencija“ pojavio se pri našem mjerenu kod koncentracija $2,1 \times 10^6$ stanica mL^{-1} , što je jako slično prethodno zabilježenoj vrijednosti od $2,5 \times 10^6$ stanica mL^{-1} (Marie i sur., 1996), pri protoku $\sim 1000\text{-}1400$ čestica/stanica u sekundi (Gasol i del Giorgio, 2000 i pripadajuće reference).

Iako Partecovom instrumentu nije definiran „prag koncidencije“ opisani eksperiment služio je kao baza pri izradi protokola za mjerjenje prirodnih uzoraka, te brzina protoka nikad nije prelazila 400 čestica u sekundi (Veldhuis i Kraay, 2000).

4.1.2. Usporedba abundancija dobivenih epiflorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom

Primjena PC-e kao metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje fitoplanktonske zajednice pokazala je svoju učinkovitost i pouzdanost u raznim ekosustavima (Li i Wood, 1988.; Crosbie i sur., 2003), ta nadopunila manjkavosti EM-e. Usporedbom podataka iz uzoraka sakupljenih tijekom šestomjesečnih uzorkovanja u Limskom kanalu utvrđena je značajna korelaciju između rezultata dobivenih dvjema metodama (EM vs. PC), posebno za abundancije cijanobakterija *Synechococcus* i nanoeukariota. Niže vrijednosti abundancija pikoeukariota mjerениh EM-om posljedicom su nekoliko mogućih čimbenika: bolje osjetljivosti protočnog citometra, te utjecaja fiksativa i pohrane uzoraka. Degradacija Chl *a* u uzorcima pohranjenim na +4 °C (EM uzorci) već je primjećena u ranijim studijama (Chavez i sur., 1990; Sato i su., 2007; Masquelier i Vaulot, 2007), što se očitovalo slabljenjem intenziteta autoflorescencije fitoplanktona. Čak i kratki period viših temperatura (+4°C) na male stanice može imati bitan utjecaj uzrokujući raspadanje dijela stanica (Dubelaar i Jonker, 2000), što rezultira nižim vrijednostima abundancija pojedinih populacija. Utjecaj različitih fiksativa na nano- i mikrofitoplankton istraživan je u mnogim studijama (Lepestre i sur., 1993; Menden-Deuer i sur., 2001; Zarauz i sur., 2008), međutim samo u nekoliko njih razmatrani su učinci fiksativa na manje stanice kao što je pikofitoplankton (Vaulot i sur., 1989; Troussellier i sur., 1995). Primjenom PC-e, s ciljem razjašnjenja učinka različitih fiksativa na stanice pikoplanktona testiran je učinak paraformaldehida (0,1% konačne koncentracije) i glutaraldehida (0,1 i 0,5% konačne koncentracije) na broj i fluorescenciju stanica. Nije uočen nikakav vidljiv utjecaj na fluorescenciju stanica usporedbom različitih fiksativa (GA vs. PFA), te je isto tako zabilježena vrlo visoka korelacija među uzorcima fiksiranim glutaraldehidom konačnih koncentracija 0,1 i 0,5%.

Međutim, usporedbom fiksiranih i nefiksiranih uzoraka (iz Limskog kanala) utvrđeno je svojevrsno opadanje fluorescencije, poglavito za *Synechococcus* populacije (Slika 4.1.1.), sukladno istraživanjima Troussellier i sur. (1995), koji su zabilježili veliko opadanje fluorescencije pri analizi uzoraka bakterija i fitoplanktona fiksiranih glutaraldehidom.



Slika 4.1.1. Citogrami nefiksiranog i fiksiranog (0,5 % GA) uzorka autotrofne zajednice u pridnenom sloju na postaji LIM3 u lipnju 2008. godine.

Učinak je bio osobito vidljiv u površinskim uzorcima, dok u pridnenim uzorcima utjecaj glutaraldehida nije opažen. Fluorescencija piko- i nanoeukariota nije se znatno promijenila, međutim dodatak glutaraldehida rezultirao je dvostruko manjim brojem nanoeukariota (Slika 3.2.1.2.c).

Metoda PC-e pokazala se pogodnom za mjerjenje abundancija malih mikroorganizama poput pikofitoplanktona, otkrivajući njihovu stvarnu važnost u ekosustavu, dok je primjenom EM-e opisan samo dio te populacije. Za nanofitoplankton PC se pokazala kao točnija metoda za procjenu njihove abundancije, no njen glavni nedostatak je nemogućnost taksonomskog razlikovanja, kao i točna procjena biovolumena. S druge strane, PC omogućuje bolje razlikovanje određenih skupina, prepoznavanje stanične organizacije, kao i grupiranje organizama u veličinske razrede (Masquelier i Vaulot, 2007).

PC i EM su metode za opisivanje populacija i piko- i nanofitoplanktona te je njihova istovremena primjena u svrhu što potpunijeg i točnijeg opisa čitave fitoplanktonske zajednice neophodna.

4.1. Biomarkeri DV-Chl *a* i zeaksantin u odnosu na raspodjelu cijanobakterija

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti odlikuje se brzim i djelotovnim razdvajanjem i kvantitativnim određivanjem različitih fotosintetskih pigmenata u vodenim ekosustavima. Metoda HPLC-a korištena je u svrhu određivanja dvaju pigmenata koji su karakteristični za *Synechococcus* (zeaksantin), te za *Prochlorococcus* (DV-Chl *a*). Prisustvo DV-Chl *a* zabilježeno po prvi put u Jadranu, i to samo u vodama južnog Jadrana. DV-Chl *a* nije detektiran na području Velebitskog, Paškog kanala i na postaji RV001, što potvrđuje mjerena protočne citometrije, kojom također populacija cijanobakterija *Prochlorococcus* nije zabilježena. Biomarker zeaksantin detektiran je i u sjevernom (Velebitski, Paški kanal, te postaja RV001) i u južnom Jadranu. Iako su razine zeaksantina i u južnom i u sjevernom Jadranu bile jako niske, u sjevernom Jadranu (postaja RV001) detektirane vrijednosti su bile neznatno više ($>80 \text{ ng L}^{-1}$) u skladu s većim abundancijama cijanobakterija *Synechococcus*. Maksimalne vrijednosti zeaksantina zabilježene su u površinskom sloju na postaji RV001 u rujnu 2009., za razliku od prijašnjih istraživanja na postaji RV001 gdje je maksimalna vrijednost zabilježena u pridnenom sloju u kolovozu (Terzić, 1996; Slika 46).

No na svim navedenim područjima istraživanja visoke vrijednosti zeaksantina podudarale su se s visokim abundancijama cijanobakterija *Synechococcus*, međutim raspodjela zeaksantina se nije u potpunosti podudarala s raspodjelom abundancija cijanobakterija *Synechococcus* u području sjevernog Jadrana.

Taj nesrazmjer u raspodjeli cijanobakterija i zeaksantina možemo objasniti dobrom adaptacijom cijanobakterija na svjetlo jakog intenziteta pri čemu povećavaju sadržaj zeaksantina u stanicama. Koncentracija fotozaštitnih pigmenata u staniči poput zeaksantina određena je u najvećoj mjeri intenzitetom svjetla (Terzić, 1996), te se stanice različitim intenzitetima svjetla prilagođavaju mijenjanjem proporcije fotosintetskih u odnosu na fotozaštitne pigmente (Dubinsky i Schofield, 2009). Prilikom izlaganja niskom intenzitetu svjetla stanica maksimizira sposobnost apsorpcije svjetla, što se postiže povećanjem sadržaja fotosintetskih pigmenata u staniči, te istovremeno smanjuje sadržaj fotozaštitnih pigmenata u staniči. Dok u slučaju jakog intenziteta svjetla stanice povećavaju sadržaj fotozaštitnih pigmenata u stanicama.

Odgovor cijanobakterija na promjene intenziteta svjetla razlikuje se među različitim sojevima, no općenito preferiraju manje intenzitete (Tandeau de Marsac i Houmard, 1993).

Eksperimenti s kulturama soja B9203 i soja B8808 izoliranih iz Bodenskog jezera pokazali su različite prilagodbe prilikom rasta u uvjetima visokog i niskog inteziteta svjetla. U uvjetima povišenog inteziteta svjetla soj BO8808 prestao je rasti, dok se koncentracija zeaksantina znatno smanjila. Nasuprot tome, soj BO9203 rastao je brže u uvjetima intezivnog svjetla uz nepromijenjenu koncentraciju zeaksantina (Postius i sur., 1998). Soj BO9203 sličan je morskom soju WH7803, na kojem su Kana i sur. (1998) eksperimentirali, te utvrdili da pri promjenama inteziteta svjetla sadržaj zeaksantina ostaje konstantan.

Soj visoke sličnosti soju WH7803 detektiran je na postaji RV001 metodom DGGE-a, no obzirom da je u ovom radu utvrđeno da u Jadranu postoje najmanje dva soja cijanobakterija *Synechococcus* nepodudaranje raspodjele zeaksantina s raspodjelom abundancija cijanobakterija *Synechococcus* kako na postaji RV001, a poglavito u Velebitskom kanalu može biti posljedicom prisutnosti različitih sojeva koje se različitim mehanizmima prilagođavaju na varijacije u intezitetu svjetla.

4.2. Prostorna raspodjela pikoplanktona

Južni Jadran

Područje južnog Jadrana obilježeno je visokom oligotrofijom s niskim vrijednostima hranjivih soli, klorofila *a* i fitoplanktonske biomase, a tijekom perioda stratifikacije mikrobna petlja, koja ovisi o procesima regeneracije postaje dominantni mehanizam dinamike sustava. Uslijed raslojenosti vodenog stupca nedostatan donos organskih i anorganskih tvari, utječe na biološke procese iznad i ispod nutrikline. Usprkos tome, dotok nove vode može poremetiti stabilnost vodenog stupca donosom hranjivih tvari u površinske slojeve. U svibnju 2009. godine zabilježene koncentracije hranjivih soli u južnom Jadranu bile su niske i ograničene na dublje slojeve. Tip cirkulacije i pritjecanje vodene mase utjecali su na rasprostranjenje pikoplanktonske populacije. Snažan donos novih hranjivih soli uplivom LIW-a imao je za posljedicu razvoj nutrikline na dubini od 75 m što je potaknulo rast pikoplanktona, pri čemu je abundancija cijanobakterija *Prochlorococcus* bila najveća u nutriklini, dok je populacija *Synechococcus* dosegla maksimum iznad nutrikline. Iako su i heterotrofne bakterije reagirale povećanjem abundancija na povećane koncentracije hranjivih soli donešene LIW-om (Šolić i sur., 2008, Gallina i sur., 2011), njihova ravnomjerna rasprostranjenost uzduž profila ukazuje na njihovu sposobnost prilagođavanja na različite ekološke uvjete, što je potvrđeno uočenim negativnim korelacijama njihove abundancije s koncentracijama nitrata i fosfata. Abundancije heterotrofnih bakterija u skladu su sa zabilježenim prosječnim vrijednostima za područje južnog Jadrana (Šantić, 2010), dok su Batistić i sur. (2012) zabilježili nešto niže vrijednosti. Abundancije cijanobakterija roda *Synechococcus* osjetno su se smanjivale od obale prema pučini, što je uočeno i u prethodnim istraživanjima u južnom Jadranu (Cerino i sur., 2012), no zadržale su brojčanu nadmoć u populaciji pikofitoplanktona duž čitavog profila. Vertikalna raspodjela roda *Synechococcus*, s visokim abundancijama u gornjem sloju vodenog stupca podudara se s prethodno zabilježenom vertikalnom raspodjelom cijanobakterija *Synechococcus* u području južnog Jadrana (Šantić, 2010; Batistić i sur., 2012; Cerino i sur., 2012). Nestanak populacije *Synechococcus* ispod 200 m, sukladno istraživanjima Gallina i sur. (2011) ukazao je na ograničavajuće čimbenike njihova rasta, kao što su smanjenje intenziteta sunčevog svjetla i snižena temperatura u dubljim slojevima.

Nadalje, zabilježene više koncentracije hranjivih soli u dubljim slojevima ukazuju na činjenicu da sam nedostatak hranjivih soli nije bio ograničavajući čimbenik u rastu cijanobakterija roda *Synechococcus* u slojevima ispod eufotičke zone.

Nasuprot tome, vertikalna rasprostranjenost cijanobakterija *Prochlorococcus*, pokazala je prilično necjelovitu raspodjelu, s vrlo opadajućim abundancijama u potezu prema obali i prema pučini, što je vjerovatno posljedica njihove sklonosti prema stabilnosti vodenog stupca. Naime, uočeno je da i vertikalno miješanje predstavlja važan čimbenik koji utječe na uvjete rasta stanica fitoplanktona (Bouman i sur., 2006). Sposobnost fotoadaptivnosti stanica omogućava postojanje različite vertikalne rasprostranjenosti fitoplanktonskih vrsta, te se stoga pojedine vrste mogu koristiti kao biološki markeri (engl. „tracers“) miješanja vodenog stupca (Dusenberry i sur., 1999, Vilibić i Šantić, 2008). Hidrološka nestabilnost u blizini obale koja nastaje dotokom riječnih vodenih masa, s maksimalnim vrijednostima dosegnutim tijekom proljeća (Poulain i Raicich, 2001), kao i prodora istočnojadranske struje prema pučini, koja se prostire središnjim i istočnim bazenom (Poulain i Cushman-Roisin, 2001), sasvim je sigurno bitno utjecala na odsustvo populacije *Prochlorococcus*, za koje je već uočena osjetljivost na stabilnost vodenog stupca (Lindell i Post, 1995; Partensky i sur., 1999). Nadalje, odsustvo cijanobakterija *Prochlorococcus* u površinskom sloju može se protumačiti mehanizmom unosa dušika. Prikazani rezultati ukazuju na podudaranje povećane abundancije cijanobakterija *Prochlorococcus* s koncentracijama nitrata većim od $0,4 \mu\text{M}$ na pojedinim mjernim postajama. Tako su i Vaulot i Partensky (1992) zabilježili porast u omjeru podjele stanica roda *Prochlorococcus* nakon dodavanja nitrata i njihovu stagnaciju kad su koncentracije nitrata bile ispod $0,4 \mu\text{M}$, a visoka abundancija roda *Prochlorococcus* zabilježena je pri većim koncentracijama dušika (Partensky i sur., 1999). Međutim, studije provedene na kulturama cijanobakterija istog roda ukazale su na postojanje samo jednog ekotipa koji raste ovisno o nitratima (Moore i sur., 2002; Zubkov i sur., 2003; Scanlan i sur., 2009). Stoga se smatra da je fiziologija unosa dušika stanica roda *Prochlorococcus* povezana s određenim ekotipovima i predstavlja važan čimbenik za razumijevanje njihove distribucije i biogeografije (Martiny i sur., 2009). U prethodnim istraživanjima rasprostranjenosti cijanobakterija *Prochlorococcus* u području južnog Jadrana (Šantić, 2010) populacija *Prochlorococcus* je korelirala s koncentracijama nitrata, te je detektirana u površinskom sloju, što nije u skladu s rezultatima ovog rada. Razlog tome može biti prisutnost različitih ekotipova u priobalnom i otvorenom južnom dijelu Jadrana.

