



Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Doktorski studij Biofizika

Doktorski rad

TOKSIČNOST I DINAMIKA RASTA VRSTA RODA
PSEUDO-NITZSCHIA U SREDNJEM JADRANU

Tina Tomašević

Split, ____ 2026.



University of Split
Faculty of Science
Doctoral Study of Biophysics

Doctoral thesis

TOXICITY AND GROWTH DYNAMICS OF
PSEUDO-NITZSCHIA SPECIES IN THE CENTRAL
ADRIATIC SEA

Tina Tomašević

Split, ____ 2026.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za fitoplankton i toksičnost školjkaša Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, pod vodstvom mentorice dr. sc. Jasne Arapov, više znanstvene suradnice i komentorice dr. sc. Ivane Ujević, znanstvene savjetnice u trajnom izboru, u sklopu doktorskog studija „Biofizika“ na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu. Istraživanje je provedeno u okviru uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2020-02-3249) „Ekologija i toksičnost vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u obalnim vodama srednjeg i južnog Jadrana“ (PSEUDOTOX), kao i u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost za razvoj karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti (DOK-2018-09-1195), u sklopu kojega je financirano radno mjesto doktorandice.

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za fiziku, Doktorski studij Biofizika

TOKSIČNOST I DINAMIKA RASTA VRSTA RODA *PSEUDO-NITZSCHIA* U SREDNJEM
JADRANU

Doktorski rad Tine Tomašević, mag. educ. biol. et chem., kao dio obaveza potrebnih da se dobije doktorat znanosti izrađen je pod vodstvom mentorice dr. sc. Jasne Arapov, više znanstvene suradnice i komentorice dr. sc. Ivane Ujević, znanstvene savjetnice u trajnom izboru.

Dobiveni akademski naziv i stupanj: doktorica prirodnih znanosti.

Povjerenstvo za ocjenu i obranu doktorskog rada u sastavu:

1. _____

Dr. sc. Živana Ninčević Gladan, znanstvena savjetnica u trajnom izboru
(Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split - predsjednica)

2. _____

Dr. sc. Danijela Šantić, znanstvena savjetnica
(Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split - članica)

3. _____

Izv. prof. dr. sc. Sanja Puljas
(Prirodoslovno-matematički, fakultet, Split – članica)

Potvrđuje da je disertacije obranjena dana _____.

Voditelj doktorskog studija: izv. prof. dr. sc. Damir Kovačić

Dekanica: prof. dr. sc. Ana Maravić

ZAHVALE

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za fiziku, Doktorski studij Biofizika

TOKSIČNOST I DINAMIKA RASTA VRSTA RODA *PSEUDO-NITZSCHIA* U SREDNJEM JADRANU

Tina Tomašević

Rad je izrađen na Institutu za oceanografiju i ribarstvo, Split

Sažetak

U ovom je istraživanju provedena prva sveobuhvatna analiza toksičnosti vrsta roda *Pseudo-nitzschia* iz uzgojnih područja školjkaša srednjeg Jadrana s naglaskom na dinamiku rasta staničnih kultura i njihov toksični potencijal. Vrste ovoga roda česti su predstavnici fitoplanktonske zajednice Jadranskog mora, a pojedine mogu proizvoditi neurotoksin domoičnu kiselinu (DK), odgovornu za amnezijско trovanje školjkašima (ASP). Stanične kulture analizirane su pri standardnim laboratorijskim uvjetima te u izmijenjenim uvjetima temperature i dostupnosti hranjivih tvari. Rast je praćen određivanjem brojnosti stanica, stopa rasta i fluorescencijskog signala, dok je proizvodnja DK određena LC-MS/MS metodom. Pri standardnim uvjetima analizirano je osam vrsta i 54 izolata, pri čemu je mjerljiva proizvodnja DK potvrđena samo za vrstu *P. pseudodelicatissima*, u 11 od 12 analiziranih izolata. U izmijenjenim uvjetima analizirane su četiri vrste, a proizvodnja DK potvrđena je za vrstu *P. pseudodelicatissima* i *P. multiseriis*. Smanjena dostupnost hranjivih tvari nije imala jedinstven učinak, nego je ovisila o vrsti i kombinaciji tretmana. Za vrstu *P. pseudodelicatissima* više vrijednosti DK bile su povezane s pojedinačnim smanjenjem fosfata ili silikata, dok je za vrstu *P. multiseriis* najveća proizvodnja DK zabilježena pri 18 °C, u kombiniranom nutritivnom stresu.

(stranica, slika, tablica, literaturni navod, priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj Sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Knjižnici Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

Ključne riječi: (*Pseudo-nitzschia*, domoična kiselina, LC-MS/MS, toksične diatomeje, dinamika rasta)

Mentorica: Dr. sc. Jasna Arapov, viša znanstvena suradnica

Komentorica: Dr. sc. Ivana Ujević, znanstvena savjetnica u trajnom izboru

Ocjenjivači: 1. Dr. sc. Živana Ninčević Gladan, znanstvena savjetnica u trajnom izboru

2. Dr. sc. Danijela Šantić, znanstvena savjetnica

3. Izv. prof. dr. sc. Sanja Puljas

Rad prihvaćen: (datum sjednice Vijeća)

TOXICITY AND GROWTH DYNAMICS OF *PSEUDO-NITZSCHIA* SPECIES IN THE CENTRAL ADRIATIC SEA

Tina Tomašević

Thesis performed at the Institute of Oceanography and Fisheries, Split

Abstract

This study presents the first comprehensive analysis of the toxicity of *Pseudo-nitzschia* species from shellfish farming areas of the central Adriatic Sea with an emphasis on cell-culture growth dynamics and toxic potential. Species of this genus are common members of the Adriatic phytoplankton community, and some can produce the neurotoxin domoic acid (DA), responsible for amnesic shellfish poisoning (ASP). Cell cultures were analysed under standard laboratory conditions and under modified conditions of temperature and nutrient availability. Growth was monitored by determining cell abundance, growth rates and fluorescence signal, while DA production was measured using LC–MS/MS. Under standard conditions, eight species and 54 isolates were analysed, with measurable DA production confirmed only in *P. pseudodelicatissima* in 11 of 12 isolates. Under modified conditions, four species were analysed, and DA production was confirmed in *P. pseudodelicatissima* and *P. multiseriis*. Reduced nutrient availability had a variable effect, depending on the species and treatment combination. In *P. pseudodelicatissima*, higher DA values were associated with the individual reduction of phosphate or silicate, whereas in *P. multiseriis*, the highest DA production was recorded at 18 °C under combined nutrient limitation.

(pages, figures, tables, references, supplementary materials, original in Croatian)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, University Library in Split, Library of the Faculty of Science, University of Split, Library of the Institute of Oceanography and Fisheries, Split)

Keywords: (*Pseudo-nitzschia*, domoic acid, LC–MS/MS, toxic diatoms, growth dynamics)

Mentor: Jasna Arapov, PhD, Senior Scientific Associate

Co-mentor: Ivana Ujević, PhD, Senior Research Advisor (tenured)

Reviewers: 1. Živana Ninčević-Gladan, PhD, Senior Research Advisor (tenured)

2. Danijela Šantić, PhD, Research Advisor

3. Tomislav Radić, PhD, Research Advisor

Thesis accepted: (datum sjednice Vijeća)

Sadržaj

Popis slika

Popis tablica

Popis kratica

1	Uvod	1
1.1	Fitoplankton	1
1.2	Morfološka obilježja dijatomeja.....	3
1.3	Značajke roda <i>Pseudo-nitzschia</i>	6
1.3.1	Životni ciklus roda <i>Pseudo-nitzschia</i>	8
1.4	Domoična kiselina.....	9
1.5	Čimbenici proizvodnje domoične kiseline	10
1.6	Toksičnost i ekološki rizici	12
1.7	Dosadašnja istraživanja roda <i>Pseudo-nitzschia</i> u Jadranskom moru	13
1.8	Ciljevi i hipoteze istraživanja.....	15
2	Materijali i metode.....	16
2.1	Područje istraživanja	16
2.2	Prikupljanje uzoraka, uspostava i održavanje staničnih kultura	18
2.3	Praćenje rasta stanične kulture <i>in vivo</i> fluorescencijom.....	19
2.4	Određivanje brojnosti stanične kulture	20
2.5	Priprema uzoraka za analizu tekućinskom kromatografijom - tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS)	21
2.6	Analiza tekućinskom kromatografijom - tandemskom spektrometrijom masa	22
2.7	Ustroj eksperimenata.....	23
2.8	Eksperimentalni pristup I: analiza staničnih kultura u standardnim uzgojnim uvjetima.....	24
2.9	Eksperimentalni pristup II: analiza odabranih staničnih kultura u izmijenjenim uvjetima rasta	26
2.10	Analiza podataka	30
3	Rezultati.....	32
3.1	Analiza staničnih kultura <i>Pseudo-nitzschia</i> pri standardnim uzgojnim uvjetima.....	32
3.2	Analiza staničnih kultura <i>Pseudo-nitzschia</i> pri izmijenjenim uvjetima uzgoja	48
3.2.1	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> -izolat K357ps	48
3.2.1.1	Analiza rasta staničnih kultura	48
3.2.1.2	Usporedba rasta izolata K357ps između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela	51
3.2.1.3	Analiza toksičnosti staničnih kultura <i>P. pseudodelicatissima</i>	54
3.2.1.4	Rezultati analize vrijednosti domoične kiseline (DK) linearnim mješovitim modelom (LMM)	56
3.2.2	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> -izolat K465de	59
3.2.2.1	Analiza rasta stanične kulture.....	59
3.2.2.2	Usporedba rasta izolata K465de između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela	62
3.2.2.3	Analiza toksičnosti staničnih kultura.....	64
3.2.3	<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> -izolat S442mu	65
3.2.3.1	Analiza rasta staničnih kultura	65
3.2.3.2	Usporedba rasta izolata S442mu između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela	68
3.2.3.3	Analiza toksičnosti staničnih kultura.....	72
3.2.4	<i>Pseudo-nitzschia multiseries</i> -izolat T001ms	72

3.2.4.1	Analiza rasta staničnih kultura	72
3.2.4.2	Usporedba rasta izolata T001ms između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela	75
3.2.4.3	Analiza toksičnosti staničnih kultura.....	77
3.2.4.4	Rezultati analize koncentracije domoične kiseline (DK) linearnim mješovitim modelom (LMM)	80
4	Diskusija	83
4.1	Analiza staničnih kultura pri standardnim uzgojnim uvjetima	83
4.1.1	Brojnost stanica i stopa rasta staničnih kultura.....	83
4.1.2	Toksičnost ispitivanih vrsta	84
4.2	Analiza staničnih kultura pri izmijenjenim uzgojnim uvjetima	86
4.2.1	Dinamika rasta pri izmijenjenim uzgojnim uvjetima.....	86
4.2.1.1	Usporedba rasta među analiziranim vrstama.....	88
4.2.1.2	Dinamika rasta <i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>	89
4.2.1.3	Dinamika rasta <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	90
4.2.1.4	Dinamika rasta <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	90
4.2.1.5	Dinamika rasta <i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	91
4.2.2	Toksičnost pri izmijenjenim uvjetima rasta	92
4.2.2.1	Toksičnost <i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>	93
4.2.2.2	Toksičnost <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	94
4.2.2.3	Toksičnost <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	94
4.2.2.4	Toksičnost <i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	94
4.2.2.5	Utjecaj temperature na proizvodnju DK.....	95
4.2.2.6	Utjecaj smanjene dostupnosti hranjivih tvari na proizvodnju DK	96
5	Zaključci	98
6	Literatura	101
7	Prilozi.....	114
8	Sažetak na hrvatskom jeziku	122
9	Sažetak na engleskom jeziku.....	123
10	Znanstveni radovi i sudjelovanja na znanstvenim skupovima	124
11	Kratki životopis	126

Popis slika

Slika 1.1 Stanice roda *Pseudo-nitzschia* u kulturi promatrane svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 200×. Izdužene stanice vidljive su pojedinačno i u lancima. Fotografija: Tina Tomašević.

Slika 1.2 Shematski prikaz životnog ciklusa roda *Pseudo-nitzschia*. Prilagođeno iz Marić Pfannkuchen, 2013.

Slika 2.1 Područje istraživanja i prikaz postaja: (a) V: Velebitski kanal, (b) S: Šibenski zaljev, (c) K: Kaštelanski zaljev, (d) M: Malostonski zaljev.

Slika 2.2 Vezani sustav tekućinska kromatografija – tandemski spektrometrija masa (LC-MS/MS).

Slika 2.3 Pojednosatvljeni shematski prikaz uzgoja staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* u standardnim uvjetima.

Slika 2.4 Shematski prikaz uzgoja četiri stanične kulture *Pseudo-nitzschia* pri izmijenjenim uvjetima.

Slika 3.1 Stope rasta (dan^{-1}) svih analiziranih izolata za svaku vrstu. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, linije raspona prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

Slika 3.2 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia allochroa*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, linije raspona prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

Slika 3.3 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia calliantha*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, linije raspona prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

Slika 3.4 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia delicatissima*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, brkovi prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

Slika 3.5 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia fraudulenta*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, linije raspona prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

Slika 3.6 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia galaxiae*.

Slika 3.7 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia mannii*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje

vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, brkovi prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

Slika 3.8 Brojnost stanica (stanica mL⁻¹) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia multistriata*.

Slika 3.9 Brojnost stanica (stanica mL⁻¹) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, brkovi prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

Slika 3.10 LC–MS/MS kromatogram dobiven LC–MS/MS analizom izolata *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps u stacionarnoj fazi rasta (faza rasta 3), koji sadrži pik domoične kiseline pri retencijskom vremenu 2,603 min (crna krivulja). Crvena krivulja predstavlja kromatogram standarda domoične kiseline iz kalibracijske serije, prikazan radi usporedbe retencijskog vremena i potvrde identifikacije analita.

Slika 3.11 (a) Brojnost stanica (stanica mL⁻¹) u određenim točkama rasta izolata *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* koji su pokazali proizvodnju toksina u najmanje tri faze rasta. (b) Srednja vrijednost i raspon vrijednosti domoične kiseline (pg stanica⁻¹) u replikatnim uzorcima tijekom faza rasta izolata koji su proizvodili toksin u najmanje tri različite faze.

Slika 3.12 Vrijednosti *in vivo* fluorescencije stanične kulture *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps u tretmanima T1–T4 pri 14 °C i 18 °C. Prikazane su aritmetičke sredine fluorescencije ± standardna devijacija (SD) na temelju tri biološke replike; paneli prikazuju temperaturne uvjete.

Slika 3.13 Prosječna maksimalna stopa rasta (μ , dan⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps u različitim tretmanima (T1–T4) pri 14 °C i 18 °C. Točke prikazuju srednje vrijednosti, a vertikalne linije standardnu devijaciju.

Slika 3.14 Promjene vrijednosti domoične kiseline (pg stanica⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* kroz faze rasta (1–4) u tretmanima T1–T4 pri 14 °C i 18 °C. Prikazane su aritmetičke sredine ± standardna devijacija (SD) na temelju tri biološke replike po skupini. Faze rasta definirane su kao: 1 - rana ekspanzijska faza, 2 - kasna ekspanzijska faza, 3 - stacionarna faza i 4 - faza odumiranja.

Slika 3.15 Relativna vrijednost domoične kiseline u odnosu na kontrolni tretman (T1) tijekom različitih faza rasta izolata *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps pri 14 °C i 18 °C. Vrijednosti su prikazane kao omjer koncentracije domoične kiseline u pojedinom tretmanu i koncentracije izmjerene u kontrolnom tretmanu unutar iste faze rasta i istog temperaturnog uvjeta. Isprekidana linija označava referentnu vrijednost 1, koja predstavlja razinu domoične kiseline jednaku kontroli. Vrijednosti veće od 1 upućuju na relativno povećanje, a vrijednosti manje od 1 na relativno smanjenje koncentracije domoične kiseline u odnosu na kontrolni tretman.

Slika 3.16 Vrijednosti *in vivo* fluorescencije stanične kulture *P. delicatissima* K465de praćen fluorescencijom (RFU) kroz vrijeme (dan) u tretmanima T1–T4 pri 14 °C i 18 °C. Prikazane su aritmetičke sredine fluorescencije ± standardna devijacija (SD) na temelju bioloških replika; paneli prikazuju temperaturne uvjete.

Slika 3.17 Prosječna maksimalna stopa rasta (μ , dan⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima* K465de u različitim tretmanima (T1–T4) pri 14 °C i 18 °C. Točke prikazuju srednje vrijednosti, a vertikalne linije standardnu devijaciju.

Slika 3.18 Vrijednosti *in vivo* fluorescencije stanične kulture *Pseudo-nitzschia multistriata* S442mu praćen fluorescencijom (RFU) u tretmanima T1–T7 pri 14 °C i 18 °C. Prikazane su aritmetičke sredine fluorescencije ± standardna devijacija (SD) na temelju bioloških replika; paneli prikazuju temperaturne uvjete.

Slika 3.19 Prosječna maksimalna stopa rasta (μ , dan⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia multistriata* S442mu u različitim tretmanima (T1–T7) pri 14 °C i 18 °C. Točke prikazuju srednje vrijednosti, a vertikalne linije standardnu devijaciju.

Slika 3.20 Vrijednosti *in vivo* fluorescencije stanične kulture *Pseudo-nitzschia multiseriis* T001ms u tretmanima T1–T4 pri 14 °C i 18 °C. Prikazane su aritmetičke sredine fluorescencije ± standardna devijacija (SD) na temelju bioloških replika; paneli prikazuju temperaturne uvjete.

Slika 3.21 Prosječna stopa rasta (μ , dan⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* T001ms u tretmanima T1–T4 pri 14 °C i 18 °C. Točke prikazuju srednje vrijednosti, a vertikalne linije standardnu devijaciju.

Slika 3.22 Promjene u proizvodnji domoične kiseline (DK; pg stanica⁻¹) tijekom faza rasta (1–4) kod vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* (T001ms) uzgajane pri temperaturama od 14 i 18 °C u različitim nutritivnim uvjetima (T1–T4). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna devijacija iz dviju bioloških replika.

Slika 3.23 Relativna promjena proizvodnje domoične kiseline (DK; pg stanica⁻¹) u odnosu na kontrolni tretman (T1) tijekom faza rasta (1–4) pri temperaturama od 14 i 18 °C kod vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* (T001ms). Vrijednosti predstavljaju procijenjene sredine dobivene linearnim mješovitim modelom (LMM), pri čemu je kontrolni tretman (T1) normaliziran na vrijednost 1 unutar svake faze i temperature.

Slika 7.1 Promjena logaritamski transformirane fluorescence kroz vrijeme za dva izolata vrste *Pseudo-nitzschia galaxiae*. Siva linija prikazuje promjenu vrijednosti log fluorescencije tijekom trajanja pokusa, dok crveni segment označava dio krivulje korišten za izračun stope rasta.

Slika 7.2 Odnos između relativne fluorescencije (RFU) i brojnosti stanica (stanica mL⁻¹) kod vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Isprekidane linije predstavljaju linearne regresijske odnose, a u panelima prikazane su regresijske jednadžbe i koeficijenti determinacije (R²). RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.

Slika 7.3 Odnos između fluorescencijskog signala (RFU) i brojnosti stanica ($\times 10^3$ stanica mL⁻¹) kod vrste *P. pseudodelicatissima* pri 14 °C i 18 °C. Pune linije prikazuju linearne regresijske odnose, a zasjenjena područja 95 %-tni interval pouzdanosti. Na slici su prikazani koeficijenti determinacije (R²) i pripadajuće p-vrijednosti za svaku temperaturu. RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.

Slika 7.4 Odnos između fluorescencijskog signala (RFU) i brojnosti stanica ($\times 10^3$ stanica mL⁻¹) kod vrste *P. delicatissima* pri 14 °C i 18 °C. Pune linije prikazuju linearne regresijske odnose, a zasjenjena područja 95 %-tni interval pouzdanosti. Na slici su prikazani koeficijenti determinacije (R²) i pripadajuće p-vrijednosti za svaku temperaturu. RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.