Utjecaj LIW-a na rasprostranjenje pikoeukariota nije bio toliko naglašen kao kod cijanobakterija rodova *Synechococcus* i *Prochlorococcus*. Ipak, najveći broj pikoeukariota je primjećen na postajama otvorenog mora gdje cirkulacija geostrofičke struje ukazuje na najjači utjecaj EAC-a, što ukazuje na njihovu otpornost na nestabilnosti vodenog stupca.

Na pučini Jadranskog mora, DCM je zabilježen u sloju između 50 i 70 m (Viličić i sur.. 1995; Jasprica et al., 2000; Totti i sur., 2000; Ninčević i sur., 2002), te je ustanovljeno njegovo podudaranje s dubinom nutrikline. Na istraživanom profilu južnog Jadrana DCM-u je najvećim dijelom doprinijela populacija *Synechococcus*, dok su na mjestima udaljenim od obale vidan utjecaj imali i pikoeukarioti i *Prochlorococcus*. Populacija *Synechococcus* se akumulirala na DCM-u s dvije zasebne podgrupe, definirane protočnim citometrom kao "tamni" i "svijetli" s različitim intenzitetom specifičnog fluorescentnog signala (FL2). Slični ekotipovi su već zabilježeni u obalnim vodama Singapura (Gin i sur., 2003), a rezultat su različitog omjera fikobilina naspram fikoeritobilinu (Scanlan, 2003). "Svjetli" ekotip uočen je u oligotofnim vodama, dok je "tamni" ekotip, bio zabilježen u obalnim područjima i na pučini (Bryant, 2003). Ustanovljeno je da na istraživanom profilu južnog Jadrana "tamni" ekotip prevladava u površinskim vodama, dok "svjetlog" ekotipa najviše ima na dubinama ispod 50m. Zabilježena opažanja se slažu s opažanjima u sjevernom Atlantiku i Tihom oceanu (Olson i sur., 1990), Arapskom moru (Cambell i sur., 1998) i Malajskom prolazu (Gin i sur., 2003). Budući da ova dva ekotipa mogu ko-egzistirati, kao što je uočeno na postajama A200 i A300 za pretpostaviti je da "svjetli" ekotip pristiže iz dubokih slojeva putem LIW-a unutar toka EAC-a. Nadalje, Gin i sur. (2003) smatraju da je omjer "svijetlih" i "tamnih" ekotipova obrnuto povezan s eutrofičnim slojem vode a nepostojanje "svjetlog" tipa je pripisano utjecaju eutrofnih voda. Detekcija i razumijevanje ovih cijanobakterijskih zajednica, koje u globalnim razmjerima igraju vrlo važnu ulogu u biogeokemijskom kruženju tvari, neophodno je za cijelovito tumačenje bioloških i fizičkih čimbenika koji definiraju različite ekotipove u datim ekosustavima.

Sjeveroistočni Jadran (Paški i Velebitski kanal, estuarij Zrmanje)

Na osnovu raspodjele temperature i saliniteta u veljači 2008. godine zabilježen je odljev površinske vode iz estuarija rijeke Zrmanje u Velebitski kanal. Nasuprot tome, homogena vertikalna raspodjela saliniteta u potpovršinskom sloju pokazala je dotok morske vode iz otvorenog mora u Velebitski kanal. U doba istraživanja voden stupac je bio raslojen, što je posljedica priljeva slatke vode.

Dinamika fitoplanktona u estuariju Zrmanje usko je povezana s riječnim dotocima vode, razinama hranjivih soli, te vremenu zadržavanja vode. U siječnju i veljači 2008. unos riječnih voda i hranjivih soli uzrokovao je porast abundancija dijatomeja, dinoflagelata, zelenih bičaša i cilijata u sloju ispod halokline kako u samom estuariju Zrmanje, tako i u području južnog dijela Velebitskog kanala. Utjecaj priobalnih vrulja između otoka Raba i Paga inicirao je rast cijanobakterija roda *Synechococcus* u uvjetima nedostatka dušika u površinskom sloju (P1 i V4). U unutarnjem dijelu kanala bogatom hranjivim solima abundancije mikrofitoplanktona (uglavnom dijatomeja) bile su povećane (podaci nisu prikazani) dok je veći doprinos pikoeukariota zabilježen u oligotrofnom vanjskom dijelu istraženog profila. Takva raspodjela u skladu je s prijašnjom klasičnom raspodjelom fitoplanktona po kojoj veće stanice nalazimo u eutrofnim dijelovima, dok manje stanice dominiraju oligotrofnim sustavima (Legendre i Le Fevre, 1991). Dominacija cijanobakterija roda *Synechococcus* piko-frakcijom potvrdila je njihovu prilagodljivost na različite uvjete u okolišu, te rezultirala njihovom brojčanom dominacijom među fototrofima kao što je već prethodno zabilježeno za Jadran (Ninčević-Gladan i sur., 2006; Paoli i sur., 2007.).

4.3. Vremenska i prostorna raspodjela pikoplanktona

Sjeverni Jadran (Rovinj-Po profil)

Sjeverni Jadran najsjeverniji je dio Sredozemlja za koji je svojstvena značajno veća primarna proizvodnja nego što je to u ostatku bazena, uzrokovanu u prvom redu donosom hranjivih soli rijekom Po. Eutrofne vode dolaze u kontakt s oligotrofnim vodenim masama južnojadranskog porijekla pri čem nastaju hidrološki gradjenti, koji uz karakterističnu poluzatvorenu cirkulaciju i visoku produktivnost tijekom toplog dijela godine čine ovo

područje i hidrološki i biološki izuzetno dinamičnim. Trofičke razlike između istraživanih postaja mogu se uočiti u opadanju prosječnog saliniteta od oligotrofnog istoka prema eutrofnijem zapadu koji je pod većim utjecajem rijeke Po, te u povećanju koncentracija klorofila i DIN-a. Donosi rijeke Po se obično šire prema istoku u topлом dijelu godine, dosežući postaje SJ108, SJ101, i često SJ103 u površinskom sloju, ili se, u hladnom dijelu godine, kreću prema jugu, kada se nanovo uspostavlja izmjena ove vode s vodom srednjeg Jadrana (Zavatarelli i sur., 1998; Degobbis i sur., 2000; Supić i sur., 2006).

Zabilježene visoke abundancije cijanobakterija *Synechococcus* podudarale su se s već ranije nađenim vrijednostima u ovom području (Fuks i sur., 2005; Radić i sur., 2006). Njihova dominacija u abundanciji naspram roda *Prochlorococcus* obzirom na hidrografsku dinamičnost ovog područja jednim dijelom je posljedica veće tolerancije populacije *Synechococcus* na nestabilnosti vodenog stupca poput vertikalnog mješanja, što je karakteristično i za druga obalna područja (Lindell i Post, 1995), a drugim dijelom na sposobnost korištenja različitih oblika dušika (N) i fosfora (P). Cijanobakterije roda *Synechococcus* sposobni su koristiti različite izvore nitrata, nitrita, amonijaka, uree i nekih aminokiselina, dok se fiziologija unosa dušika kod cijanobakterija *Prochlorococcus* razlikuje ovisno o ekotipu prisutnom u okolišu, kao što je već navedeno ranije. Sukladno tome prisutnost i rast ove dvije populacije cijanobakterija u oligotrofnom okolišu ne ovisi samo o prisutnosti ili odsutnosti pojedinih hranjivih soli već i o njihovoj sposobnosti da iskoriste različite, trenutno dostupne oblike P i N.

Dobiveni rezultati o dominaciji pikoeukariota biomasom pikofitoplanktona na istraživanom profilu sjevernog Jadrana u skladu su sa studijama provedenim u brojnim drugim obalnim područjima (Partensky i sur., 1996; Blanchot i sur., 2001; Worden i sur., 2004; Calvo-Díaz i sur., 2006; Pan i sur., 2007). Nasuprot tome, u području srednjeg Jadrana, koji je pod jačim utjecajem oligotrofnih istočnih sredozemnih voda, udio pikoeukariota je neznatan i puno je manji od cijanobakterija *Synechococcus* (Ninčević-Gladan i sur., 2006). Populacije pikoeukariota sjevernog Jadrana u ovoj studiji su pokazale značajnu pozitivnu korelaciju s anorganskim hranjivim solima: fosfatima i DIN-om, u površinskom i pridnenom sloju, potvrđujući njihovu ovisnost o dostupnosti nutrijenata. Iako su cijanobakterije *Prochlorococcus* često najbrojniji fotosintetski organizmi ne samo u vodama otvorenog oceana nego povremeno dominiraju abundancijama i u obalnim područjima (Partensky i sur., 1999.), provedena mjerenja na istraživanom profilu u sjevernom Jadranu otkrivaju njihov

vrlo nizak udjel u ukupnoj abundanciji i biomasi fototrofnog pikoplanktona. Zabilježene vrijednosti u sjevernom Jadranu ($0,2 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ do $8 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$) znatno su niže od vrijednosti zabilježenih u drugim obalnim morima (Partensky i sur., 1996; Jacquet i sur., 1998), uključujući južni i srednji Jadran (Šantić, 2010), no uočena je podudarnost s opažanjima iz drugih obalnih područja gdje je njihova abundancija bitno opadala od pučine prema obali (Calvo-Díaz i sur., 2006; Pan i sur., 2007; Šantić i sur., 2011).

Ovisnost cjelokupnog proučavanog područja o donosima rijekom Po, kao i njegova plicina uvelike su utjecale na sastav analiziranih zajednica. To je u skladu s dosadašnjim nalazima prevladavanja roda *Synechococcus* nad rodom *Prochlorococcus* u Jadranu (Radić i sur., 2009; Šantić, 2010; Šantić i sur., 2011; Šilović i sur., 2011), kao i u drugim mezotrofnim područjima (Partensky i sur., 1996; Worden i sur., 2004), gdje cijanobakterije roda *Synechococcus* i pikoeukarioti značajno nadmašuju abundanciju cijanobakterije roda *Prochlorococcus*.

Sukcesija fitoplanktona u Limskom kanalu

Primarni cilj istraživanja u području Limskog kanala bio je razjasniti vezu fizikalnih, kemijskih i bioloških procesa s dinamikom veličinskih frakcija fitoplanktona. Istraživanje je provedeno tijekom dvije sezone (ljeto-jesen) unutar kojih se stabilnost vodenog stupca pokazala kao iznimno heterogena, te time kao bitan čimbenik veličinske strukture autotrofne zajednice. Voden stupac je u obje sezone bio stratificiran u ljetnom periodu (počevši u lipnju), dok je u rujnu započeo proces vertikalnog miješanja, koji je potrajavao do proljeća. Nestabilnosti vodenog stupca, primjećene u veljači i studenom 2009. godine (Slika 3.2.5.1.) posljedicom su obilnih kiša u tom periodu, te su zajedno s dotokom voda bogatih hranjivim solima u površinski sloj bitno utjecale na veličinsku strukturu fitoplanktonske zajednice. Obilne kiše povećavaju protok vode, uslijed čega se čestice s dna (koje je uglavnom muljevito) podižu u voden stupac te dolazi do povećanja turbiditeta, koji za posljedicu ima smanjenje prodora svjetla u dublje dijelove vodenog stupca. U morskim sustavima promjenjivog intenziteta svjetla, sposobnost fitoplanktona da iskoristi dušik za rast i održavanje populacije može varirati ovisno o veličini stanica (Maguer i sur., 2011). Nestabilnosti vodenog stupca, kao i epizodni dotoci velike količine hranjivih tvari preferiraju brzorastuće vrste fitoplanktona (Margalef, 1978; Kiorbøe, 1993), kao što su dijatomeje (Pearl

i sur., 2003). Nasuprot tome, tijekom provedenih istraživanja turbulentni uvjeti, niske temperature (oko 10 °C) i niske razine svjetlosti u vodenom stupcu onemoguće su rast i razvoj mikrofitoplanktona. Tako su i rezultati straživanja koja su proveli Maguer i sur. (2011), pokazali da je iskorištenje dušika ograničeno slabim intezitetom svjetla u vodenom stupcu koji je posljedica jakog hidrodinamizma u vodama zapadnog Engleskog kanala. Nadalje, slab intezitet svjetla u vodenom stupcu djelovao je nepovoljno na sposobnost velikih stanica da uzimaju NO₃⁻ i jedan je od razloga zašto su manje stanice iskoristile sav dušik. Slab odgovor mikrofitoplanktona na povećane količine dostupnog dušika u veljači 2009. rezultirao je najnižim zabilježenim vrijednostima fitoplanktonske biomasse, dok je tada za pikoeukariote zabilježen najveći doprinos biomasi, koji je premašio i doprinos cijanobakterija *Synechococcus*. Odgovor pikoeukariota na veliki dotok nitrata u suprotnosti je s općeprihvaćenom hipotezom da manje stanice preferiraju amonijak (Chisholm, 1992a), no potvrđuje nedavna objavljena promatranja Glovera i sur. (2007) te Huete-Ortega i sur. (2011) u vezi reakcije pikofitoplanktona na promjene koncentracija nitrata. Sličan događaj, naglog dotoka slatke vode dogodio se i u studenom 2009., nakon što je Genovska ciklona prošla područjem Lima i donijela jake kiše. Ta velika količina padalina je uslijed ispiranja terena te povećanim dotokom kroz izvore utjecala je na smanjenje saliniteta i donos hranjivih tvari u sustav uzrokujući „cvat“ mikrofitoplanktona (i to uglavnom dijatomeja) na postaji LIM3. Dakle, dva slična događanja u različitim periodima doveli su do rasta različitih veličinskih kategorija fitoplanktona; višim razinama pikofitoplanktona u veljači, a mikrofitoplanktona u studenom. Sukladno tome možemo zaključiti da veličinska struktura zajednice izravno ne ovisi isključivo o dostupnosti hranjivih soli, u ovom slučaju dušika, kao što se to do sada smatralo (Semina, 1968; Peña i sur., 1990; Rodríguez i sur., 2001).