Slika 7.5 Odnos između fluorescencijskog signala (RFU) i brojnosti stanica ($\times 10^3$ stanica mL⁻¹) kod vrste *P. multistriata* pri 14 °C i 18 °C. Pune linije prikazuju linearne regresijske odnose, a zasjenjena područja 95 %-tni interval pouzdanosti. Na slici su prikazani koeficijenti

determinacije (R^2) i pripadajuće p-vrijednosti za svaku temperaturu. RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.

Slika 7.6 Odnos između fluorescencijskog signala (RFU) i brojnosti stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) kod vrste *P. multiseriis* pri 14 °C i 18 °C. Pune linije prikazuju linearne regresijske odnose, a zasjenjena područja 95 %-tni interval pouzdanosti. Na slici su prikazani koeficijenti determinacije (R^2) i pripadajuće p-vrijednosti za svaku temperaturu. RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.

Popis tablica

Tablica 2.1 Gradijenti mobilnih faza za analizu DK na LC-MS/MS-u.

Tablica 2.2 Popis analiziranih staničnih kultura pri standardnim uzgojnim uvjetima s područjem izolacije, datumima izolacije i temperaturom uzgoja. Oznaka vrste predstavlja jedinstvenu identifikacijsku oznaku dodijeljenu pojedinoj vrsti ili staničnoj kulturi radi preglednijeg prikaza rezultata i povezivanja podataka između tablica, slika i analiza.

Tablica 2.3 Popis analiziranih staničnih kultura pri izmijenjenim eksperimentalnim uvjetima s područjem izolacije i datumima uzorkovanja.

Tablica 2.4 Opis tretmana za izmijenjene uvjete uzgoja staničnih kultura *Pseudo-nitzschia*.

Tablica 2.5 Proširenje eksperimentalnog dizajna za vrstu *Pseudo-nitzschia multistriata* (treći eksperiment).

Tablica 3.1 Popis analiziranih izolata vrste *P. allochirona* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Tablica 3.2 Popis analiziranih izolata vrste *P. calliantha* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Tablica 3.3 Popis analiziranih izolata vrste *P. delicatissima* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Tablica 3.4 Popis analiziranih izolata vrste *P. fraudulenta* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Tablica 3.5 Popis analiziranih izolata vrste *P. galaxiae* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Tablica 3.6 Popis analiziranih izolata vrste *P. mannii* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Tablica 3.7 Popis analiziranih izolata vrste *P. multistriata* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Tablica 3.8 Popis analiziranih izolata vrste *P. pseudeodelicatissima* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Tablica 3.9 Srednje brojnosti stanica (stanica mL⁻¹, n=3), u pojedinim fazama rasta tijekom kojih su izolati vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* proizvodili domoičnu kiselinu, s pripadajućim srednjim vrijednostima domoične kiseline u kulturi stanica i po stanicima.

Tablica 3.10 Sažetak izmijenjenih vrijednosti prosječne fluorescencije (RFU) po tretmanu i temperaturi *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*-K357ps.

Tablica 3.11 Učinci tretmana, temperature i dana mjerenja na log-transformirani fluorescencijski signal stanične kulture *P. pseudodelicatissima* prema linearnom mješovitom modelu. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti.

Tablica 3.12 Post-hoc usporedbe tretmana na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P. pseudodelicatissima*. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Tablica 3.13 Vremenski obrazac značajnih razlika u log-transformiranom fluorescencijskom signalu između temperatura za vrstu *P. pseudodelicatissima*. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Tablica 3.14 Prosječne vrijednosti domoične kiseline (pg stanica⁻¹) za pojedine tretmane (T1–T4), temperaturne uvjete (14 °C, 18 °C) i faze rasta (1–4) vrste *P. pseudodelicatissima*. Prikazane su aritmetička sredina DK te standardna devijacija kao mjera varijabilnosti između bioloških replikata (n = 3 po kombinaciji).

Tablica 3.15 Učinci tretmana, temperature i faze rasta na proizvodnju domoične kiseline u vrste *P. pseudodelicatissima*. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti.

Tablica 3.16 Značajne post-hoc usporedbe tretmana za vrijednosti domoične kiseline *P. pseudodelicatissima*. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Tablica 3.17 Značajne post-hoc usporedbe faza rasta za proizvodnju domoične kiseline za vrstu *P. pseudodelicatissima*. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Tablica 3.18 Statistički značajne post-hoc usporedbe temperaturnih uvjeta unutar faza rasta za vrstu *P. pseudodelicatissima*. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Tablica 3.19 Sažetak izmjerenih prosječnih vrijednosti fluorescencije (RFU) po tretmanu i temperaturi za izolat *Pseudo-nitzschia delicatissima* K465de.

Tablica 3.20 Učinci tretmana, temperature i vremenske točke mjerenja na log-transformirani fluorescencijski signal stanične kulture *P. delicatissima* prema linearnom mješovitom modelu. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti.

Tablica 3.21 Post-hoc usporedbe tretmana na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P. delicatissima*. Statistički značajne p-vrijednosti i odgovarajući smjerovi razlike označeni su podebljanim slovima.

Tablica 3.22 Post-hoc usporedba temperaturnih uvjeta na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P. delicatissima*. Statistički značajna p-vrijednost i odgovarajući smjer razlike označeni su podebljanim slovima.

Tablica 3.23 Sažetak izmijenjenih vrijednosti fluorescencije (RFU) po tretmanu i temperaturi *Pseudo-nitzschia multistriata*-S442mu.

Tablica 3.24 Učinci tretmana, temperature i dana mjerenja na fluorescencijski signal stanične kulture *Pseudo-nitzschia multistriata* S442mu prema linearnom mješovitom modelu.

Tablica 3.25 Post-hoc usporedbe tretmana na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P. multistriata*. Statistički značajne p-vrijednosti i odgovarajući smjerovi razlike označeni su podebljanim slovima.

Tablica 3.26 Post-hoc usporedba temperaturnih uvjeta na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P. multistriata*. Statistički značajna p-vrijednost i odgovarajući smjer razlike označeni su podebljanim slovima.

Tablica 3.27 Post-hoc usporedbe tretmana u odnosu na kontrolni tretman T1 unutar pojedinog temperaturnog uvjeta za vrstu *P. multistriata*. Statistički značajne p-vrijednosti i odgovarajući smjerovi razlike označeni su podebljanim slovima.

Tablica 3.28 Sažetak izmijenjenih vrijednosti fluorescencije (RFU) po tretmanu i temperaturi *Pseudo-nitzschia multiseriis* T001ms.

Tablica 3.29 Učinci tretmana, temperature i vremenske točke mjerenja na log-transformirani fluorescencijski signal za vrstu *P. multiseriis* prema linearnom mješovitom modelu.

Tablica 3.30 Post-hoc usporedba temperaturnih uvjeta na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P. multiseriis*. Statistički značajna p-vrijednost i odgovarajući smjer razlike označeni su podebljanim slovima.

Tablica 3.31 Prosječne vrijednosti domoične kiseline (DK; $\mu\text{g stanica}^{-1}$) i pripadajuće standardne devijacije za vrstu *Pseudo-nitzschia multiseriis* T001ms uzgajane pri različitim temperaturama (14 i 18 °C), tretmanima (T1–T4) i fazama rasta (1–4).

Tablica 3.32 Učinci tretmana, temperature i faze uzorkovanja na log-transformiranu koncentraciju domoične kiseline *P. multiseriis* prema linearnom mješovitom modelu. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti.

Tablica 3.33 Značajne post-hoc razlike u koncentraciji domoične kiseline (DK; $\mu\text{g stanica}^{-1}$) među tretmanima tijekom faza uzorkovanja kod vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* T001ms. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Tablica 3.34 Značajne post-hoc razlike u koncentraciji domoične kiseline (DK; $\mu\text{g stanica}^{-1}$) između temperatura tijekom faza uzorkovanja kod vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* T001ms. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Tablica 4.1 Utjecaj ispitivanih nutritivnih tretmana i temperature na rast analiziranih izolata roda *Pseudo-nitzschia*.

Tablica 4.2 Sažetak proizvodnje domoične kiseline kod toksičnih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u različitim temperaturnim i nutritivnim uvjetima.

Tablica 7.1 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* u tretmanima T1–T4 pri 18 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tablica 7.2 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* u tretmanima T1–T4 pri 14 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tablica 7.3 Tablica 5.2a. Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima* u tretmanima T1–T4 pri 18 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tablica 7.4 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima* u tretmanima T1–T4 pri 14 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tablica 7.5 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multistriata* u tretmanima T1–T7 pri 14 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tablica 7.6 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multistriata* u tretmanima T1–T7 pri 18 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tablica 7.7 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* u tretmanima T1–T4 pri 18 °C. Replike (a, b) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na **početnu** točku, odnosno inokulaciju.

Tablica 7.8 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* u tretmanima T1–T4 pri 14 °C. Replike (a, b) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Popis kratica

DK-domoična kiselina

HPLC-tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*high-performance liquid chromatography*)

LC-MS/MS-tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnom masenom spektrometrijom (*liquid chromatography–tandem mass spectrometry*)

LMM-linearni mješoviti model (*linear mixed model*)

N-dušik

OTU-operacijska taksonomska jedinica (*operational taxonomic unit*)

P-fosfor

RFU-relativne jedinice fluorescencije (*relative fluorescence units*)

Si-silicij

Si:N-omjer silicija i dušika

T1-kontrolni tretman

T2 -tretman sa smanjenom dostupnošću fosfata

T3- tretman sa smanjenom dostupnošću silikata

T4-kombinirani tretman sa smanjenom dostupnošću fosfata i silikata

T5- tretman s većim smanjenjem dostupnosti fosfata

T6- tretman s većim smanjenjem dostupnosti silikata

T7-kombinirani tretman sa većim smanjenjem dostupnosti fosfata i silikata

1 Uvod

1.1 Fitoplankton

Fitoplankton obuhvaća fotosintetske autotrofne i miksotrofne, jednostanične ili kolonijalne organizme koji lebde u vodenom stupcu (Viličić, 2002). Kao primarni proizvođač u vodenim ekosustavima, fitoplankton ima izniman ekološki značaj: sudjeluje u približno 50 % globalne fotosintetske proizvodnje kisika te čini temelj većine pelagičkih hranidbenih mreža. Fitoplankton značajno utječe na biogeokemijske cikluse ugljika jer, putem biološke pumpe, apsorbira atmosferski CO₂, što doprinosi njegovom smanjenju u zraku i regulaciji globalnog ekosustava (Dokulil i Qian, 2020; Falkowski i sur., 1998).

Taksonomski, fitoplankton ne predstavlja monolitnu biološku skupinu niti zasebno carstvo, već funkcionalnu i ekološku kategoriju organizama sličnog načina života (Pan, 2022; Pierella Karlusich i sur., 2020). Zbog svoje taksonomske raznolikosti, fitoplankton je polifiletska skupina, budući da ne obuhvaća sve potomke jedinstvenog zajedničkog pretka. Stoga danas fitoplankton predstavlja funkcionalnu skupinu različitih klada fotosintetskih mikroorganizama, a ne kao taksonomska jedinica carstva (Pierella Karlusich i sur., 2020). U fitoplankton se ubrajaju dijatomeje (Bacillariophyta), dinoflagelati (Dinophyta), haptofite (Haptophyta), kriptofite (Cryptophyta), klorofite (Chlorophyta) te cijanobakterije (Cyanobacteria) (Reynolds, 2006).

Glavne sastavnice fitoplanktona uključuju dvije osnovne taksonomske domene života:

1. **Prokarioti — cijanobakterije (Cyanobacteria):** ove fotoautotrofne bakterije nemaju jezgru ni unutarnju membranu i pripadaju domeni Bacteria. Cijanobakterije su među najranijim fotosintetskim organizmima na Zemlji te su oblikovale atmosferu Zemlje kroz proizvodnju kisika u geološkoj prošlosti (Liu i sur., 2024).
2. **Eukarioti — mikroskopske alge:** uključuju razne skupine fotosintetskih eukariota (npr. diatomeje, dinoflagelati, haptofiti, zelene alge) koje su sistematski raspoređene u glavne eukariotske supergrupe. Ove eukariotske skupine tradicionalno su se svrstavale unutar carstva Protista prema klasičnim taksonomskim modelima, ali suvremena filogenetika koristi rašireniji sustav supergrupa umjesto “carstava” (Thoré i sur., 2023).

Fitoplankton se prema veličini stanica dijeli u tri osnovne frakcije:

1. Mikrofitoplankton (20 – 200 µm)
2. Nanofitoplankton (2 – 20 µm)
3. Pikofitoplankton (0,2 – 2 µm)

U mikrofitoplanktonu prevladavaju dijatomeje i dinoflagelati, dok manje frakcije fitoplanktona, poput nanofitoplanktona i pikofitoplanktona, obuhvaćaju kriptofite, kokolitoforide, i cijanobakterije (Sieburth i sur., 1978; Vascotto i sur., 2024).

Procjene globalne raznolikosti fitoplanktona temeljem klasične taksonomije ukazuju na nekoliko tisuća opisanih vrsta, no molekularna istraživanja pokazuju znatno veću, do sada podcijenjenu raznolikost (Falkowski i sur. 1998.; Pierella Karlusich, i sur. 2020.; De Vargas i sur. 2015.). Prema autorima Viličić i sur., 2002 u Jadranskom moru zabilježeno je ukupno 888 vrsta, među kojima dominiraju dijatomeje (518 vrsta), zatim dinoflagelati (264 vrste), haptofiti (101 vrsta), dok su ostale skupine zastupljene u manjem broju. Novija istraživanja ukazuju na to da je broj zabilježenih taksona u porastu, ponajprije zbog napretka tradicionalnih metoda te uvođenja molekularnih i drugih suvremenih pristupa, pri čemu procjene ovise o području i metodologiji istraživanja (Mozetič i sur. 2019).

Fitoplankton čini temelj pelagičkih hranidbenih mreža i predstavlja glavni izvor organske tvari za više trofičke razine, uključujući zooplankton, ribe i druge morske organizme. Njegova prostorna i vremenska raspodjela uvjetovana je dostupnošću svjetlosti, koncentracijom hranjivih soli (dušika, fosfora i silicija), temperaturom, stabilnošću vodenog stupca te hidrodinamičkim procesima poput miješanja i stratifikacije (Margalef, 1978.; Reynolds, 2006).

Fitoplankton karakterizira prisutnost raznolikih fotosintetskih pigmenata koji omogućuju apsorpciju svjetlosne energije u širokom rasponu valnih duljina. Klorofil *a* središnji je pigment fotosintetski aktivnih fitoplanktonskih organizama, prisutan u svim glavnim skupinama fitoplanktona, zbog čega se koristi kao osnovni pokazatelj biomase fitoplanktona i intenziteta primarne produkcije (Falkowski i Raven, 2007). Uz klorofil *a*, u stanicama fitoplanktona prisutni su i brojni dodatni fotosintetski pigmenti, uključujući klorofile *b* i *c*, različite karotenoide te fikobiliproteine. Budući da se sastav i relativni udjeli pojedinih pigmenata razlikuju među taksonomskim skupinama fitoplanktona, određeni pigmenti mogu služiti kao pokazatelji prisutnosti pojedinih skupina. Primjerice, dijatomeje i ostali predstavnici Pripadnici skupine Stramenopila sadrže klorofil *c* i fukoksantin, karotenoid koji omogućuje učinkovitije iskorištavanje plavo-zelenog dijela spektra, osobito u uvjetima smanjene dostupnosti svjetlosti u vodenom stupcu. Dinoflagelate obilježava prisutnost peridina, dok su klorofite prepoznatljive po većem udjelu klorofila *b*. Cijanobakterije, kao prokariotski fotosintetski organizmi, umjesto klorofila *b* i *c* sadrže fikobiliproteine, među kojima su najčešći fikocijanin i fikoeritrin (Jeffrey i sur., 2011). Analiza fotosintetskih pigmenata stoga se često primjenjuje u istraživanjima sastava fitoplanktonske zajednice. Posebno je važna primjena tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC), kojom se razdvajaju, identificiraju i kvantificiraju pojedinačni pigmenti u uzorku. Na temelju dobivenog pigmentnog profila moguće je procijeniti relativni doprinos glavnih skupina fitoplanktona te pratiti njihove sezonske i prostorno-vremenske promjene (Dursun i sur., 2021; Jeffrey i sur., 2011; Mackey i sur., 1996).

Suvremena istraživanja sve više uključuju molekularne pristupe, poput analize okolišne DNA (eDNA) i visoko protočnog sekvencioniranja temeljenog na različitim markerima. Molekularne metode omogućuju prepoznavanje kriptičnih vrsta, odnosno morfološki vrlo

sličnih vrsta, koje se ne mogu pouzdano razlikovati na temelju mikroskopskih morfoloških obilježja. (De Vargas i sur., 2015).

Fitoplanktonske zajednice u vodenim ekosustavima pokazuju izražene sezonske promjene u brojnosti, biomasi i taksonomskom sastavu. U razdobljima kada okolišni uvjeti pogoduju rastu pojedinih skupina, može doći do cvjetanja fitoplanktona, odnosno naglog povećanja njihove biomase. Takvi su događaji najčešće povezani s povećanom dostupnošću hranjivih tvari, stabilnim hidrografskim uvjetima i povoljnim svjetlosnim režimom. Iako cvjetanja mogu pridonijeti ukupnoj produktivnosti ekosustava, pojedina cvjetanja mogu imati negativne ekološke posljedice. To se osobito odnosi na štetna cvjetanja algi (engl. *Harmful Algal Blooms*, HAB), koja često uključuju dinoflagelate ili cijanobakterije, a mogu biti povezana s proizvodnjom toksina i razvojem hipoksičnih uvjeta u vodenom stupcu (Anderson i sur., 2010; Bravo i sur., 2010; Trainer i sur., 2010).

Fitoplankton brzo reagira na promjene okolišnih uvjeta zbog kratkog generacijskog vremena, visokog reproduktivnog potencijala te neposredne ovisnosti o temperaturi, dostupnosti svjetlosti i koncentracijama hranjivih tvari. Zbog toga se promjene u njegovoj brojnosti, taksonomskom sastavu i fotosintetskoj aktivnosti često koriste kao pokazatelji ekološkog stanja vodenih sustava. Takve promjene mogu odražavati učinke antropogenih pritisaka, ali i dugoročnih promjena povezanih s klimatskim promjenama, uključujući porast temperature mora, promjene u stratifikaciji vodenog stupca, izmijenjenu dostupnost hranjivih tvari te pomake u sezonskoj dinamici fitoplanktonske zajednice. (Behrenfeld i Falkowski 1997).

1.2 Morfološka obilježja dijatomeja

Dijatomeje (*Bacillariophyceae*, *Diatomeae*) čine morfološki i ekološki izrazito raznoliku skupinu, prepoznatljivih po silicificiranoj ovojnici koja ih jasno izdvaja od drugih skupina algi (Armbrust, 2009; Round i sur., 1990). Za razliku od većine algi, dijatomeje nemaju celuloznu staničnu stijenku, već specijalizirani periplast u koji je uklopljena silicificirana frustula. Frustula nastaje unutar specijaliziranih vezikula uključenih u proces biomineralizacije (Hildebrand i Lerch, 2015; Kröger i Poulsen, 2008). U tim se vezikulama taloži amorfn i netopljivi opal ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), koji nastaje polimerizacijom ortosilicijeve kiseline (H_4SiO_4) – glavnog biološki dostupnog oblika silicija u morskim ekosustavima (Tréguer i De La Rocha, 2013). Tijekom silicifikacije, odnosno procesa ugradnje silicija u frustulu, formirani silikatni materijal izlučuje se na vanjsku stranu stanice i ugrađuje u čvrstu ovojnici (Hildebrand i Lerch, 2015; Marić Pfannkuchen, 2013). Zrela silicificirana ovojnica, poznata kao frustula, sastoji se od dviju međusobno uklopljenih valvi koje se ponašaju poput komponenata kutijice – veća valva (epivalva) preklapa manju (hipovalvu). Ove dvije valve bočno su povezane pleurama koje tvore prstenasti pojas (cingulum), a zajedno daju frustuli karakterističan višedijelni izgled (Round i sur., 1990). Morfologija frustule iznimno je raznolika, pa se valvama mogu opažati kružne, eliptične, izdužene ili valovite forme, što odražava i visoku taksonomsku raznolikost skupine. Unutrašnjost stanice ispunjena je velikom centralnom vakuolom, koja može zauzimati oko 90 % ukupnog volumena stanice (Armbrust 2009; Marić Pfannkuchen, 2013).