Unutar perioda unosa slatke vode, odnosno u veljači i studenom 2009. zabilježene biomase cijanobakterija *Synechococcus* bile su ekstremno niske kroz cijeli stupac vode na sve tri postaje (Slika 3.2.4.5.). Zabilježeni pad doprinosa cijanobakterija *Synechococcus* ukupnoj biomasi može se dijelom objasniti njihovom sklonošću prema toplijim uvjetima u okolišu što dokazuje i njihova slaba ali značajna korelacija s temperaturom, primjećena i u obalnom području Kalifornije (Tai i Palenik, 2009). Drugi razlozi mogu biti kompeticija ili grejzing kako su Robidart i sur. (2012) objasnili nerazjašnjen pad *Synechococcus* abundancija u jesenskom periodu.

Osim u navedena dva slučaja, cijanobakterije roda *Synechococcus* svojom su abundancijom i biomasom dominirali skupinom pikofitoplanktona u Limskom kanalu tijekom cijelog perioda uzorkovanja od lipnja 2008. godine do studenog 2009. godine, što odgovara prijašnjim istraživanjima koja potvrđuju njihovu važnost u mezotrofnim područjima (Campbell i Vaulot, 1993; Partensky i sur., 1996). Tijekom istraživanja uočene su periodične izmjene u dominaciji biomase pojedinih frakcija fitoplanktona. Tako je dominirajući pikofitoplankton (u lipnju 2008.) prevladan biomasom mikrofitoplanktona (u rujnu 2008.), a još dominirajući mikrofitoplankton u lipnju 2009. prevladan pikoplanktonom u rujnu 2009. Navedene promjene zasigurno su posljedicom izmjene vode zaljeva s otvorenim vodama Jadrana. Sličan trend smjene veličinskih frakcija u populaciji fitoplanktona zamjećen je i na otvorenom moru, na postaji RV001, gdje je mikrofitoplankton dominirao u rujnu 2008., dok je pikofitoplankton dominirao u kolovozu i rujnu 2009. Rijeka Po, uobičajeno najveći protok ima u proljetnim mjesecima (do $5000 \text{ m}^3 \text{s}^{-1}$; Socal i sur., 2008) kada dovodi znatne količine hranjivih tvari sve do istarske obale. Obzirom da je 2009-te godine protok rijeke Po u proljetnom periodu bio iznimno visok, s vrijednostima i do $8000 \text{ m}^3 \text{s}^{-1}$ (izvor: dnevno izvješće "ARPA Emilia-Romagna"), u sustavu je povišena količina hranjivih tvari popraćena rastom većih frakcija fitoplanktona. Uočene srednje vrijednosti doprinosa pikofitoplanktona ukupnoj fitoplanktonskoj biomasi (oko 30%) u skladu su s rasponom njihovog doprinosa uočenog u prijašnjim studijama obalnih područja (Bec-sur., 2005 i reference). Najveće vrijednosti doprinosa piko-frakcije ukupnoj fitoplanktonskoj biomasi u rujnu 2009., dok je temperatura mora još uvijek bila visoka, a vodeni stupac stratificiran, u skladu su s njihovim uobičajenim maksimumom u umjerenim vodama tijekom toplih mjeseci (Iriarte i Purdie, 1994; Agawin i sur., 1998). Obalni i slatkvodni ekosustavi imaju tendenciju nepravilne distribucije fitoplanktonske biomase, što odražava utjecaj (specifičnih) ekoloških čimbenika utječu na njihovu veličinsku strukturu (Rodríguez i sur., 1987; Gasol i sur., 1991). Generalno je mišljenje da biomasom obalnih sustava prevladavaju nano-i mikro-frakcija (Malone i sur., 1991; Iriarte i Purdie, 1994), dok pikoplankton dominira tek sporadično (Cermeño i sur., 2006). Ova iznenađujuća dominacija piko-frakcije ukazuje na činjenicu da je razumijevanje čimbenika koji oblikuju strukturu fitoplanktona u obalnim područjima još uvijek nepotpuno (Wetz i sur., 2011), te da prilikom definiranja strukture fitoplanktona treba uzeti u obzir kako njihovu veličinu, tako i taksonomsko određenje čak i najmanjih frakcija, tj. pikoplanktona ($0,2\text{-}2 \mu\text{m}$).

4.4. Sezonska raspodjela i struktura pikoplanktona u obalnoj zoni sjevernog Jadrana (postaja RV001)

Sjeverni Jadran specifičan je dio Jadrana, poznat po visokoj produktivnosti, hidrografskim gradijentima i poluzatvorenoj cirkulaciji, što ga čini jako dinamičnim područjem. Dugi niz godina je ovo područje bilo okarakterizirano kao izuzetno visoko produktivno, velikim dijelom zbog povremenih epizoda eutrofikacije, kao posljedica pojačanog protoka rijeke Po. Smanjen protok rijeke Po sredinom 1980-ih doveo je do značajnog pada koncentracije hranjivih soli, osobito fosfata i amonijaka (Mozetić i sur., 2009). Ograničeni dotok hranjivih soli, zajedno s trendom pada koncentracija klorofila doveli su do zaključka o općem trendu oligotrofikacije sjevernog Jadrana (Mozetić i sur., 2009; Ivančić i sur., 2010).

Prema vrijednostima frakcioniranog klorofila pikoplankton je bio najvažnija veličinska klasa tijekom 2009. godine, što znači da se sustav pomakao prema najmanjoj veličinskoj klasi fitoplanktonske zajednice. Najznačajniji utjecaj na zajednicu pikoplanktona uočen je u sinergističkom djelovanju temperature i zaslavljenja morske vode. Pad saliniteta u ljetnim mjesecima (Slika 3.2.4.5.c), zajedno s povišenim temperaturama rezultirali su maksimalnim abundancijama heterotrofnih bakterija i cijanobakterija *Synechococcus*, što je u skladu s nedavno objavljenim rezultatima istraživanja u Jadranu (Šantić, 2010; Šantić i sur., 2011) dok su pikoeukarioti pokazali veću sklonost za slanije vode. Dominacija cijanobakterija *Synechococcus* unutar pikofitoplanktona u skladu je s prijašnjim istraživanjima pikofitoplanktona u Jadranu (Ninčević-Gladan i sur., 2006; Bernardy-Aubry i sur., 2006). Maksimum pikoeukariota u prosincu kada su abundancijom (Slika 3.2.5.5.c) i biomasom (Slika 3.2.5.4.) nadmašili populaciju *Synechococcus* može se pripisati vertikalnom miješanju, kada su se hranjive soli raspodjelili čitavim vodenim stupcem. Tijekom stratifikacije vodenog stupca pikoeukarioti su se uglavnom akumulirali u dubljim slojevima, posebice u ljetnom razdoblju, kada su povećane razine regeneriranih hranjivih tvari u dubljim slojevima podržale njihov rast, slično populaciji Prasinophyceae (definiranom metodom DGGE-a)(Slika 3.2.6.11). Najveće abundancije pikoeukariota zabilježene su u siječnju 2009, a slijedile su ih visoke vrijednosti populacije Prasinophyceae (Slika 3.2.6.9.a).

Sezonska struktura bakterioplanktona u obalnom moru tijekom ovog istraživanja podudara se s rezultatima istraživanja provedenim u drugim obalnim područjima, kao što su i:

Blanes (Schauer i sur., 2003.; Alonso-Sáez i sur., 2007.), Chesapeake (Kan i sur., 2006) i Tršćanski zaljev (Celussi i Cataletto, 2007), te estuarij rijeke Vigo (Alonso-Gutiérez i sur., 2009), međutim u slučaju istraživanja na postaji RV001 uočene su razlike između površinske i pridnene populacije. Glavni čimbenici koji utječu na dinamiku bakteriplanktona u sjevernom Jadranu su njegove hidrološke značajke i interakcija atmosfere i mora (Celussi i sur., 2011). Najznačajniji izvor slatke vode, a time i hranjivih tvari je rijeka Po, čiji varijabilni protok zajedno s prevladavajućim vjetrovima mijenjaju stabilnost vodenog stupca, a time i strukturu planktonske zajednice pri različitim režimima vodenog stupca (stratificiran ili izmiješan). Vertikalna raspodjela temperature i saliniteta jasno ukazuje promjenu u strukturi vodenog stupca, od stratificirane ljeti prema vertikalnom miješanju u jesen (Slika 3.2.6.1.). Stoga je očekivano da će najuočljivije razlike u strukturi bakterijske zajednice biti između ta dva režima. (Slika 3.2.6.1.). Međutim, najveće razlike u strukturi bakterijske zajednice zabilježene se između površinskog i pridnenog sloja, neovisno o stabilnosti vodenog stupca. Jedan od glavnih razloga takvih razlikama je varijabilna cirkulacija koja, uslijed dotoka slatke vode rijekom Po i/ili oligotrofne vode s juga, značajno utječe na rast i razvoj mikrobne zajednice. Prevladavanje slatkvodne ili oligotrofne vode utječe na strukturu mikrobne zajednice najvećim dijelom zbog donosa organske tvari različite kvalitete, ali isto tako i autohtonih mikrobnih populacija rijeke Po ili južnog Jadrana.

Utjecaj rijeke Po najizraženiji je u ljetnom razdoblju, kada zbog visokog protoka i promjene cirkulacije jedan trak rijeke Po može doprijeti do istarske obale (Supić i sur., 2000), što se upravo i dogodilo u 2009. godini. Tijekom perioda istraživanja najveći zabilježeni protok rijeke Po je bio u svibnju 2009. (prosječna vrijednost $4033.63 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$; izvor: Izvještaj "ARPA Emilia-Romagna", dnevni podaci za rujan 2008-2009), no do istarske obale je stigla tek u lipnju što je vidljivo iz sniženog saliniteta i maksimuma nitrata (Slika 3.2.6.1.b; Slika 3.2.6.2.a). Za razliku od 2009. tijekom istraživanja u 2008. godini protok rijeke Po bio je jako nizak (podaci nisu prikazani), posebno u periodu ljetno-jesen, te su prevladavali oligotrofni uvjeti, što je vidljivo i iz niskih koncentracija hranjivih tvari i abundancija bakterija. Takvi oprečni okolišni uvjeti u jesenskom periodu dvije godine razlogom su promjena u strukturi bakterijske zajednice u vodenom stupcu. Tijekom jeseni 2009. godine uočen je pad abundancija cijanobakterija *Synechococcus*, te povećanje abundancija bakterija SAR11, dok je u pridrenom sloju zabilježen suprotan trend. Abundancije bakterija SAR116 u jesen 2009. su u odnosu na 2008. imale uzlazni trend kako u površinskom tako i u pridrenom sloju. Ova

kompleksna i varijabilna dinamika razlogom je razvoja mikrobne zajednice sjeveroistočnog Jadrana različite od onih prethodno opisanih u tom području (Celussi i Cataletto, 2007; Celussi i sur., 2011). Tako su Celussi i Cataletto (2007) pri istraživanju strukture mikrobne zajednice u Tršćanskem zaljevu pronašli najveći broj OTU-a u ljetnom periodu, a najniži na prijelazu iz zime u proljeće. U obalnom području sjevernog Jadrana najveći broj OTU-a u površinskim sloju utvrđen je u zimskom periodu, a najniži u jesen. U pridnenom sloju najveći broj OTU-a bio je u jesen, a najmanji u proljeće. Dakle, iako je struktura mikrobne zajednice u oba sloja pratila sezonski ciklus utvrđena je jasna razlika između tih populacija, ne samo u broju OTU-a, već i njihovom sastavu, čak i u razdobljima vertikalnog miješanja kada se zbog homogenosti vodenog stupca očekivala sličnija struktura zajednice.

Glavne skupine bakterija zabilježene tijekom istraživanja su: cijanobakterije (*Synechococcus* sp.) i Alphaproteobacteria, inače tipične za obalna područja (Celussi i Cataletto, 2007; Schauer i sur., 2003; Kan i sur., 2006), koje su već načinjene i bibliotekama klonova (Schauer i sur., 2003 i reference; Alonso-Gutiérrez i sur., 2009). Filotipska raspodjela razlikovala se ovisno o autohtonim karakteristikama pojedinih vodenih sustava. Vrste *Sulfitobacter* i SAR11 dominirale su unutar klase Alphaproteobacteria. SAR11 je kozmopolitska bakterijska vrsta, dominantna u površinskim vodama oceana i mnogim morskim područjima (Giovanonni i sur., 1990; Giovanonni i Rappe, 2000; Morris i sur., 2002; Zubkov i sur., 2002; Marry i sur., 2006). Obzirom da je SAR11 karakterističan za oligotrofna područja (Fuchs i sur., 2005), a rezultati ovog istraživanja ukazuju na njegovu dominaciju u pridnenom sloju, koja se može dovesti u vezu s dotokom oligotrofne vode iz južnog Jadrana, što potvrđuje i korelacija SAR11 sa salinitetom (PCA). Slaba zastupljenost vrsta Bacteroidetes, Betaproteobacteria i Gammaproteobacteria, karakterističnih za mezotrofna i eutrofna područja, potvrđuju oligotrofne karakteristike ovog područja i slab utjecaj slatkvodne riječne vode u istraživanom periodu. Prisustvo vrste Bacteroidetes samo u pridnenom sloju i to u periodu stratifikacije ukazuje na njihovu potrebu za većim koncentracijama hranjivih tvari (Alonso-Gutiérrez i sur., 2009 i reference), nego što su uočene na ovoj obalnoj postaji (PC2, Slika 3.2.6.11.b).