Vrste iz roda *Pseudo-nitzschia* pripadaju redu Pennatae, skupini dijatomeja (Hasle, 2002; Hasle 1994b). Na temelju građe frustule i simetrije valvi dijatomeje se razvrstavaju u dvije glavne morfološke skupine Centricae i Pennatae. Centricae pokazuju radijalnu simetriju i najčešće su povezane s planktonskim životnim strategijama, zbog čega dominiraju otvorenim morskim vodenim stupcem. Nasuprot njima, Pennatae karakterizira izdužena, bilateralno simetrična frustula, često s razvijenim rafa sustavom koji omogućuje aktivno kretanje po podlogama. Ova skupina daleko je zastupljenija u bentoskim staništima (Lelong i sur., 2012; Marić Pfannkuchen, 2013).

Stanice se mogu pojavljivati pojedinačno, ali se najčešće povezuju u lance nastale preklapanjem apikalnih krajeva (Bates, 2000). Morfološki, stanice mogu biti ravne, igličaste ili blago sigmoidalne, dok su u valvarnom pogledu lanceolatne do linearne, s glatko zaobljenim ili povremeno šiljastim završecima (Slika 1.1).

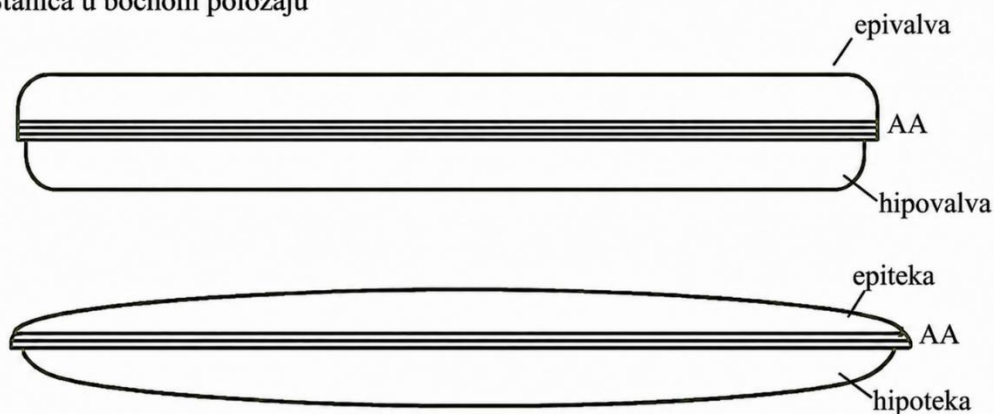


Slika 1.1 Stanice roda *Pseudo-nitzschia* u kulturi promatrane svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 200×. Izdužene stanice vidljive su pojedinačno i u lancima. Fotografija: Tina Tomašević.

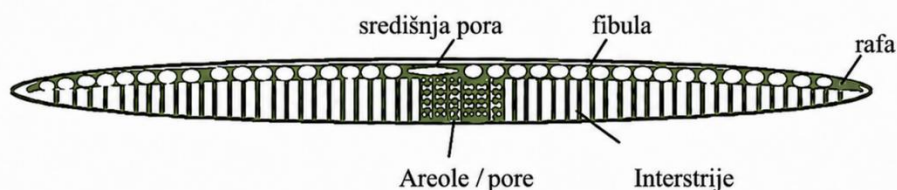
U bočnom pogledu oblik stanice najčešće je fuziforman ili pravokutan, a većina vrsta ima dva lateralno smještena kloroplasta koji okružuju staničnu jezgru (Hasle, 2002; Trainer i sur., 2012). Sve vrste ovog roda posjeduju bočno smještenu rafu koja se proteže gotovo cijelom

dužinom valve. Rafe dviju valva pozicionirane su na suprotnim stranama, što je obilježje blisko povezano s rodom *Nitzschia* (Hasle, 1994b). Rafa može biti kontinuirana ili djelomično prekinuta u središnjem dijelu valve, gdje se nalazi ojačano područje i eventualno razvijena središnja pora (lat. *porus centralis*) smještena u centralnom čvoru (lat. *nodulus centralis*). Unutarnja strana rafe premošćena je fibulama, poprečnim silicificiranim mostovima koji čine kanal rafe i predstavljaju jedno od ključnih obilježja u određivanju vrsta. Valve su ukrašene strijama, transverzalnim silicificiranim trakama građenima od areola, dok su interstrije jače silicificirane. Broj strija, njihov raspored i način silicifikacije važna su taksonomska obilježja. Strije mogu biti uniserijatne (npr. *P. pungens*, *P. calliantha*) ili multiserijatne (npr. *P. fraudulenta*, *P. multiseriata*) (Lundholm i sur., 2003). Areole zatvara tanak silicificirani sloj naziva velum ili cribrum, perforiran karakterističnim uzorcima ovisno o vrsti, a ovaj ultrastrukturni detalj ima ulogu i u fiziologiji izmjene tvari (Lundholm i sur., 2003) (Slika 1.2).

(a) Stanica u bočnom položaju



(b) Stanica u valvalnom položaju



Slika 1.2 Morfologija stanice iz roda *Pseudo-nitzschia* (a) stanica u bočnom položaju (presjek kroz apikalnu ravninu -AA i (b) stanica u valvalnom položaju. AA, apikalna os. Preuzeto iz Marić Pfannkuchen, 2013.

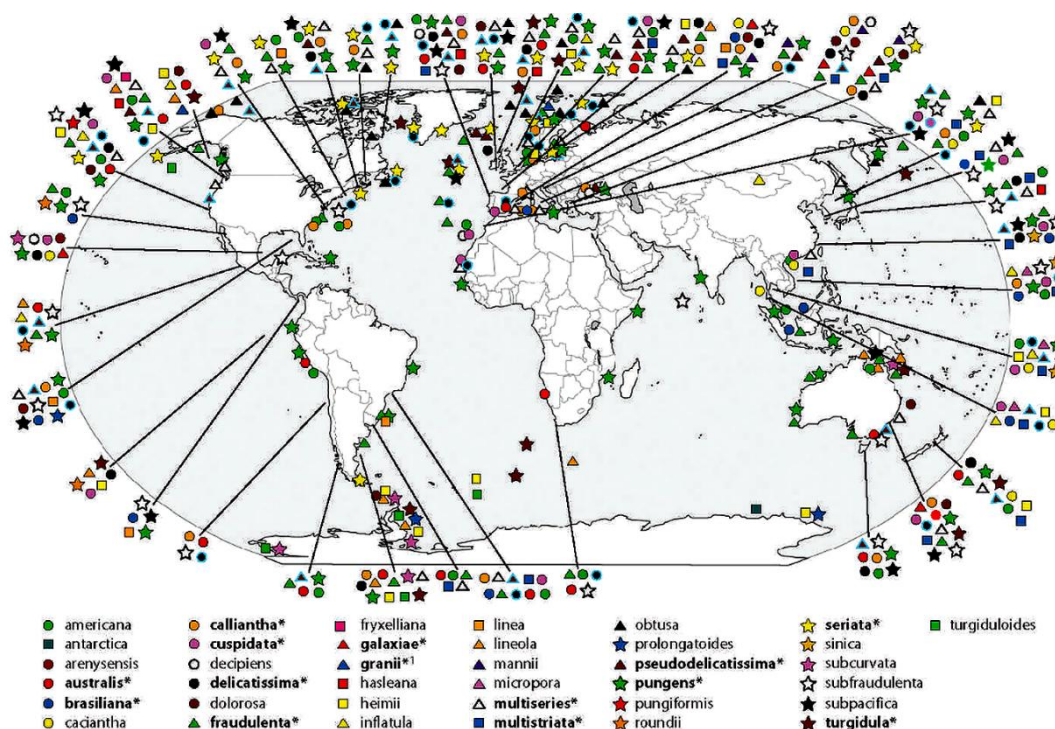
Za precizno određivanje vrsta unutar roda *Pseudo-nitzschia* neophodno je analizirati niz mikromorfoloških obilježja, uključujući broj i raspored strija i fibula, dimenzije valve, oblik završetaka i prisutnost središnje pore. U tu svrhu elektronska mikroskopija je nezaobilazna (Lundholm i sur., 2003; Trainer i sur., 2012). Tradicionalna taksonomija roda temeljila se na morfologiji i ultrastrukтури frustule, no posljednjih dvadesetak godina molekularne analize postaju ključne za raspoznavanje morfološki sličnih ili kriptičnih vrsta. Filogenetske analize

sekvenci nuklearnih i kloroplastnih markera (ITS, LSU rDNA) otkrile su visoku razinu kriptične raznolikosti i omogućile opis novih taksona te redefiniranje postojećih (Amato i sur. 2007; Lundholm i sur., 2002).

1.3 Značajke roda *Pseudo-nitzschia*

Dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* (Heterocontae, *Bacillariophyceae*) prvi je opisao H. Peragallo u razdoblju od 1897. do 1908. godine. Kasnije ih je Hustedt (1958) svrstao u rod *Nitzschia*. Međutim, Hasle (1994) je, na temelju morfoloških i taksonomskih značajki, izdvojila *Pseudo-nitzschia* kao zaseban rod. Za razliku od vrsta roda *Nitzschia*, stanice *Pseudo-nitzschia* tvore lančaste strukture („stepenaste kolonije“) djelomičnim preklapanjem vrhova stanica, uz prisutnost i drugih morfoloških razlika (Hasle 1994a; Lelong i sur., 2012).

Dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* široko su rasprostranjene u morskoj fitoplanktonskoj zajednici te su zabilježene u svim oceanima, uključujući i polarne regije Arktika i Antarktike (Bates i sur., 2018) (Slika 1.3). U skladu s ranijim mikroskopskim opažanjima koja potvrđuju kozmopolitsku rasprostranjenost roda *Pseudo-nitzschia* (Hasle, 2002), analiza metabarkodirajućih podataka iz uzoraka prikupljenih na globalnoj razini, dobivenih visokoprotočnim sekvenciranjem V9 regije gena za 18S rRNA, pokazala je da ovaj rod čini približno 4,4 % svih ribotipskih sekvenci dijatomeja te da ima najveći broj operativnih taksonomskih jedinica (OTU) među penatnim dijatomejama. (Malviya i sur., 2016).



Slika 1.3 Svjetska rasprostranjenost vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Toksične vrste označene su podebljano i zvjezdicom (*), pri čemu su toksični samo pojedini sojevi. Simboli s plavim obrubom označavaju nalaze prije taksonomskih revizija. Prilagođeno prema Bates (2018).

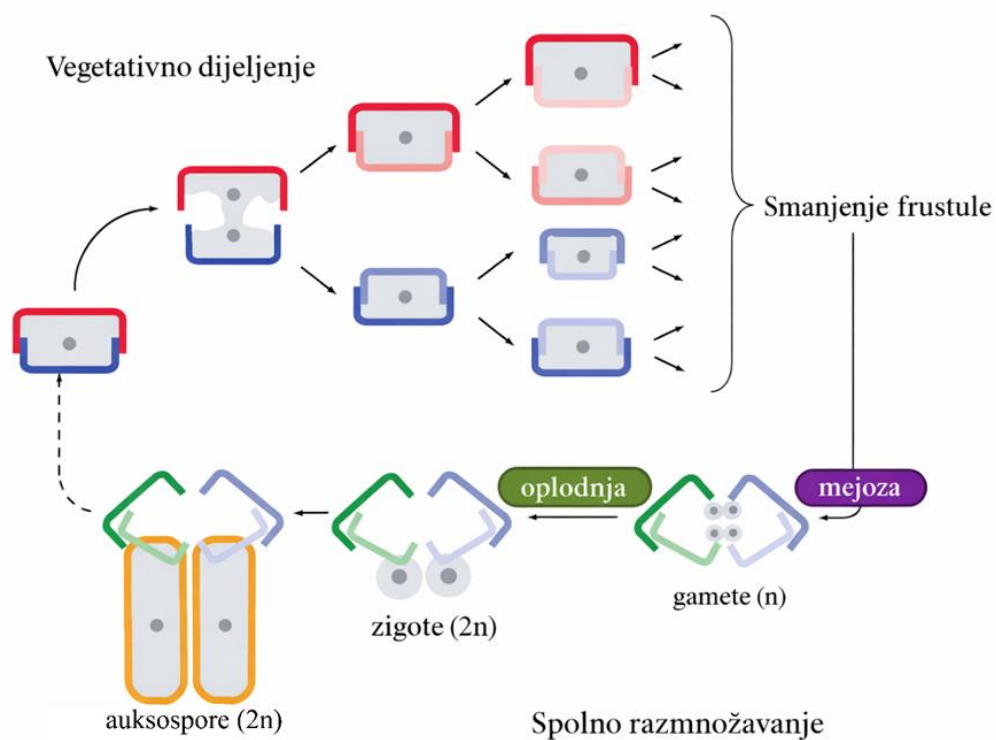
Do danas su unutar roda *Pseudo-nitzschia* opisane 63 vrste, od kojih 28 mogu proizvesti neurotoksin domoiću kiselinu (DK) (Dong i sur., 2020; Lundholm i sur., 2024; von Dassow i sur., 2023; Guiry i Guiry, 2025.). DK se prenosi kroz hranidbeni lanac akumulacijom toksina u školjkašima i ribama koje se hrane filtracijom morske vode, što može dovesti do trovanja kod ljudi i raznih morskih životinja (npr. ptica, morskih lavova, glavonožaca) (Trainer i sur., 2012). Simptomi trovanja mogu biti gastroenterološke prirode (proljev, povraćanje i mučnina), no mogu biti i neurološki (gubitak pamćenja i dezorijentacija) zbog čega se trovanje DK naziva i amnezijско trovanje školjkašima (engl. Amnesic Shellfish Poisoning, ASP) (Teitelbaum i sur., 2010). Nadalje, istraživanja su pokazala da DK može izazvati neurološke simptome i kod planktivornih riba poput incuna (Lefebvre i sur., 2001). Nasuprot tome, školjkaši ne pokazuju takve simptome zbog slabije razvijenog živčanog sustava, što može objasniti razlike u osjetljivosti na DK (Bates i sur., 2018).

Prvi slučaj ASP-a zabilježen je 1987. godine na otoku Prince Edward u Kanadi, kada su tri osobe preminule, a najmanje 107 ih je razvilo simptome trovanja. Tada je *Pseudo-nitzschia multiseriis* određena kao vrsta odgovorna za pojavu toksina, a u dagnjama (*Mytilus edulis*) izmjereni su maseni udjeli DK do 790 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Wright i sur., 1989; Perl i sur., 1990). Zbog navedenog događaja u svijetu su uvedene redovite analize DK u tkivu školjkaša. Od prvog opisanog događaja nisu zabilježeni smrtni slučajevi povezani s ASP-om. Unatoč tome, DK, njezini izomeri te pojave potencijalno toksičnih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* se sve češće evidentira. Ovaj porast je u velikoj mjeri posljedica ciljanih programa kontrole, kao i razvoj taksonomskih i analitičkih metoda. Unaprijeđeno taksonomsko određivanje vrsta omogućilo

je pouzdanije prepoznavanje toksičnih vrsta, dok je uvođenje osjetljivih analitičkih tehnika poput tekućinske kromatografije s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) omogućilo kvantifikaciju domoične kiseline u vrlo niskim koncentracijama, uključujući vrijednosti koje ranije nisu bile mjerljive (Quilliam i sur., 1995; Trainer i sur., 2012). Istodobno, činjenica da se u posljednjim desetljećima ne prijavljuju potvrđeni slučajevi ASP-a vjerojatno ne odražava stvarno odsustvo pojave DK u okolišu, već se smatra da je trovanje DK-om često nedovoljno klinički prepoznato (Bates i sur., 2018).

1.3.1 Životni ciklus roda *Pseudo-nitzschia*

Dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* razmnožavaju se nesporno i spolno. Tijekom nespornog, vegetativnog dijeljenja, hipoteka roditeljske stanice postaje epiteka jedne od novih stanica, dok se druga hipoteka iznova sintetizira. Zbog takvog načina podjele, prosječna se veličina stanica postupno smanjuje sve dok ne dosegnu kritičnu veličinu ispod koje populacija više ne može uspješno opstati. U toj razvojnoj točki ključnu ulogu preuzima spolno razmnožavanje, kojim se obnavlja početna veličina stanica (Amato i sur., 2005) (Slika 1.3).



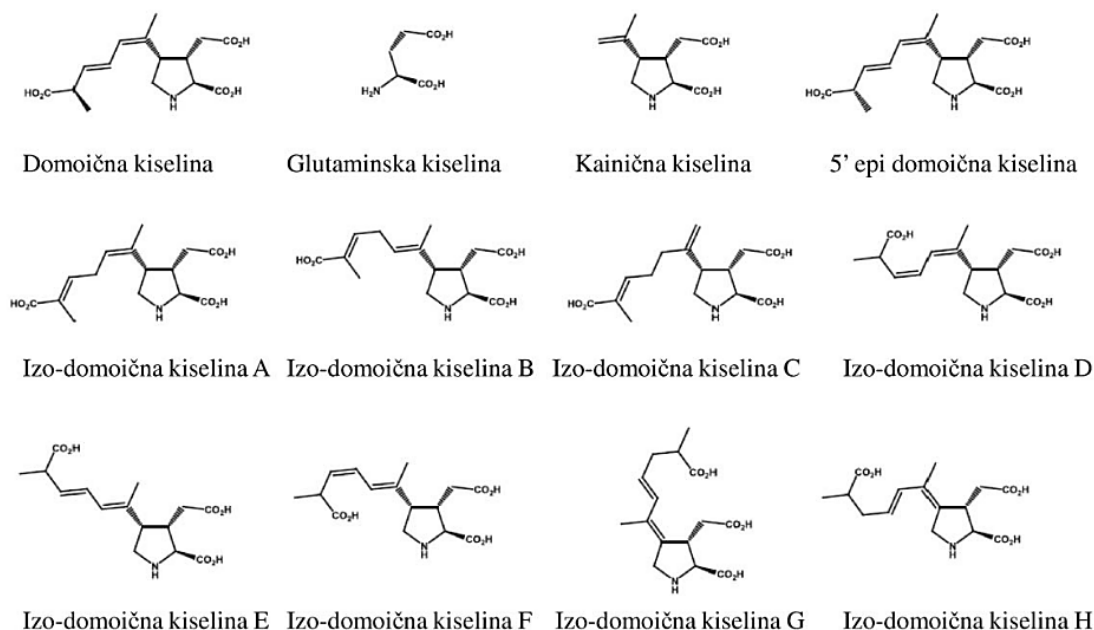
Slika 1.2 Shematski prikaz životnog ciklusa roda *Pseudo-nitzschia*. Prilagođeno iz Marić Pfannkuchen, 2013.