Dominacija cijanobakterija roda *Synechococcus* u filogenetskoj strukturi prokariota slaže se s njihovom visokom abundancijom, te potvrđuje njihovu iznimnu važnost u pikofitoplanktonskoj zajednici ovog područja. Prisutnost dvije različite podgrupe *Synechococcus* već je zabilježena u eksperimentima s kulturama izoliranim u Jadranu (Paoli i

sur., 2008), međutim njihova taksonomija i fiziologija dosad nije istražena. Tijekom naših istraživanja nađene su dvije različite *Synechococcus* vrste, tip CC9902 prisutan u oba sloja, i tip WH7803 prisutan samo u površinskom sloju. Tip CC9902 (skupina IV) karakterističan je za graničnu obalnu zonu, gdje raste pri različitim koncentracijama nitrata i fosfata (Zwirglmaier i sur., 2008). Nadalje tip CC9902 pokazao je sa salinitetom pozitivnu korelaciju u površinskom sloju, ali negativnu korelaciju u pridnenom sloju (PCA analiza, Slika 3.2.7.0.). Tip WH7803 (skupina V) zabilježen je tijekom prijelaznih perioda, između faze miješanja i stratifikacije vodenog stupca (Post i sur., 2011). Genotipovi koji pripadaju skupini V imaju tendenciju dominirati u „upwelling“ zonama (Fuller i sur., 2006), što upućuje na njihovu sklonost prema visokim koncentracijama hranjivih soli. Skupina V nije detektirana u pridnenom području, kao ni u zimskom razdoblju u površinskim uzorcima, što ukazuje na njihovu sklonost ka višim temperaturama (Slika 3.2.7.0.a), kao što su to u obalnoj zoni Kalifornije zabilježili Tai i Palenik (2009).

Specifičan hidrodinamizam sjeveroistočnog dijela Jadrana oblikuje strukturu bakterijske zajednice, uslijed čega se ona značajno razlikuje od one iz sjeverozapadnog područja, koju su već istražili Celussi i Cataletto (2007). Fizikalni procesi koji se odvijaju duž istočne i zapadne jadranske obale uvelike se razlikuju. Izmjena vode između poluzatvorenog bazena istočne obale i otvorenog mora uglavnom je pod utjecajem lokalnih vjetrova. Suprotno tome, područje šelfa zapadne obale pod velikim je utjecajem rijeke Po, koja zimi uglavnom ostaje ograničena na obalni granični sloj, dok se ljeti širi na otvoreno more dopirući sve do Istre (Orlić i sur., 1992). Za visok stupanj eutrofikacije talijanske obale najvećim dijelom su zaslužni tip cirkulacije, kao i prisutnost većeg broja izvora slatke vode. S druge strane, sjeveroistočna hrvatska obala je vrlo oligotrofna (Mozetić i sur., 2009; Ivančić i sur., 2010), te mnogo dinamičnija (ovisno o prevladavajućem utjecaju slatkovodne/oligotrofne vode). Iako je struktura bakterijske zajednice sjevernog Jadrana dijelom već opisana u gore navedenim istraživanjima, rezultatima ovog istraživanja su po prvi puta utvrđene razlike u strukturi površinskih i pridnenih populacija, čime se dodatno potvrdila specifičnost i kompleksnost ovog, relativno malog ekosustava.

4.5. Dinamika cijanobakterija *Synechococcus* u Jadranu

Abundancije pikofitoplanktona navedene u ovom istraživanju u skladu su s prethodno utvrđenim rasponima za ovo područje (Fuks i sur., 2005), kao i s rasponima drugih istraživanja kako u Jadranu, tako i u drugim morskim ekosustavima (Tablica 4.5.1.).

Tablica 4.5.1. Abundancije pikofitoplanktona (SYN-*Synechococcus*; PRO- *Prochlorococcus*; PEUK-pikoeukarioti) u morskim ekosustavima mjerene protočnim citometrom (srednja vrijednost- s.v.)

Područje	SYN (x10 ⁶ stanica L ⁻¹)	PRO (x10 ⁶ stanica L ⁻¹)	PEUK (x10 ⁶ stanica L ⁻¹)	Autori
<u>Obalne vode</u>				
Obalne vode (SI Atlantik)	max 500	max 400	av. 20	Partensky i sur., 1996.
Obalne vode SZ Mediterana	av 43 (max .70)	av 650 (430-800)	av2,5	Jacquet i sur., 1998.
Obalno područje Singapura	12-1130	/	/	Gin i sur., 2003.
Obalno područje Pacifika	33-100	8-32	11-32	Worden i sur., 2004
Obalni dio Lionskog zaljeva (SZ Mediteran)	<2-95	<1-10	5-21	Charles i sur., 2005
Obalno područje Južnog Kineskog mora	16±12,1	5,13±2,81	4,39±1,45	Pan i sur., 2006.
Obalno područje Levantinskog bazena (Istočni Mediteran)	3,2-160	/	/	Uysal i Koksalan, 2006
Obalno područje Sicilijanskog zaljeva	max 10,4	max 125	/	Brunet i sur., 2007
Obalno područje Južnog Kineskog mora	0-100	150-280	0,5-15	Liu i sur., 2007.
Obalno područje Biskajskog zaljeva (SI Mediteran)	max. 240	max. 19	max. 10	Calvo-Díaz i sur., 2008.
Obalno područje Norveške	2-13	/	2-18	Bratbak i sur., 2011.
Velebitski i Paški kanal (sjeverni Jadran)	4,1-32	/	1-6	Viličić i sur., 2009. (ovaj rad)
Limski kanal (sjeverni Jadran)	2,5-720	/	0,2-12	Šilović i sur., 2012a (ovaj rad)

Obalno područje sjevernog Jadrana (postaja RV001)	2,4-210	/	0-10	Šilović i sur., 2012b (ovaj rad)
Obalno područje srednjeg Jadrana	s.v.0,1-157 (max 457)	s.v.0-47 (max 71)	/	Šantić, 2010; Šantić i sur., 2011.
Obalno područje južnog Jadrana	s.v.3,4-72,9 (max 280)	s.v.6,3-15	/	Šantić, 2010; Šantić i sur., 2011
Otvorene vode				
Otvorene vode centralnog dijela Pacifika	8	140	/	Binder i sur., 1996.
Crveno more	39(± 430)	230(± 900)	/	Fuller i West, 2005.
Sjeverni Jadran	10-100	0,2-8	0-25	Radić i sur., 2009. (ovaj rad)
Sjevero-zapadni Afrički šelf	10-50	10-350	1-15	Baltar i sur., 2009.
Otvoreno područje srednjeg Jadrana	s.v.3,9-63	s.v.2,1-10,7	/	Šantić, 2010; Šantić i sur., 2011.
Otvoreno područje južnog Jadrana	0-90	0-10	0-4,5	Šilović i sur., 2011. (ovaj rad)

Maksimalne abundancije cijanobakterija *Synechococcus* utvrđene su u njegovom sjevernom dijelu (Limski kanal) (Šilović i sur., 2012a), te spadaju u najviše zabilježene vrijednosti u području Mediterana. Od navedenih studija (Tablica 4.5.1.), tako visoke vrijednosti nađene su još samo za obalno područje Singapura gdje su se visoke abundancije *Synechococcus* podudarale s jako niskim vrijednostima fosfata (često ispod granice detekcije), te jako visokim DIN vrijednostima (srednja vrijednost $3,5 \mu\text{M}$), kao što je to bio slučaj i u Limskom kanalu. Međutim povećane koncentracije DIN-a u okolišu ne moraju nužno voditi i povećanju abundancije cijanobakterija. Povišene koncentracije hranjivih soli u Limskom kanalu, u veljači 2009. popraćene su iznimno niskim abundancijama cijanobakterija *Synechococcus* što se može objasniti relativno niskim temperaturama u navedenom periodu. Cijanobakterije *Synechococcus* su euritermni organizmi, te obitavaju i „cvjetaju“ pri različiti temperturnim rasponima, ali su ipak skloniji višim temperaturama (Partensky i sur., 1999), što je potvrđeno i u ovim istraživanjima. Prisutnost dva soja *Synechococcus*-a već je zabilježena u eksperimentima s kulturama izoliranih iz Jadrana (Paoli i sur., 2008), pri čemu je jedan soj bio jako sličan soju WH7803, čija je prisutnost u Jadranu potvrđena i u ovom istraživanju (Šilović i sur., 2012b).

Pozitivna korelacija vrste CC9902 (skupina IV) sa salinitetom u površinskom sloju, a negativna korelacija u pridnenom sloju, kao i detekcija vrste WH7803 (skupina V) samo u površinskom sloju ukazuje na njihovu izrazito kompleksnu dinamiku.

Osim okolišnih parametara, bitnu funkciju u dinamici populacije *Synechococcus* svakako igraju i međuodnosi s drugim pripadnicima pikofitoplanktona. Općenito se smatra da su abundancije dva različita roda cijanobakterija *Prochlorococcus* i *Synechococcus* obrnuto proporcionalne (Partensky i sur., 1999). Kao što je vidljivo iz Tablice 4.5.1. u slučaju jako visokih abundancija cijanobakterija *Prochlorococcus*, *Synechococcus* bilježe niže vrijednosti. U oligotrofnim sustavima, što su pretežno sva otvorena mora, *Prochlorococcus* dominiraju u sustavom npr. u Crvenom moru ili centralnom Pacifiku (Tablica 4.5.1.), no u Jadranu čak i u pučinskom dijelu dominiraju cijanobakterije *Synechococcus* (Radić i sur., 2009; Šantić, 2010; Šantić i sur., 2011; Šilović i sur., 2011). Dominacija cijanobakterija roda *Synechococcus* u filogenetskoj strukturi prokariota slaže se s njihovom visokom abundancijom, te time potvrđuje njihovu iznimnu važnost u pikoplanktonskoj zajednici ovog područja.

Na osnovu distribucije planktonskih zajednica na istraživanom području Jadran možemo jasno definirati kao oligotrofno do mezotrofno područje, uključujući u to i obalnu zonu. Svi rezultati su pokazali da su atmosferski i hidrografske uvjeti najbitniji čimbenici koji modeliraju distribuciju i strukturu planktonske zajednice ovog područja.

Razumijevanje specifičnih uvjeta datog ekosustava unaprijediti će sposobnost procjene i znanja o utjecaju uvjeta okoliša na distribuciju i strukturu mikrobne zajednice u Jadranu.

5. ZAKLJUČCI

- Preciznost protočnog citometra snižena je prilikom mjerjenja uzoraka vrlo niskih ($40 \text{ stanica mL}^{-1}$) ili vrlo visokih koncentracija ($2,1 \times 10^6 \text{ stanica mL}^{-1}$) što rezultira visokim koeficijentima varijacije ($\text{KV}>10\%$). Prilikom mjerjenja takvih nisko koncentriranih i jako koncentriranih uzoraka suočavamo se s limitima instrumenta pri čemu su koeficijenti varijacije viši od 10 %. Optimalan protok čestica/stanica postižemo, uz smanjenje ili povećanje protoka ovisno o početnoj koncentraciji čestica/stanica u uzorku. No taj protok ne bi smio prelaziti 400 čestica/stanica u sekundi.
- Usporedbom abundancija pikofitoplanktona dobivenih epifluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom utvrđena je veća osjetljivost protočne citometrije. Najbolje podudaranje s mikroskopskim rezultatima mjerenih abundancija pronađeno je za populaciju cijanobakterija *Synechococcus*, dok je ukazano na mogućnost podcijenjivanja eukariotskih piko i nanofototrofa korištenjem metode epifluorescentne mikroskopije (slabije korelacije). Međutim kako bi se što potpunije i bolje opisala fitoplanktonska zajednica neophodno je koristiti obje metode.
- Usporedbom fiksiranih i nefiksiranih uzoraka utvrđeno je opadanje fluorescencije fiksiranih uzoraka, poglavito za populaciju *Synechococcus*. Fluorescencija piko- i nanoeukariota nije se znatno promijenila, međutim dodatak fiksativa (0,5% glutaraldehid) rezultirao je dvostruko manjim brojem nanoeukariota.
Navedena opažanja ukazuju na poželjno izbjegavanje fiksativa i mjerjenja nefiksiranih uzoraka kada god je to moguće.
- Učinak fiksativa paraformaldehyda (0,2 % PFA) i glutaraldehyda u dvije različite koncentracije (0,5 i 0,1 %GA) nije pokazao vidan kvantitativan utjecaj. Utvrđeno je da uzorci fiksirani različitim fiksativima značajno koreliraju za sve testirane populacije (*Synechococcus*, pikoeukarioti, nanoeukarioti), no najveći faktori korelacija nađeni su za populaciju cijanobakterija *Synechococcus*.

Raspodjela biomarkera DV-Chl *a* i zeaksantin u odnosu na raspodjelu cijanobakterija

- Prisustvo DV-Chl *a* zabilježeno je ovim radom po prvi put u Jadrani, i to samo u vodama južnog Jadrana. DV-Chl *a* nije detektiran na području Velebitskog, Paškog kanala i na postaji RV001, što potvrđuje mjerena protočnom citometrijom, kojom također populacija cijanobakterija *Prochlorococcus* nije zabilježena.
- visoke vrijednosti zeaksantina podudarale su se s visokim abundancijama cijanobakterija *Synechococcus* međutim njegova raspodjela se nije u potpunosti podudarala s raspodjelom abundancije cijanobakterija *Synechococcus* u području sjevernog Jadrana
- nepodudaranje raspodjele zeaksantina s raspodjelom abundancije cijanobakterija *Synechococcus* posljedicom je prisutnosti različitih sojeva koje se različitim mehanizmima prilagođavaju na varijacije u intezitetu svjetla.

Raspodjela pikoplanktona pokazala je utjecaj hidrološke nestabilnosti na distribuciju sastavnica pikofitoplanktona u istraživanom području Jadrana:

- U južnom Jadraru intruzija toplog LIW-a uzrokovala je maskimalne abundancije cijanobakterija rodova *Prochlorococcus* i *Synechococcus*, kao i pojavu dva *Synechococcus* ekotipa. Najveće abundancije pikoeukariota zabilježene su na postajama otvorenog mora, pod najjačim utjecajem EAC-a što upućuje na njihovu otpornost na hidrološke nestabilnosti. Nasuprot tome, jak utjecaj EAC-a na središnjem i istočnom dijelu bazena pokazao se nepovoljnim za razvoj cijanobakterija *Prochlorococcus*.
- U području sjeveroistočnog Jadrana (Velebitski i Paški kanal, te estuarij rijeke Zrmanje) veći doprinos pikoplanktona i nanoplanktona zabilježen je u vanjskom dijelu kanala ukazujući na njihovu preferenciju prema oligotrofnim uvjetima, dok je tranzicijskom zonom estuarija dominirao mikrofitoplankton, i to poglavito dijatomeje.
- U otvorenim vodama sjevernog Jadrana, uz jasno definiran trofički gradijent, promjene u udjelima piko-, nano- i mikrofrakcije unutar fitoplanktona bile su određene sezonskim i hidrografskim nestabilnostima u akvatoriju. Slabije prisustvo populacije *Prochlorococcus*, te veća abundancija pikoeukariota upućuju na povremenu mezotrofnost područja.

- U Limskom kanalu varijacije u atmosferskim i hidrografskim prilikama uzrokovale su promjene u strukturi fitoplanktona, a time i razlike u doprinosu pojedinih veličinskih klasa ukupnoj biomasi unutar istog perioda različitih godina.
- U obalnoj zoni sjevernog Jadrana oligotrofni uvjeti zajedno sa složenim hidrološkim značajkama istraživanog područja bitno su se odrazili na dinamične promjene strukture bakterijske zajednice u površinskom i pridnenom sloju vodenog stupca. Stoga se struktura mikrobne zajednice razlikovala između površinskog i pridnenog sloja tijekom čitavog istraživanog perioda neovisno o stabilnosti vodenog stupca. Navedeni zaključci su u skladu s prijašnjim zapažanjima Celussija i sur. (2011) da se bakterijska zajednica u sjevernom Jadranu znatno mijenja od godine do godine u skladu s prevladavajućim utjecajima u okolišu.
- Iako populacija pikoeukariota u niti jednom navedenom području nije bila brojčano dominantna njihova dominacija u pikoplanktonskoj biomasi u pojedinim dijelovima godine u obalnoj zoni sjevernog Jadrana upućuje na njihovu važnost.
- Cijanobakterije roda *Synechococcus* potvrdile su svoju brojačanu dominantnost, kako unutar autotrofnog, tako i unutar njegovog prokariotskog dijela (16s rRNA). Među detektiranim vrstama bakterijske zajednice *Synechococcus* je predstavljao najzastupljeniju svojtu. Dominacija cijanobakterija roda *Synechococcus* tijekom sezone u obalnoj zoni sjevernog Jadrana u skladu je s dosad opaženom dominacijom u abundanciji i biomasi diljem Jadran, te potvrđuje njihovu važnost u pikoplanktonskoj zajednici ovog područja. Ograničavajući čimbenik za populaciju *Synechococcus* je na čitavom istraživanom području većim dijelom predstavljala temperatura nego prisutnost hranjiva.
Po prvi puta za područje Jadrana zabilježena je prisutnost dva tipa cijanobakterija *Synechococcus*, jedan tip s visokim sličnosti sa sojem *Synechococcus* CC9902, prisutan u površinskom i u pridnenom sloju, te drugi tip visoke sličnosti soju *Synechococcus* WH7803, prisutan samo u površinskom sloju. Pozitivna korelacija vrste CC9902 (skupina IV) sa salinitetom u površinskom sloju, a negativna korelacija u pridnenom sloju, kao i detekcija vrste WH7803 (skupina V) samo u površinskom sloju ukazuje na njihovu izrazito kompleksnu dinamiku.

LITERATURA:

Acinas, S., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C. 1997. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24:27-40

Agawin, N.S.R., Duarte, C.M., Agusti, S. 1998. Growth and abundance of *Synechococcus* sp. in a Mediterranean Bay: seasonality and relation with temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170: 45-53

Alonso-Gutiérrez, J., Lekunberri, I., Teira, E., Gasol, J.M., Figueras, A., Novoa, B. 2009. Bacterioplankton composition of coastal upwelling system of „Ría de Vigo“, NW Spain. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70:493-505

Alonso-Sáez, L., Balagué, V., Sá, E.L., Sánchez, O., González, J.M., Pinhassi, J., Massana, R., Pernthaler, J., Pedrós-Alió, C., Gasol, J.M. 2007. Seasonality in bacterial diversity in north- west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60:98-112

Antia, N.J., McAllister, C.D., Parsons, T.R., Stephens, K., Strickland, J.D.H. 1963. Further measurements of primary production using large-volume plastic sphere. *Limnol. Oceanogr.* 8: 166-183

Artegiani, A., Bregant, D., Paschini, E., Pinardi, N., Raicich, F., Russo, A. 1997. The Adriatic sea general circulation: Part II. Baroclinic circulation structure. *J. Phys. Oceanogr.* 27:1515-1532

Baltar, F., Arístegui, J., Montero, M.F. Espino, M. Gasol, J.M., Herndl, G.J. 2009. Mesoscale variability modulates seasonal changes in the trophic structure of nano- and picoplankton communities across the NW Africa-Canary Islands transition zone. *Prog. Oceanogr.* 83:180-188

Barlow, R.G., Cummings, D.G., Gibb S.W. 1997. Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls *a* and *b* and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse phase C-8 HPLC. Mar. Ecol. Prog. Ser. 161:303-307

Batistić, M., Jasprica, N., Carić, M., Čalić, M., Kovačević, V., Garić, R., Njire, J., Mikuš, J., Bobanović-Ćolić, S. 2012. Biological evidence of a winter convection event in the Southern Adriatic: A phytoplankton maximum in the aphotic zone. Cont. Shelf. Res. 44:57-71

Bec, B., Husseini-Ratrema, J., Collos, Y, Souchu, P, Vaquer, A. 2005. Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeucaryote community. J. Plankton Res. 27:881-894

Bernardy-Aubry, B.F., Acri, F., Bastianini, M., Pugnetti, A., Socal, G. 2006. Picophytoplankton contribution to phytoplankton community structure in the gulf of Venice (NW Adriatic sea). Int. Rev. Hydrobiol. 91:51-70

Binder, B.J., Chisholm, S.W. 1995. Cell-cycle regulation in marine *Synechococcus* sp strains. Appl. Environ. Microb. 61:708-717

Blanchot, J., Andre, J.M., Navarette, C. Neveux, J., Radenac, M.H. 2001. Picophytoplankton in the equatorial Pacific: Vertical distributions in the warm pool and in the high nutrient low chlorophyll conditions. Deep-Sea Res. PT I48:297-314

Bonacci O., Roje-Bonacci T., 2000. Interpretation of groundwater level monitoring results in karst aquifers: examples from the Dinaric karst. Hydrol. Processes 14: 2423-2438

Bosak, S. Burić, Z., Djakovac, T., Viličić, D. 2009. Seasonal distribution of plankton diatoms in Lim Bay, northeastern Adriatic Sea. Acta Bot. Croat. 68:351-365

Booth, B.C. 1993. Estimating cell concentration and biomass of autotrophic plankton using microscopy. In: Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. (eds.), Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis publications, Boca Raton, FL, pp. 199-205

Boström, K.H., Simu, K., Hagström, Å., Riemann, L. 2004. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. Limnol. Oceanogr. Methods 2:365-373

Bouman, H.A., Ulloa, O., Scanlan, D.J., Zwirgmaier, K., Li, W.K.W., Platt, T., Stuart, V., Barlow, R., Leth, O., Clementson, L., Lutz, V., Fukasawa, M., Watanabe, S., Sathyendranath, S. 2006. Oceanographic basis of the global surface distribution of *Prochlorococcus* ecotypes. Science 312:918-921

Bratbak, G., Jacquet, S., Larsen, A., Pettersson, L.H., Sazhin, A., Thyrhaug, R. 2011. The plankton community in Norwegian coastal waters-abundance, composition, spatial distribution and diel variation. Cont. Shelf Res. 31:1500-1514

Brunet, C., Casotti, R., Vantrepotte, V., Conversano, F. 2007. Vertical variability and diel dynamics of picoplankton in the Strait of Sicily, Mediterranean Sea, in summer. Mar. Ecol. Prog. Ser. 346:15-26

Bryant, D. A. 2003. The beauty in small things revealed. PNAS 100: 9647-9649

Calvo-Díaz, A., Morán, X. A. G. 2006. Seasonal dynamics of picoplankton in shelf waters of the southern Bay of Biscay. Aquat. Microb. Ecol. 42:159-174

Calvo-Díaz, A., Morán, X.A.G., Suarez, L.A. 2008. Seasonality of picophytoplankton chlrophyll a and biomass int he central Cantabria Sea, southern Bay of Biscay. J. Mar. Syst. 72:271-281

Campbell, L., Vaulot, D. 1993. Photosynthetic picoplankton community structure in the subtropical North Pacific Ocean near Hawaii (Station Aloha). Deep-Sea Res. PI 40:2043-2060

Campbell, L., Landry, M.R., Constantinou, J., Nolla, H.A., Brown, S.L. Liu, Caron, D.A. 1998. Response of microbial community structure to environmental forcing in Arabian Sea. Deep-Sea Res. P II 45:2301-2325

Caron, D. A. 1983. A technique for the enumeration of photosynthetic and heterotrophic nanoplankton using epifluorescence microscopy, and a comparison with other procedures. Appl. Environ. Microbiol. 46:491-498

Celussi, M., Cataletto, B. 2007. Annual dynamics of bacterioplankton assemblages in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). Gene 406:113-123

Celussi, M., Paoli, A., Bernardy-Aubry, F., Bastianini, M., Del Negro, P. 2008. Diel microbial variations at a coastal Northern Adriatic station affected by Po river outflows. Estuar. Coast.ShelfS. 76:36-44

Celussi, M., Bussani, A., Cataletto, B., Del Negro, P. 2011. Assemblages' structure and activity of bacterioplankton in northern Adriatic Sea surface waters: a 3-year case study. FEMS Microbiol. Ecol. 75:77-88

Cerino, F., BernardyAubry, F., Coppola, J., La Ferla, R., Maimone, G., Socal, G., Totti, C. 2012. Spatial and temporal variability of pico-, nano- and microphytoplankton in the offshore waters of the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea).Cont. Shelf Res. 44:94-105

Cermeño, P., Marañón, E. Harbour, D., Harris, R.P. 2006. Invariant scaling of phytoplankton abundance and cell size in contrasting marine environments. Ecol.Lett. 9:1210-1215

Charles, F., Lantoine, F., Brugel, S., Chrétiennot-Dinet, M. J., Quiroga, I., Rivière, B. 2005. Seasonal survey of the phytoplankton biomass, composition and production in a littoral NW Mediterranean site, with special emphasis on the picoplanktonic contribution. Estuar. Coast. Shelf S. 65:199-212

Charpy, L., Blanchot, J. 1998. Photosynthetic picoplankton in French Polynesia atoll lagoon: Estimation of taxa contribution to biomass and production by flow cytometry. Mar. Ecol.-Prog. Ser. 162:57-70

Chavez, F. P., Buck, K. R., Barber, R. T. 1990. Phytoplankton taxa in relation to primary production in the equatorial Pacific. Deep Sea Res. 37:1733-1752

Chisholm, S.W, Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke, R., Waterbury, J., Welschmeyer, N. 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334: 340-343

Chisholm, S. W. 1992a. Phytoplankton Size. In Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea. P.G. Falkowski, & A.D. Woodhead (eds). Plenum, New York, pp. 213-237

Chisholm, S.W., Frankel, S.L., Goericke, R., Olson, R.J., Palenik, B., Waterbury, J.B., Westjohnsrud, L., Zettler, E.R. 1992b. *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: An oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. Arch. Microbiol. 157:297-300

Clarke, K.R., Gorley, R.N. 2006. PRIMER v6: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth.