Većina vrsta roda *Pseudo-nitzschia* je heterotalična (iznimka je *P. brasiliiana*), što znači da je za spolno razmnožavanje potreban kompatibilan par stanica, označenih kao „+“ i „-“. Spolni proces naziva se cis-anizogamija. Nekoliko sati nakon približavanja partnerskih stanica – bez stvaranja sluzi ili direktnog fizičkog prianjanja - započinje spolno razmnožavanje. Prije

kopulacije, diploidne jezgre prolaze mejotsku diobu, pri čemu svaka roditeljska stanica formira dvije sferične anizogamete bez bičeva. Iako morfološki jednake, gamete imaju različito ponašanje: „+“ gamete pokazuju laganu pokretljivost, dok su „-“ gamete nepokretne. Spajanje gameta, plazmogamija, se odvija unutar jedne do dvije minute i rezultira formiranjem jedne zigote iz para gameta. Zigota ostaje povezana s roditeljskom stanicom te se razvija unutar auksospore smještene u perizonijumu. Tijekom dva do četiri dana unutar auksospore nastaje nova stanica početne (najveće) veličine, koja napušta perizonij tijekom njegovog pucanja (Amato i sur., 2005; Amato i Montresor, 2008; Chepurnov i sur., 2005; D’Alelio i sur., 2009). U prirodnim uzorcima spolne faze teško je uočiti zbog iznimne krhkosti gameta, zigota i auksospora. No, istraživanja iz 2010. zajedno s prethodnim laboratorijskim istraživanjima, pokazala su da životni ciklus *Pseudo-nitzschia* u prirodi traje približno dvije do tri godine. Međutim, još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno kako se u prirodnim uvjetima susreću kompatibilni spolni tipovi i koji čimbenici potiču pokretanje spolnog razmnožavanja (D’Alelio i sur., 2010a; Holtermann i sur., 2010).

1.4 Domoična kiselina

Domoična kiselina (DK) je trikarboksilna, ciklična kiselina, topiva u vodi. DK je analog L-glutaminske kiseline koja je jedan od najvažnijih neuro prijenosnika u živčanom susatvu kralježnjaka (Wright i sur., 1989). U slučaju unosa DK u organizam, DK se veže na mjesto vezivanja L-glutaminske kiseline. Do sada je opisano više strukturalnih izomera (izodomoična kiselina, A-H) (Lelong i sur., 2012). Pojedini izomeri se sintetiziraju u algama *Chondira armata*, te u dijatomejama *Nitzschia* spp. i *Pseudo-nitzschia* spp. (Hansen i sur., 2011; Kotaki i sur., 2004). Dok, su neki izomeri DK pronađeni u tkivu školjkaša kao rezultat degradacije DK. Epi-DK može nastati epimerizacijom DK pri povišenim temperaturama, pri čemu dolazi do promjene stereokemijske konfiguracije molekule. (McCarron i sur., 2011) (Slika 1.4).



Slika 1.4 Molekularna struktura DK i njenih izomera. Prilagođeno iz Lelong i sur., 2012.

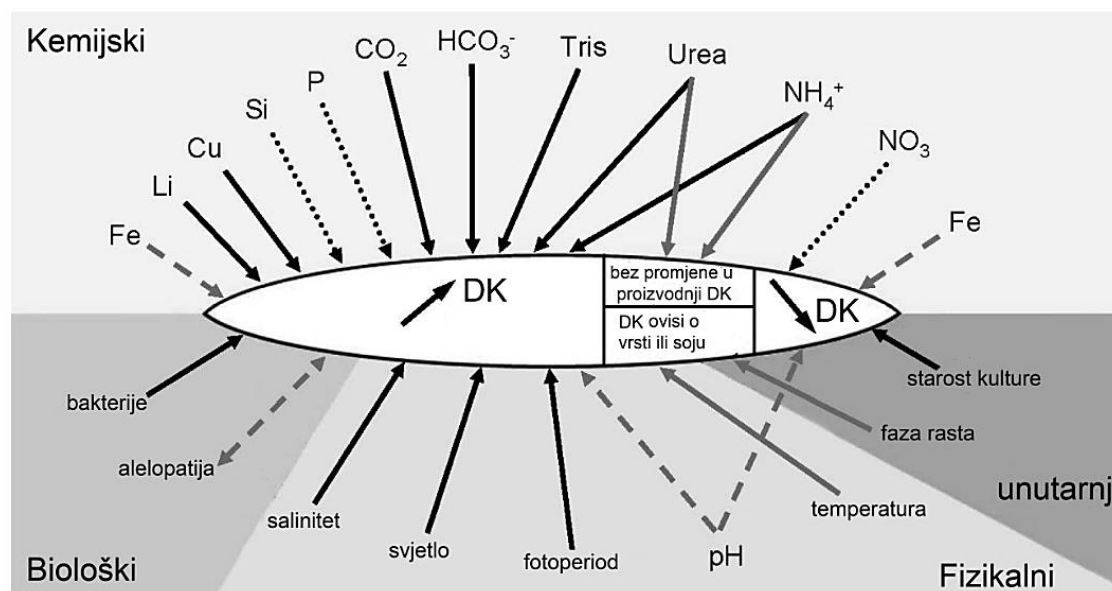
Nakon ulaska u organizam, DK se veže na glutamatne receptore u centralnom živčanom sustavu pri čemu pokazuje afinitet tri puta veći od kainične kiseline i čak stotinu puta veći od glutaminske kiseline. S obzirom na to da DK nije otpuštena iz neurona, uzrokuje produljenu depolarizaciju neurona i povećanu koncentraciju kalcija unutar neurona te posljedično smrt neurona (Lelong i sur., 2012). Neuron koji se nalaze u hipokampusu (imaju ključnu ulogu u pamćenju, učenju i prostornoj orijentaciji) podložni su oštećenjima, što rezultira anterogradnom amnezijom ili gubitkom kratoročnog pamćenja pa se zbog toga trovanje DK naziva i amnezijско trovanje školjkašima (ASP). Simptomi ovise o koncentraciji unesene DK te o zdravlju čovjeka. Stariji ljudi, ljudi s poremećenom funkcijom bubrega ili ljudi u kojih je poremećena krvno-moždana barijera su najugroženijih ukoliko dođe do trovanja s DK (Lelong i sur., 2012). Do sada nije pronađen protuotrov za DK (Pulido, 2008).

1.5 Čimbenici proizvodnje domoične kiseline

Prethodna istraživanja su pokazala da postoji značajna razlika u proizvodnji DK kako između različitih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*, tako i unutar različitih izolata iste vrste (Trainer i sur. 2012). Thessen i sur., 2009 pokazali su da su među devet izolata *P. calliantha* samo dva proizvela toksin DK, kao i dva od pet izolata *P. fraudulenta*, što potvrđuje izraženu varijabilnost unutar vrste u sintezi toksina. Različite vrste i izolati mogu pokazivati različite obrasce proizvodnje DK: pojedini počinju sintetizirati toksin tijekom eksponencijalne faze rasta, kada je dioba stanica najintenzivnija, dok je kod drugih povećana proizvodnja DK zabilježena u stacionarnoj fazi, najčešće kao odgovor na ograničenje hranjivih tvari ili druge okolišne stresore. Osim toga, ukupan broj stanica u populaciji ne mora biti izravno povezan s

koncentracijom DK, budući da neke vrste ili izolati mogu proizvoditi više ili manje toksina neovisno o gustoći populacije (Bates i sur., 2018).

Ovakve razlike upućuju na složenost biosinteze DK te ukazuju na to da je ona uvjetovana kombinacijom fizioloških i okolišnih čimbenika (Bates i sur., 2018). Na proizvodnju DK utječe niz čimbenika kao što su: unutarnji, kemijski, biološki te fizikalni (Lelong i sur. 2012) (Slika 1.5).



Slika 1.5 Čimbenici koji utječu na proizvodnju domoične kiseline. Crne strelice označavaju čimbenike koji potiču proizvodnju DK. Crne isprekidane strelice označavaju čimbenike koji smanjuju DK. Sive označavaju čimbenike koji ovise o vrsti ili izolatu *Pseudo-nitzschia*. Sive isprekidane strelice označavaju čimbenike za koje postoje oprečni podaci u literaturi. Preuređeno iz Lelong i sur. (2012).

Unutarnji čimbenici obuhvaćaju fiziološko stanje stanica, uključujući fazu rasta i starost stanične kulture, koji značajno utječu na metaboličku aktivnost te time i na sposobnost stanica da sintetiziraju DK (Mafra i sur., 2010; Bates, 1989).

Kemijski čimbenici, prvenstveno dostupnost makro- i mikronutrijenata, imaju ključnu ulogu u regulaciji sinteze toksina. Dostupnost ili ograničenje silicija (Si), fosfora (P), bakra (Cu), željeza (Fe) i amonijevog iona (NH_4^+), ima važnu ulogu u regulaciji sinteze DK, pri čemu stres uzrokovan nedostatkom hranjivih tvari često dovodi do povećanih razina toksina (Lelong i sur. 2012; Pan i sur., 1996a). Omjeri hranjivih tvari predstavljaju ključni čimbenik u sintezi domoične kiseline. Redfieldov omjer (N:P = 16:1) opisuje prosječne biogeokemijske potrebe fitoplanktona, dok je Brzezinski (1985) proširio koncept na dijatomeje uvođenjem Si:N:P odnosa. Odstupanja u dostupnosti silicija, dušika i fosfora—posebice ograničenje silicija ili fosfora uz relativni višak dušika—mogu značajno utjecati na fiziologiju *Pseudo-*

nitzschia i potaknuti sintezu domoične kiseline (Brzezinski, 1985; Brzezinski, 1992; Redfield i sur., 1963).

Biološki čimbenici, poput prisutnosti predatora (npr. zooplanktona), mogu potaknuti ili pojačati proizvodnju DK kao oblik obrambenog mehanizma (Lundholm i sur., 2018). Eksperimentalna istraživanja pokazala su da prisutnost kopepoda može potaknuti povećanu proizvodnju DK. Primjerice, Tammilehto i sur. (2015) utvrdili su da se toksičnost vrste *P. seriata* povećava pri izravnoj i neizravnoj izloženosti kopepodima *Calanus hyperboreus* i *C. finmarchicus* (Tammilehto i sur.). Lundholm i sur. (2018) dodatno su pokazali da taj odgovor ovisi o tipu organizma koji se hrani fitoplanktonom: biljojedni kopepodi inducirali su proizvodnju DK, dok mesojedni kopepodi nisu izazvali isti učinak (Lundholm i sur.).

Fizikalni parametri, kao što su temperatura, salinitet, pH vrijednost, fotoperiod i intenzitet svjetla, dodatno utječu na razinu toksičnosti. Brojna istraživanja pokazala su da određene kombinacije ovih uvjeta, osobito povišena temperatura i salinitet te jača osvjetljenost, mogu pogodovati povećanoj sintezi DK (Fehling i sur., 2006; Trainer i sur., 2012).