Crosbie, N.D., Teubner, K., Weisse, T. 2003. Flow-cytometriy mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. Aquat. Microb. Ecol. 33:53-66

Civitarese, G., Gačić, M., Vetrano, A., Boldrin, A., Bregant, D., Rabitti, S., Souvermezoglou, E. 1998. Biogeochemical fluxes through the Strait of Otranto (Eastern Mediterranean). Cont. ShelfRes.18:773-789

Degobbis D., Donazzolo R., Ivančić I., Pavoni B., Marcomini A., 1986. Nutrientanalyses in naturalwaters: a criticalrevision. Annali di Chimica 76:179-194

Degobbis, D., Precali, R., Ivančić, I., Smndlaka, N., Fuks, D., Kveder, S. 2000. Long term changes in the northern Adriatic ecosystem related to antrophogenic eutrophication. Int J. Environ. Pollut. 13:495-533

Del Giorgio, P.A., D.F. Bird, Y.T. Prairie, Planas,D. 1996. Flow cytometric determination of bacterial abundance in lake plankton with the green nucleid acid stain SYTO 13. Limnol. Oceanogr. 41:783-789

De Long, E., Karl, D.M. 2005. Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature 437:336-342

Díez, B., Pedrós-Alió, C., Massana R. 2001. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 67:2932-2941

Dorman C.E., Carniel S., Cavalieri L., Sclavo M., Chiggiato J., Doyle J., Haack T., Pullen J., Grbec B., Vilibić I., Janeković I., Lee C., Malačić V., Orlić M., Paschini E., Russo A., Signell R.P. 2006. February 2003 marine atmospheric conditions and the bora over the northern Adriatic. J. Geophys. Res. 111, art. no C03S03

Dubelaar, G.B.J., Jonker, R.R. 2000. Flow cytometry as a tool for study of phytoplankton. Sci. Mar. 64:135-156

Dubinsky, Z., Schofield, O. 2009. From the light to the darkness: thriving at the light extremes in the oceans. Hydrobiologia. 639:153-171

Dusenberry, J. A., Olson, R.J., Chisholm, S.W. 1999. Frequency distributions of phytoplankton single-cell fluorescence and vertical mixing in the surface ocean. Limnol. Oceanogr. 44:431-435

Fischer, S.G., Lerman, L. S. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. Proc. Natl. Acad. Sci. 80:1579-1583

Fonda Umani, S., Del Negro, p., Larato, C., De vittor, C., Cabrini, M., Celio, M., Falconi, C., Tamberlich, F., Azam, F. 2007. Major inter-annual variations in microbial dynamics int he Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea) and their ecosystem implications. Aquat. Microb. Ecol. 46:163-175

Fuchs, B.M., Woebken, D., Zubkov, M.V., Burkill, P., Amann, R. 2005. Molecular identification of picoplankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. Aquat. Microb. Ecol. 39:145-157

Fuks, D. 1995. Uloga bakterioplanktona u ekosustavu sjevernog Jadrana. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, pp. 152

Fuks, D., Radić, J., Radić, T., Najdek, M. Blažina, M., Degobbis, D., Smoljaka, N. 2005. Relationships between heterotrophic bacteria and cyanobacteria in the northern Adriatic. Sci.Total Environ. 353:178-188

Fuller, N.J., West, N.J. 2005. Dynamics of community and phosphate status of picocyanobacterial populations in the Gulf of Aqaba, Red Sea. Limnol. Oceanogr. 50: 363-375

Fuller N.J., Tarran G.A., Yallop M., Orcutt K.M., Scanlan D.J. 2006. Molecular analysis of picocyanobacterial community structure along an Arabian Sea transect reveals distinct spatial separation of lineages. Limnol. Oceanogr. 51:2515-2526

Gaćić, M., Poulain, P.M., Zore-Armanda, M., Barale, V., 2001.Overview. In: Cushman-Roisin, B., Gaćić, M., Poulain, P.M., Artegiani, A. (Eds.) Physical Oceanography of the Adriatic Sea. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-42

Gallina, A.A., Celussi, M., del Negro, P. 2011. Large-scale distribution and production of bacterioplankton in the Adriatic Sea. *J. Sea Res.* 66:1-8

Gasol, J. M., Guerrero, R., Pedrós-Alió, C. 1991. Seasonal variations in size structure and prokaryotic dominance in sulfurous Lake Cisó. *Limnol. Oceanogr.* 36:860-872

Gasol, J.M., Del Giorgio, P.A. 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sci. Mar.* 64:197-224

Gill, A., 1982. *Atmosphere-Ocean Dynamics*, Academic Press, Toronto, pp. 662

Gin, K.Y.H, Zahng, S., Lee, Y.K., 2003. Phytoplankton community structure in Singapore's coastal waters using HPLC pigment analysis and flow cytometry. *J. Plankton Res.* 12:1507-1519

Giovanonni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G. 1990. Genetic diversity in the Sargasso sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63

Giovanonni S.J., Rappé M.S. 2000. Evolution, diversity and microbial ecology of marine prokaryotes. In: Kirchman DL. (ed) *Microbial ecology of the oceans*. Wiley- Liss, New York, pp. 47-84

Glover, H.E., C. Garside, C.C. Trees. 2007. Physiological responses of Sargasso Sea picoplankton to nanomolar nitrate perturbations. *J. Plankton Res.* 29:263-274

González, J.M., Moran, A.M. 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Appl. Environ. Microb.* 63:4237-4242

Guillou, L., Jacquet, S., Chretiennot-Dinet, M.J., Vaulot, D. 2001. Grazing impact of two small heterotrophic flagellates on *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Aquat.Microb. Ecol.* 26:201-207

Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Zohary, T., Pollingher, U. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J.Phycol.* 35:403-424

Huete-Ortega, M., Calvo-Díaz, A., Graña, R. 2011. Effect of environmental forcing on the biomass, production and growth rate of size-fractionated phytoplankton in the central Atlantic Ocean. *J Mar. Syst.* 88:203-213

Iriarte, A., Purdie, D.A. 1994. Size distribution of chlorophyll *a* biomass and primary production in a temperate estuary (Southampton Water): the contribution of photosynthetic picoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 115:283-297

Irwin, A.J., Finkel, Z.V., Schofield, O.M.E., Falkowsky, P. 2006. Scaling-up from nutrient physiology to the size structure of phytoplankton communities. *J. Plankton Res.* 28:459-471

Ivančić, I., Degobbis, D. 1984. An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. *Water research* 18:1143-1147

Ivančić, I., Fuks, D., Najdek, M., Blažina, M., Devescovi, M., Šilović, T., Paliaga, P., Orlić, S. 2010. Long-term changes in heterotrophic prokaryotes abundance and growth characteristics in the northern Adriatic Sea. *J Mar. Syst.* 82:206-216

Jacquet, S., Lennon, J.F., Marie, D., Vaulot, D. 1998. Picoplankton population dynamics in coastal waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 43:1916-1931

Jasprica, N., Carić, M., Viličić, N., 2000. Relationships of subsurface chlorophyll maximum to diatoms and other microphytoplankton in the southern Adriatic Sea. *Proceedings of the 16th International Diatom Symposium*, Athens, Greece, pp. 365-379

Jensen, P.R. 2010. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37:219-224

Kan J, Crump BC, Wang K, Chen F. 2006. Bacterioplankton community in Chesapeake Bay: Predictible or random assemblages. Limnol. Oceanogr. 51:2157-2169

Kiørboe, T.1993. Turbulence, phytoplankton cell size, and the structure of pelagic food webs. Adv. Mar. Biol. 29:1-72

Kana, T.M., Glibert, P.M., Goericke, R., Welschmeyer, N.A. 1988. Zeaxanthin and L-carotene in *Synechococcus* WH7803 respond differently to irradiance. Limnol. Oceanogr. 3:1623-1627

Kovačević, V., Gačić, M., Poulaïn, P.-M., 1999. Eulerian current measurements in the Strait of Otranto and in the Southern Adriatic. J Mar. Syst. 20:255-278

Kudoh, S., Kanda, J., Takahashi, M. 1990. Specific growth rates and grazing mortality of chroococco~d cyanobacteria *Synechococcus* spp. in pelagic surface waters in the sea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 142:201-212

Lebaron, P., N. Parthuisot, Catala, P. 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. Appl. Environ. Microbiol., 64:1725-1730

Legendre, L., Le Févre, J. 1991. From individual plankton cells to pelagic marine ecosystems and to global biochemical cycles. In Demers, S (ed.), Particle analysis in oceanography. Springer-Verlag, Berlin:260-299

Lepesteur, M., Martin, J.M., Fleury, A. 1993. A comparative study of different preservation methods for phytoplankton cell analysis by flow cytometry. Mar. Ecol. Prog. Ser. 93:55-63

Li ,W.K.W., Wood A.M. 1988. Vertical distribution of NorthAtlantic ultraphytoplankton analysis by flow cytometry. Deep Sea Res. 35:1615-1638

Li, W.K.W. 1990. Particles in „particle-free“seawater: growth of ultraphytoplankton and implications for dilution experiment. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 874-880

Lindell, D., Post, A.F. 1995. Ultraphytoplankton succession is triggered by deep winter mixing in the Gulf of Aqaba (Eilat), Red Sea. Limnol. Oceanogr.40:1130-1141

Liu, H., Chang, J., tseng, C.M., Wen, L.S., Liu, K.K. 2007. Seasonal variability of picoplankton in the Northern South China Sea at the SEATS station. Deep Sea Res. PII 54: 1602-1616

Lund, J.W.G., Kipling, C., Le Cren, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. Hydrobiologia, 11:143-170

Ljubešić, Z., Bosak, S. Viličić, D., Kralj-Borojević, K., Marić, D., Godrijan, J., Ujević, I., Peharec, P. 2011. Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). Harmful Algae 10:713-722

Magazzu, G., Decembrini, F. 1995. Primary production, biomass and abundance of phototrophic picoplankton in the Mediterranean Sea. Aquat. Microb. Ecol. 9:97-104

Maguer, J.F., L'helguen, S., Caradec, J., Klein, C. 2011. Size-dependent nutrient uptake of nitrate and ammonium as a function of light in well-mixed temperate coastal waters. Cont. Shelf. Res. 31:1620-1631

Malej, A., Mozetič, P., Malačić, V., Terzić, S., Ahel, M. 1995. Phytoplankton responses to freshwater inputs in a small semi-enclosed gulf (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). Mar. Ecol. Prog. Ser. 120:111-121

Makjanić B. 1976. A short account of the climate of the town of Senj, [In:] Local wind bora, M.M. Yoshino (ed.), University of Tokyo Press, Tokyo. pp. 145-152

Malone, T.C., Ducklow, H.W. Peele, E.R., Pike, S.E. 1991. Picoplankton carbon flux in Chesapeake Bay. Mar. Ecol. Prog. Ser. 78:11-22

Marañón, E., Holligan, P.M., Barciela, R., González, N., Mouríño, B., Pazó, M.J., Varela, M. 2001. Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments. Mar. Ecol. Prog. Ser. 216:43–56

Margalef, R. 1978. Life forms of phytoplankton as survival alternatives in the unstable environment. Oceanol. Acta 1:493-509

Marie, D., F. Partensky, Vaulot, D. 1996. Application of the novel DNA dyes YOYO-1, YOPRO-1 and Picogreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. Appl. Environ. Microbiol. 62:1649-1655

Marie, D., Brussard, C.P.D., Thyrhaug, R., Bratbak, G., Vaulot, D. 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. 65:45-52

Marie, D., Simon, N., Vaulot, D. 2005. Phytoplankton cell counting by flow cytometry. In Andersen, R. A. [ed.], Algal Culturing Techniques. Academic Press. pp. 253-267

Marry, I., Heywood, J.L., Fuchs, B.M., Amann, R., Tarran, G.A., Burkhill, P.H., Zubkov, M.V. 2006. SAR11 dominance among metabolically active low nucleic acid bacterioplankton in surface waters along an Atlantic meridional transect. Aquat. Microb. Ecol. 45:107-113

Martiny, A.C., Kathuria, S., Berube, P.M., 2009. Widespread metabolic potential for nitrite and nitrate assimilation among *Prochlorococcus* ecotypes. PNAS 106:10787-10792

Masquelier, S., Vaulot, D. 2007. Distribution of micro-organisms along a transect in the South-East Pacific Ocean (BIOSOPE cruise) from epifluorescence microscopy. Biogeoscience Discuss. 4:2667-2697

Menden-Deuer, S., Lessard E.J. 2000. Carbon to volume relationship for dinoflagellates, diatoms and other protists plankton. Limnol. Oceanogr. 45:569-579

Menden-Deuer, S., Lessard E.J., Satterberg, J. 2001. Effect of preservation on dinoflagellate and diatom cell volume and consequences for carbon biomass prediction. Mar. Ecol. Prog. Ser. 222:41-50

Mihanović, H., Cosoli, S., Ivanković, D., Dadić, V., Gačić, M. 2011. Surface current patterns in the northern Adriatic extracted from high- frequency radar data using self-organizing map analysis. J. Geophys. Res. 116(C08033) doi:10.1029/2011JC007104

Moore, L.R., Post, A.F., Rocap, G., Chisholm, S.W., 2002. Utilization of different nitrogen sources by marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. Limnol. Oceanogr. 47:989-996

Morris, R.M., Rappe, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Stebold, W.A., Carlson, C.A., Giovanonni, S.J. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. Nature 420:806-810

Mozetič, P., Solidoro, C., Cossarini, G., Socal, G., Precali, R., Francé, J., Bianchi, F., De Vittor, C., Smidlaka, N., Fonda Umani, S. 2009. Recent Trends Towards Oligotrophication of the Northern Adriatic: Evidence from Chlorophyll a Time Series. Estuaries Coasts 33:362-375

Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., Orrego, C. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Appl. Environ. Microb. 62:2676-80

Murray, A.E., Preston, C.M., Massana, R., Taylor, L.T., Blakis, A., Wu, K., DeLong, E.F. 1998. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microb.* 64:2585-95

Not, F., Latasa, M., Scharek, R., Viprey, M., Karleskind, P., Balagué, V., Ontoria, I., Cumino, A., Goetze, E., Vaulot, D., Massana, R. 2008. Protistan assemblages across the Indian Ocean, with a specific emphasis on the picoeukaryotes. *Deep Sea Res PT* 155:1456-1473

Ninčević, Ž. 2000. Biomasa veličinskih kategorija fitoplanktona u srednjem Jadranu. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, pp. 128

Ninčević, Ž., Marasović, I., Kušpilić, G., 2002. Deep chlorophyll *a* maximum at one station in the middle Adriatic Sea. *JMBA* 82:9-19

Ninčević-Gladan, Ž., Marasović, I., Kušpilić, G., Krstulović, N., Šolić, M., Šestanović, S. 2006. Abundance and composition of picoplankton in the mid Adriatic Sea. *Acta Adriat.* 47: 127-140

Olson, R.J., Chisholm, S.W., Zettler, E.R., Armbrust, E.V. 1988. Analysis of *Synechococcus* pigment types in the sea using single and dual beam flow cytometry. *Deep-Sea Res.* 35:425-440

Olson, R.J., Chisholm, S.W., Zettler, E.R., Armbrust, E.V. 1990. Pigments, size and distribution of *Synechococcus* in the North Atlantic and Pacific oceans. *Limnol. Oceanogr.* 35:45-58

Orlić, M., Gačić, M., La Violette P.E. 1992. The currents and circulation of the Adriatic Sea. *Oceanol. Acta* 15:109-124

Orlić M., Leder N., Pasarić M., Smirčić A. 2000. Physical properties and currents recorded during September and October 1998 in the Velebit Channel (east Adriatic). *Period. Biol.* 102:31-37

Orlić, M., Dadić, V., Grbec, B., Leder, N., Marki, A., Matić, F., Mihanović, H., BegPaklar, G., Pasarić, M., Pasarić, Z., Vilibić, I. 2007. Wintertime buoyancy forcing, changing seawater properties and two different circulation systems produced in the Adriatic. *J. Geophys. Res.* 111, C03S07

Pan, L.A., Zhang, J., Chen, Q., Deng, B. 2006. Picoplankton community structure at a coastal front region in the northern part of the Sout China Sea. *J. Plankton Res.* 28:337-343

Pan, L.A., Zhang, J., Zhang, L.H. 2007. Picophytoplankton, nanophytoplankton, heterotrophic bacteria and viruses in the Changjiang Estuary and adjacent coastal waters. *J. Plankton Res.* 29:187-197

Paoli, A., Celussi, M., Valeri, A., Larato, C., Bussani, A., FondaUmani, S., Vadrucci, M.R., Mazziotti, C., DelNegro, P., 2007. Picocyanobacteria in Adriatic transitional environments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 75:13-20

Paoli, A., Celussi, M., Del Negro, P., Fonda Umani, S., Talarico, L. 2008. Ecological adventages from light adaptation and heterotrophic-like behaviour in *Synechococcus* harvested from Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *FEMS Microbiol. Ecol.* 64:219-229

Parsons, T.R., Maita,Y., Lalli, C.M., 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford, pp. 173

Partensky, F., Blanchot, J., Lantoine, F., Neveux, J., Marie, D. 1996. Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites in the northeastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.* 43:1191-1213

Partensky, F., Hess W.R., Vaulot, D. 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbial. Mol. Biol. Rew.* 63:162-127

Paerl, H.W., J. Dyble, P.H. Moisander, R.T. Noble, M.F. Piehler, J.T. Pinckney, L. Twomey, Valdes, L.M. 2003. Microbial indicators of aquatic ecosystems change: current application to eutrophic studies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46:233-246

Peña, A., Lewis, M.R., Harrison, G. 1990. Primary production and size structure of phytoplankton biomass on a transect of the equator at 135°W in the Pacific Ocean. *Deep- Sea Res.* 37:295-315

Penzar, B., Penzar, I., Orlić, M. 2001. *Vrijeme i klima hrvatskog Jadrana*. Nakladna kuća Feletar, Hrvatski Hidrografski institut, Split, Zagreb, pp. 258

Pinhassi, J., Hagström Å. 2000. Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 21(Hollibaugh 1994):245-256

Pingree R.D., Pugh P.R., Holligan P.M., Head R.N. 1975. Summer phytoplankton blooms and red tides along tidal fronts in the approaches to the English Chanell. *Nature* 258: 672-677

Poulain, P.-M., Cushman-Roisin, B. 2001. Circulation. In: Cushman-Roisin, B., Gačić, M., Poulain, P.M., Artegiani, A. (Eds.) *Physical Oceanography of the Adriatic Sea*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 67-110

Poulain, P.-M., Gačić, M., Vetrano, A. 1996. Current measurements in the Strait of Otranto reveal unforeseen aspects of its hydrodynamics. *Eos, Transactions, American Geophysical Union* 77 (36): 345-348

Poulain, P.M., Raicich, F., 2001. Forcings. In: Cushman-Roisin, B., Gačić, M., Poulain, P.M., Artegiani, A. (Eds.) *Physical Oceanography of the Adriatic Sea*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 45-66

Post, A.F., Penno, S., Zandbank, K., Payton, A., Huse, S.M., Welch, D.M. 2011. Long term seasonal dynamics of *Synechococcus* population structure in the Gulf of Aqaba. FMICB 2, a 131:1-12

Postius, C., Kenter, U., Wacker, A., Ernst, A., Boëger, P. 1998. Light causes selection among two phycoerythrin-rich *Synechococcus* isolates from Lake Constance. FEMS Microbiol. Ecol. 25:171-178

Pugnetti, A., Bazzoni, A.M., Beran, A., Aubry, F.B., Camatti, E., Celussi, M., Coppola, J., Crevetin, E., Del Negro, P., Paoli, A., 2008. Changes in biomass structure and trophic status of the plankton communities in a highly dynamic ecosystem (Gulf of Venice, Northern Adriatic Sea). Mar. Ecol. 28:367-374

Radić, J. 2006. Pikoplankton i nanoplankton duž transekta Rovinj-Po u razdoblju od 1990. do 2001. Magistarski rad, Prirodoslovno- matematički fakultet, pp. 106

Radić, T., Šilović, T., Šantić, D., Fuks, D., Mičić, M., 2009. Preliminary flow cytometry analysis of phototrophic pico- and nanoplankton communities in the Northern Adriatic. Fresen. Environ. Bull. 18 (5a): 715-724

Raicich, F., 1996. On the fresh water balance of the Adriatic Sea. J. Mar. Syst. 9: 305-319

Raven, J.A. 1998. The twelfth Tansley lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. Funct. Ecol. 12: 503–513

Reckermann, M. 2000. Flow sorting in aquatic ecology. Sci. Mar. 64: 235-246

Revelante, N., Gilmartin, M. 1992. The lateral advection of particulate organic matter from the Po Delta region during summer stratification and its implications for the northern Adriatic. Estuar. Coast. Shelf Sci. 35: 191-212

Revelante, N., Gilmartin,M. 1995. The relative increase of larger phytoplankton in a subsurface chlorophyll maximum in Northern Adriatic Sea. J. Plankton Res. 17:1535–1562

Robidart , J.C., Preston, C.M., Paerl, R.W., Turk, K. A, Mosier, A.C., Francis, C. A., Scholin, C.A., Zehr, J.P. 2012. Seasonal *Synechococcus* and *Thaumarchaeal* population dynamics examined with high resolution with remote in situ instrumentation. ISME J. 6:513-23

Rodríguez, J., Jiménez, F., Bautista, B., Rodriguez, V. 1987. Planktonic biomass spectra dynamics during a winter production pulse in Mediterranean coastal waters. J. Plankton Res. 9:1183-1194

Rodríguez, J., Tintoré J., Allen, J.T. Blanco, J.M., Gomis, D., Reul, A., RUIZ, J., Rodríguez, V., Echevarría, F., Jiménez-Gómez, F. 2001. Mesoscale vertical motion and the size structure of phytoplankton in the ocean. Nature 410:360-363

Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T. 2005. Phytoplankton Monitoring by High Performance Flow Cytometry A Successful Approach? Cytometry 64:16–26

Sato, M., Yoshikawa, T., Takeda, S., Furuya, K. 2007. Application of the size-fractionation method to simultaneous estimation of clearance rates by heterotrophic flagellates and ciliates of pico- and nanophytoplankton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 349:334-343

Scanlan, D.J. 2003. Physiological diversity and niche adaptation in marine *Synechococcus*. Adv. Microb. Physiol. 47:1-64

Scanlan, D.J., Ostrowski, M., Mazard, S., Dufrense, A., Garczarek, L., Hess, W.R., Post, A. F., Hagemann, M., Paulsen, I., Partensky, F., 2009. Ecological genomics of marine Picocyanobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73:249-299

Schauer, M., Massana, R., Pedrós-Alió, C. 2000. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assesed by molecular fingerprinting. FEMS Microbiol. Ecol. 33:51-59

Schauer, M., Balagué, V., Pedrós-Alió, C., Massana, R. 2003. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat. Microb. Ecol.* 31:163-174

Shapiro, H.M. 2003. Practical flow cytometry, 4 th ed., John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, pp. 18-21; pp. 214-425

Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:232-236

Sheffield V.C., Beck, J.S., Stone, E.M., Myers, R.M. 1992. A simple and efficient method for attachment of a 40-base pair, GC-rich sequence to PCR-amplified DNA. *BioTechniques* 12: 386-387

Semina, H.J. 1968. Water movement and the size of the phytoplankton cells. *Sarsia* 34:267-272

Simon, N., Barlow, R. G., Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D. 1994. Characterization of oceanic photosynthetic picoeukaryotes by flow cytometry analysis. *J. Phycol.* 30:922-935

Socal, G., Boldrin, A., Bianchi, F., Civitarese, G., De Lazzari, A., Rabitti, S., Totti, C., Turchetto, M. 1999. Nutrient, particulate matter and phytoplankton variability in the photic layer of the Otranto strait. *J. Mar. Syst.* 20:381-398

Socal, G., Acri, F., Bastianini, M., Bernardi- Aubry, F., Bianchi, F., Cassin, D., Coppola, J., De Lazzari, A., Bandelj, V., Cossarini, G., Solidoro, C. 2008. Hydrological and biogeochemical features of the Northern Adriatic Sea in the period 2003-2006. *Mar. Ecol.* 29:449-468

Solidoro, C., Bastianini, M., Bandelj, V., Codermatz, R., Cossarini, G., Melaku, C.D., Ravagnan, E., Salon, S., Trevisani, S. 2009. Current state, scales of variability and decadal trends of biogeochemical properties in the NAS. *J. Geophys. Res.* 114, C07S91: doi:10.1029/2008JC004838

Sorokin, P.Y., Sorokin, Y.I., Boscolo, R. Giovanardi, O.2004. Bloom of picocyanobacteria in the Venice lagoon during summer-autumn 2001: ecological sequences. *Hydrobiologia*, 523:71-85

Sorokin, Y.I., Dallochio, F. 2008. Dynamics of phosphorus in the Venice lagoon during a picocyanobacteria bloom. *J. Plankton Res.* 30:1019-1026

Stainer, R.Y., Cohen-Bazire, G. 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:225-274

Stockner, J. G. 1988. Phototrophic picoplankton: An overview from marine and freshwater ecosystems. *Limnol. Oceanogr.* 33:765-775

Supić, N., Orlić, M., Degobbis, D. 2000. Istrian coastal countercurrent and its year-to-year variability. *Est. Coast. Shelf Sci.* 51:385-397

Supić, N., Djakovac, T., Krajcar, V., Kuzmić, M., Precali, R. 2006. Effects of excessive Po River discharges in the northern Adriatic. *Fresenius Environ. Bull.* 15: 193-199

Svensen, C., Viličić, D., Wassmann, P., Arashkevich, E., Ratkova, T. 2007. Plankton distribution and vertical flux of biogenic matter during high summer stratification in the Krka estuary (Eastern Adriatic). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 71:381-390

Šantić, D. 2010. Raspoljela i aktivnost prokariotskih mikroorganizama u području srednjeg i južnog Jadranu. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, pp. 165

Šantić, D., Krstulović, N., Šolić, M., Kušpilić, G. 2011. Distribution of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* in the central Adriatic sea. *Acta Adriat.* 52(1):101-114

Šantić, D., Krstulović, N., Šolić, M., Kušpilić, G. 2012. HNA and LNA bacteria in relation to the activity of heterotrophic bacteria. *Acta Adriat.* 53(1):25-40

Šilović, T., Ljubešić, Z., Mihanović, H., Olujić, G., Terzić, S., Jakšić, Ž., Viličić, D. 2011. Picoplankton composition related to mesoscale circulation on the Albanian boundary zone (Southern Adriatic) in late spring. *Est. Coast. Shelf Sci.* 91:519-525

Šilović, T., Bosak, S., Jakšić, Ž., Fuks, D. 2012a. Seasonal dynamics of the autotrophic community in the Lim bay (NE Adriatic sea). *Acta Adriatica.* 53(1):41-56

Šilović, T., Balague, V., Pedrós-Alio, C., Orlić, S. 2012b. Picoplankton seasonal variation and community structure in the northeast Adriatic coastal zone. *FEMS Microbiol. Ecol.*, doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01438.x

Šolić, M., Krstulović, N., Vilibić, I., Kušpilić, G., Šestanović, S., Šantić, D., Ordulj, M. 2008. The role of water mass dynamics in controlling bacterial abundance and production in the middle Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.* 65:384-404

Šolić, M., Krstulović, N., Vilibić, I., Bojanić, N., Kušpilić, G., Šestanović, S., Šantić, D., Ordulj, M. 2009. Variability in the bottom-up and top-down controls of bacteria on trophic and temporal scales in the middle Adriatic Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 58:15-29

Šolić, M., Krstulović, N., Kušpilić, G., Ninčević Gladan, Ž., Bojanić, N., Šestanović, S., Šantić, D., Ordulj, M. 2010. Changes in microbial food web structure in response to changed environmental trophic status: A case study of the Vranjic Basin (Adriatic Sea). *Mar. Environ. Res.* 70:239-249

Tai, V., Palenik, B. 2009. Temporal variation of *Synechococcus* clades at a coastal Pacific ocean monitoring station. *ISME J.* 3:903–915

Takahashi, M.K., Kikuchi, T.R. and Hara, Y. 1985. Importance of picocyanobacteria (unicellular blue-green algae) in the phytoplankton population of the coastal waters off Japan. Mar. Biol.89:63-69

Tandeau de Marsac, N., Houmard, J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. FEMS Microbiol. Rev. 104:119-189

Terzić, S. 1996. Biogeokemija autohtone organske tvari u neritičkim područjima Sredozemlja: fotosintetski pigmenti i ugljikohidrati. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, pp. 77

Tett P., 1981. Modelling phytoplankton production at shelf-sea fronts. Philosophical Transactions A 302:605-615

Thyssen, M., Tarran, G.A., Zubkov, M., Holland, R.J., Gregori, G., Burkill, P.H., Denis, M. 2008. The emergence of automated high frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. J. Plankton. Res. 30:333-343

Totti, C., Civitarese, G., Acri, F., Barletta, D., Candelari, G., Paschini, E., Solazzi, A. 2000. Seasonal variability of phytoplankton populations in the middle Adriatic sub-basin. J. Plankton Res. 22:1735-1756

Totti, C., Cangini, M., Ferrari, C., Kraus, R., Pompei, M., Pugnetti, A., Romagnoli, T., Vanucci, S., Socal, G. 2005. Phytoplankton size-distribution and community structure in relation to mucilage occurrence in the northern Adriatic Sea. Sci. Total Environ. 353:204-217

Troussellier, M., Courties, C., Zettelmaier, S. 1995. Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton fixation and storage effects. Est. Coast.Shelf Sci.40:621-633

Utermöhl H. 1958.*Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik.* Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol. 9:1-38

Uysal, Z., Köksalan, İ. 2006. The annual cycle of *Synechococcus* (cyanobacteria) in the northern Levantine Basin shelf waters (Eastern Mediterranean). Mar. Ecol. 27:187-197

Vanucci, S., Acosta Pomar, M.L.C., Maugeri, T.L. 1994. Seasonal pattern of phototrophic picoplankton in the eutrophic coastal waters of the northern Adriatic Sea. Bot. Marina 37:57-66

Vanucci, S. 2003. Do mucilage events influence pico- and nanoplankton size and structure in the Adriatic sea? Chem. Ecol. 19:299-320

Vaulot, D., Courties, C., Partensky, F. 1989. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analysis. Cytometry 10:629-635

Vaulot, D., Partensky, F. 1992. Cell cycle distributions of prochlorophytes in the north western Mediterranean Sea. Deep-Sea Res. PA 39:727-742

Vaulot, D., Marie, R.J., Chisholm, S.W. 1995. Growth of *Prochlorococcus*, a photosynthetic prokaryote, in the Equatorial Pacific Ocean. Science 268:1480-1482

Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W. 1993. Cell abundance and fluorescence of picoplankton in relation to growth irradiance and nitrogen availability in the Red sea. Neth. J. Sea Res. 31:135-145

Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W. 2000. Application of flow cytometry in marine phytoplankton research current applications and future perspectives. Sci. Mar. 64:121-134

Veldhuis, M.J.W., Timmermans, K.R., Croot, P., Wagt van der, B. 2005. Picophytoplankton; a comparative study of their biochemical composition and photosynthetic properties. J. Sea Res. 53:7-24

Vilibić, I., Orlić, M. 2002. Adriatic water masses, their rates of formation and transport through the Otranto Strait. Deep-Sea Res P I 49:1321-1340

Vilibić, I., Šantić, D. 2008. Deep water ventilaton traced by *Synechococcus* cyanobacteria. Ocean Dynamics, doi: 10.1007/s10236-008-0135-8

Viličić, D., Leder, N., Gržetić, Z., Jasprica, N. 1995. Microphytoplankton in the Strait of Otranto (eastern Mediterranean). Mar. Biol. 123:619-630

Viličić, D., Orlić, M., Jasprica, N. 2008. The deep chlorophyll maximum in the coastal north eastern Adriatic Sea, July 2007. Acta Bot. Croat. 67:33-43

Viličić, D., Kuzmić, M., Bosak, S., Šilović, T., Hrustić, E., Burić, Z. 2009. Distribution of phytoplankton along the thermo-haline gradient in the northeastern Adriatic channel- winter aspect. Oceanologia 51:100-118

Vollenweider, R.A., Giovanardi F., Montanari, G., Rinaldi, A. 1998. Characterization of the trophic conditions of marine coastal waters, with special reference to the NW Adriatic Sea: proposal for a trophic scale, turbidity and generalized water quality index. Environmetrics 9:329-357

Wetzel, M.S., Paerl, H.W., Taylor, J.C., Leonard, J.A. 2011. Environmental controls upon picophytoplankton growth and biomass in a eutrophic estuary. Aquat. Microb. Ecol. 63:133-143

Worden, A.Z., Nolan, J.K. and Palenik, B. 2004. Assesing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton the importance of the eukaryotic component. Limnol. Oceanogr. 49:168-179

Yokokawa, T., De Corte, D., Sintes, E., Herndl, G. 2010. Spatial patterns of bacterial abundance, activity and community composition in relation to water masses in the eastern Mediterranean Sea. Aquat. Microb. Ecol. 59:185-195

Zarauz, L., Irigoien, X. 2008. Effects of Lugol's fixation on the size structure of natural nano-microplankton samples, analyzed by means of an automatic counting method. J. Plankton Res. 30: 1297-1303

Zavatarelli, M., Raicich, F., Bregant, D., Russo, A., Artegiani, A. 1998. Climatological biogeochemical characteristics of the Adriatic Sea. J. Marine Syst. 18:227-263

Zavatarelli, M., Pinardi, N., Kourafalou, V.K., Maggiore, M. 2002. Diagnostic and prognostic model studies of the Adriatic Sea general circulation: Seasonal variability. J. Geophys. Res. 107 (C1), 3004, doi: 10.1029/2000JC000210

Zore-Armanda, M. 1969. Water exchange between the Adriatic and the eastern Mediterranean. Deep-Sea Res. 16:171-178

Zubkov, M.V., Sleigh, M.A., Tarran, G.A., Burkill, P.H., Leakey, R.J.G. 1998. Picoplanktonic community structure on an Atlantic transect from 50°N to 50°S. Deep-Sea Res. Pt I 45:1339-1355

Zubkov, M.C., Fuchs, B.M., Tarran, G.A., Burkill, P.H., Amann, R. 2002. Mesoscale distribution of dominant bacterioplankton groups in the northern North Sea in early summer. Aquat. Microb. Ecol. 29:135-144

Zubkov, M.V., Fuchs, B.M., Tarran, G.A., Burkill, P.H., Amann, R. 2003. High rate uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. Appl. Environ. Microb. 69:1299-1304

Zwirglmaier, K., Jardillier, L., Ostrowski, M., Mazard, S., Garczarek, L., Vaulot, D., Not, F., Massana, R., Ulloa, O., Scanlan, D.J. 2008. Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct portioning of lineages among oceanic biomes. Environ. Microbiol. 10:147-16

7. ŽIVOTOPIS

Rođena je 05. Svibnja 1980. godine u Splitu, gdje je završila osnovnu školu i V. gimnaziju „Vladimir Nazor“. Studij Biologije i ekologije mora na Sveučilišnom studijskom centru za studije mora Sveučilišta u Splitu upisala je 1998. godine, te je 2003. godine diplomirala na temu „Utjecaj onečišćenja na životne zajednice supralitoralne i mediolitoralne bionomske stepenice na području Splita“ pod mentorstvom dr.sc. Ivane Grubelić. Od siječnja 2005. godine zaposlena je u Centru za istraživanje mora Instituta „Ruder Bošković“. U prosincu 2006. godine prelazi u status znanstvenog novaka u Laboratoriju mikrobne ekologije pod mentorstvom dr.sc. Dragice Fuks. Glavni znanstveni interes su joj pikoplanktonske zajednice u Jadranu. U svrhu boljeg razumijevanja njihove raznolikosti i ekologije gostovala je u različitim laboratorijima gdje je savladala metode: protočne citometrije (NIOZ, Texel, Nizozemska; voditelj: dr.sc. Marcel J.E.Veldhuis), detekcije fito-pigmenata (HPLC) (ZIMO, IRB, Zagreb, Hrvatska; voditelj: dr.sc. Marijan Ahel), te gel-eleketroforezu u gradijentu denaturirajućeg agensa (DGGE) (CSIC, ICM, Barcelona, Španjolska; voditelj: dr.sc. Carlos Pedrós-Alió). Za odlazak na ICM dobila je stipendiju Fonda "Jedinstvo uz pomoć znanja" („UKF ugovor br. 70/10“). Sudjelovala je u nizu projekata, od kojih među važnijima „Marine science and coastal management in the Adriatic region, Western Balkans (Norwegian Cooperation Program on Research and Higher Education with the countries on the West Balkan)“ pod vodstvom dr.sc. Božene Čosović i dr.sc Paul Wassmana. Rezultati istraživanja koja su provedena u sklopu navedenog projekta objavljena su u više različitih znanstvenih članaka, od kojih je jedan bio njen prvi autorski rad. Od znanstvenih radionica na kojima je sudjelovala za izdvojiti je C-MORE ljetnu radionicu mikrobne oceanografije (“*Microbial Oceanography: From Genomes to Biomes*”), gdje je u oštrosu internacionalnoj konkurenciji odabrana kao jedan od 16 sudionika. C-MORE ljetna radonica održava se svake godine na Havajima (University of Hawai‘i at Mānoa (UHM)), te okuplja najbolje znanstvenike i profesore s vrhunskih sveučilišta poput MIT-a i perspektivne mlade studente iz čitavog svijeta odabrane na osnovu njihovih interesa, iskustva i prepoznatog potencijala u polju mikrobne oceanografije.

8. POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima

Bosak, S., **Šilović, T.**, Ljubešić, Z., Kušpilić, G., Pestorić, B., Krivokapić, S., Viličić, D. 2012. The phytoplankton size structure and species composition as an indicator of the trophic status in transitional ecosystems: A case study of the Mediterranean fjord-like karstic bay. *Oceanologia*. 54 (2):1–32

Fuks, D., Ivančić, I., Najdek, M., Lučić, D., Njire, J., Godrijan, J., Marić, D., **Šilović, T.**, Paliaga, P., Blažina, M., Precali, R., Orlić, S. 2012. Changes in the planktonic community structure related to trophic conditions: The case study of the northern Adriatic Sea, *Journal of Marine Systems*, 96–97: 95-102

Najdek, M., Blažina, M., Fuks, D., Ivančić, I., **Šilović, T.** 2011. High-salinity water intrusion causes TEP accumulation in the northern Adriatic Sea. *Aquatic microbial ecology*, 63 (1): 69-74

Šilović, T., Z. Ljubešić, Mihanović, H., Olujić, G., Terzić, S., Jakšić, Ž., Viličić, D. 2011. Picoplankton composition related to thermohaline circulation: The Albanian boundary zone (southern Adriatic) in late spring. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 91(4): 519-525

Viličić, D., **Šilović, T.**, Kuzmić, M., Mihanović, H., Bosak, S., Tomažić, I., Olujić, G. 2011. Phytoplankton distribution across the southeast Adriatic continental and shelf slope to the west of Albania (spring aspect). *Environmental monitoring and assessment*, 177 (1/4): 593-607

Ivančić. Fuks, D., Najdek, M., Blažina, M. Devescovi,D., **Šilović, T.**, Paliaga, P., Orlić, S. 2010. Changes in heterotrophic bacteria abundance and growth characteristics in the northern Adriatic Sea. *Journal of Marine Systems*, 82: 26-216

Ivančić, I., Fuks, D., Radić, T., Lyons, D.M., Šilović, T., Kraus, R., Precali, R. 2010. Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activity in the northern Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 69: 85-94

Viličić, D, Kuzmić, M., Bosak, S., Šilović, T., Hrustić, E, Burić, Z. 2009. Distribution of phytoplankton along the thermo-haline gradient in the northeastern Adriatic channel-WINTER ASPECT. *Oceanologia*, 51(4):100-118

Radić, T., Šilović, T., Šantić, D., Fuks, D., Mičić, M. 2009. Preliminary flow cytometric analyses of phototrophic pico- and nanoplankton communities in the northern Adriatic. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(5): 715-724

Radovi prihvaćeni za objavljivanje u CC časopisima

Šilović, T., Balague, V., Pedrós-Alió, C., Orlić, S. 2012. Picoplankton seasonal variation and community structure in the northeast Adriatic coastal zone. *FEMS Microbiol. Ecol.* (doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01438.x)

Znanstveni radovi u drugim časopisima

Šilović, T., Bosak, S., Jakšić, Ž., Fuks, D. 2012. Seasonal dynamics of the autotrophic community in the Lim bay (NE Adriatic sea). *Acta Adriatica*. 53(1):41-56

Sažeci prihvaćeni za publikaciju u znanstvenim časopisima

Bosak, S., Šilović, T., Krivokapić, S., Kušpilić, G., Wexels R. C., Horvat, L., Viličić, D. 2009. Phytoplankton composition in relation to physico-chemical drivers in the Bay of Kotor, SE Adriatic Sea. Abstracts of papers to be presented at the 9th International Phycological Congress *Tokyo, Japan 2-8 August 2009*. *Phycologia*, vol 48, Issue sp4 (July 2009) pp. 11-12. (Poster)

Zbornici sažetaka

Korlević, M.; Ionescu, D.; Paliaga, P.; **Šilović, T.**; Amann, R.; Najdek-Dragić, M.; Orlić, S. 2012. Deep Ocean microbial communities in the South Adriatic Pit. 14th International Symposium on Microbial Ecology „The power of small“ (ISME 14) (Poster).

Bosak, S.; **Šilović, T.**; Horvat, L.; Viličić, D. 2010. Taxonomical study of phytoplankton in the Bay of Kotor, SE Adriatic Sea . *Final Conference of the Project Marine science and coastal management in the Adriatic region, Western Balkans* Čosović, Božena ; Mikac, Nevenka (ur.). Zagreb : Institut Ruđer Bošković, 13-13 (Predavanje)

Bosak, S., **Šilović, T.**, Burić, Z., Đakovac, T., Viličić, D. 2009. Phytoplankton in the Lim Bay (Northern Adriatic Sea): Taxonomical and ecological perspective. Croatian Biological Symposium, September 2009, Osijek, Croatia. pp 114-115 (Poster)

Šilović T., S. Bosak, Ž. Jakšić, Fuks D. 2009. Pico and nano autotrophic community in the Lim bay (NE Adriatic Sea). *SAME11-2009 Abstract book*, Piran, Slovenia, 2009. pp 48-48 (Predavanje)

Blažina, M., Najdek, M., Fuks, D., **Šilović, T.**, Ivančić, I., Smoljaka, N. 2009. Bacterial fatty acids as bio-indicators of microbial processes in the northern Adriatic mucilaginous aggregates. *SAME11-2009 Abstract book*, Piran, Slovenia, 2009. pp 56-56 (Predavanje)

Šilović, T., Fuks, D., Radić, T. 2006. Distribution of DAPI-yellow particles (DYP) in the northern Adriatic. Croatian Biological Symposium, September 2006, Rovinj, Croatia. pp (Poster)

Fuks, D., Radić, J., Radić, T., **Šilović, T.** 2006. Proportion of metabolically active marine bacteria under different nutrient regimes. Croatian Biological Symposium, September 2006, Rovinj, Croatia. pp (Poster)