Ipak, većina dosadašnjih saznanja o čimbenicima koji reguliraju proizvodnju DK temelji se na laboratorijskim istraživanjima, u kojima se pojedini okolišni uvjeti najčešće ispituju zasebno. Takav pristup omogućuje razjašnjavanje pojedinačnih mehanizama proizvodnje DK, ali ne odražava složenost uvjeta u okolišu, u kojima se učinci hranjivih tvari, temperature, saliniteta, svjetlosti, pH vrijednosti i bioloških interakcija odvijaju istodobno. Stoga se zaključci dobiveni u laboratorijskim uvjetima trebaju razmatrati uzimajući u obzir šire okolišne uvjete.

1.6 Toksičnost i ekološki rizici

Vrste roda *Pseudo-nitzschia* sastavni su dio fitoplanktona i kao primarni proizvođači predstavljaju izvor organske tvari višim trofičkim razinama. Domoična kiselina (DK), koju proizvode toksični sojevi *Pseudo-nitzschia*, može se nakupljati u primarnim potrošačima fitoplanktona, osobito školjkašima, zooplanktonu i sitnim planktivornim ribama. Preko hranidbene mreže DK se zatim može prenijeti na više potrošače, uključujući predatorske ribe, morske ptice, morske sisavce i čovjeka (Lelong i sur., 2012; Trainer i sur., 2012). U Meksiku su 1996. godine zabilježeni slučajevi uginuća morskih ptica nakon što su se hranile incunima i srdelama u kojima je bila prisutna DK povezana s toksičnom vrstom *Pseudo-nitzschia australis* (Sierra-Beltrán i sur., 1997). Pretpostavlja se da je Hitchcockov film „Ptice“ (1963.) nadahnut stvarnim događajem zabilježenim na području Santa Cruz u Kaliforniji, gdje su morske ptice, nakon hranjenja ribom koja je sadržavala DK, pokazivale dezorijentirano i agresivno ponašanje prema ljudima (Bargu i sur., 2012). Morski sisavci također mogu imati posljedice ukoliko su izloženi toksinu DK. U Kaliforniji je 1998. zabilježeno 400 uginulih morskih lavova (*Zalophus californianus*) nakon unosa incuna kontaminiranim toksinom. Preživjele jedinke pokazivale su izražene neurološke smetnje, uključujući nekontrolirane pokrete glavom, ataksiju i neuobičajene obrasce ponašanja, usporedive s kliničkim znakovima opaženima kod laboratorijskih životinja izloženih DK (Bargu i sur., 2012; Scholin

i sur., 2000). Slični su se neurotoksični poremećaji kod morskih lavova i vidri bilježili i ranijih godina: 1978., 1986., 1988. i 1992 (Scholin i sur., 2000). DK se kasnije povezala i s uginućima kitova usana (*Balaenoptera acutorostrata*) u južnoj Kaliforniji (Fire i sur., 2010) te patuljastih i patuljasto-kljunastih ulješura (*Kogia* spp.) u vodama jugoistočnog i srednjeg Atlantika SAD-a (Fire i sur., 2009). S iznimkom pacifičkih kamenica (*Crassostrea gigas*) (Jones i sur., 1995), većina školjkaša pokazuje visok stupanj otpornosti na DK, čak i pri koncentracijama koje dosežu 790 mg g^{-1} , što je zabilježeno kod dagnji tijekom ASP sindroma 1987. godine (Bates, 1989). Slično kao i kod otpornih pacifičkih britvičastih školjkaša (*Siliqua patula*), pretpostavlja se da neke vrste školjkaša posjeduju proteine koji vežu DK ili izmjenjuju osjetljivost receptora, čime se ograničava vezanje toksina (Trainer i Bill, 2004). Relativno slabo razvijen živčani sustav školjkaša u usporedbi s pticama i sisavcima vjerojatno pridonosi njihovoj manjoj osjetljivosti na neurotoksične učinke DK. Domoična kiselina može se tijekom toksičnih cvjetanja *Pseudo-nitzschia* sp. nakupljati i u drugim bentoskim organizmima, što predstavlja dodatni izvor toksina za predatore poput morskih ptica, morskih lavova i riba (Kvitek i sur., 2008).

Nakon masovnog trovanja 1987. godine u Kanadi, određena je granični maseni udio od $20 \mu\text{g}$ po gramu školjkaša nakon koje se zatvaraju uzgajališta. Također, istu granicu su preuzele i zemlje Europske unije.

U Jadranskom moru DK je prvi put zabilježena 2000. godine u tkivu dagnji s talijanske zapadne obale (Ciminiello i sur. 2005). Premda je maseni udio bio nizak ($2,5 \mu\text{g g}^{-1}$), uveden je sustav praćenja u Jadranu zbog osiguranja zdravstvene ispravnosti školjkaša u skladu s Uredbom (EZ) br. 853/2004 (EU parlament, 2004) i hrvatskom regulativom. U hrvatskim vodama DK u školjkašima je prvi put potvrđena u siječnju 2006. godine u uzorcima dagnji (*M. galloprovincialis*) s najvišim masenim udjelom od $6,5486 \mu\text{g g}^{-1}$ (Ujević i sur., 2010). Od tada je DK povremeno određena u tkivu školjkaša, no maseni udjeli su uvijek bili ispod propisane granice. Na području sjevernog Jadranskog mora maseni udjeli u školjkašima bili su u rasponu od $0,097$ do $1,320 \mu\text{g g}^{-1}$ (Ljubešić i sur., 2011; Marić i sur., 2011; Kvirgić i sur., 2022), dok su u srednjem Jadranu zabilježene vrijednosti od $0,17$ do $3,24 \mu\text{g g}^{-1}$ (Ujević i sur., 2019; Arapov i sur., 2017; Arapov i sur., 2016).

1.7 Dosadašnja istraživanja roda *Pseudo-nitzschia* u Jadranskom moru

Vrste roda *Pseudo-nitzschia* važna su skupina fitoplanktonske zajednice Jadranskog mora te su redovito zabilježene u različitim prostornim i vremenskim okvirima, uključujući i otvorena i obalna područja tijekom cijele godine (Turk i sur., 2025; Ninčević Gladan i sur., 2020). Zastupljenost roda *Pseudo-nitzschia* u obalnim vodama je osobito izražena, gdje čine prosječno 35,01 % ukupne fitoplanktonske zajednice, dok u otvorenim morskim područjima njihov udio iznosi 15,35 % (Skejić i sur., 2024). Takva prostorna raspodjela ukazuje na visoku prilagodljivost ovog roda različitim ekološkim uvjetima te na to da visoke brojnosti, osobito u obalnim područjima, mogu značajno utjecati na strukturu i dinamiku hranidbenih mreža (Aubry i sur., 2012). Cvatnje vrsta roda *Pseudo-nitzschia* zabilježene su na području Jadranskog mora tijekom svih sezona: zimi/jeseni (Burić i sur., 2008; Turk Dermastia i sur.,

2020), te proljeće/ljeti/jesen (Marić i sur., 2012; Arapov i sur., 2020; Giulietti i sur., 2021). Tijekom zabilježenih cvatnji, vrste *Pseudo-nitzschia* mogu prevladavati u fitoplanktonskoj zajednici i to čak više od 90% (Turk Dermastia i sur., 2025; Arapov i sur., 2025; Skejić i sur., 2024). U dosadašnjim istraživanjima na području Jadranskog mora određeno je 14 vrsta *Pseudo-nitzschia* (Bonačić i sur., 2025; Turk Dermastia i sur., 2025), te je proizvodnja DK potvrđena za pet vrsta: *P. calliantha* (Arapov i sur., 2020; Tanković i sur., 2022), *P. delicatissima* (Penna i sur., 2013; Tanković i sur., 2022; Turk Dermastia i sur., 2022), *P. galaxiae* (Turk Dermastia i sur., 2022), *P. multistriata* (Turk Dermastia i sur., 2022) i *P. pseudodelicatissima* (Tanković i sur., 2022; Tomašević i sur., 2025).

U istraživanju koje su proveli Arapov i sur. (2020) na području srednjeg Jadranskog mora, toksičnost je potvrđena za vrstu *P. calliantha*, pri čemu je u staničnoj kulturi utvrđena vrijednost DK u rasponu od 0,022 do 0,0855 pg/stanici. Najviša vrijednost DK zabilježena je u ranim fazama rasta stanične kulture, kada je brojnost stanica bila najniža (Arapov i sur.). Važno je naglasiti da su do ovog istraživanja dostupni podaci o prisutnosti domoične kiseline u staničnim kulturama vrsta roda *Pseudo-nitzschia* na području srednjeg Jadranskog mora bili ograničeni. Odnosno, navedeno istraživanje koje su proveli Arapov i sur., 2020 bilo je jedino istraživanje prisutnosti DK u staničnoj kulturi s područja srednjeg Jadranskog mora. Također, najviše vrijednosti DK (od 0,003 do 0,16 pg/stanici) su zabilježene u ranoj fazi pri nižim brojnostima za vrstu *P. multistriata* s područja sjevernog Jadranskog mora (Turk Dermastia i sur., 2022). Za vrstu *P. delicatissima* zabilježene su vrijednosti DK od 0,000063 do 0,0015 pg/stanici (Turk Dermastia, i sur., 2022; Penna i sur., 2013; Tanković i sur., 2022), dok su za *P. pseudodelicatissima* utvrđene vrijednosti od 0,0007 do 0,025 pg/stanici (Tanković i sur., 2022; Tomašević i sur., 2025). Kod vrste *P. galaxiae* koncentracije su određene u mediju stanične kulture i iznosile su od 5 do 24,8 ng/mL (Turk Dermastia i sur., 2022).

1.8 Ciljevi i hipoteze istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su:

- analizirati toksičnost i dinamiku rasta različitih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* izoliranih s područja uzgoja školjkaša u srednjem Jadranskom moru. Tokičnost se analizirala, kroz različite faze rasta te pri standardnim i eksperimentalno izmijenjenim uzgojnim uvjetima;
- izolacija što većeg broja staničnih kultura, kako bi se omogućila detaljna analiza staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* pri kontroliranim laboratorijskim uvjetima;
- u slučajevima pojave DK u tkivu školjkaša na istraživanim područjima provoditi dodatnu i češću izolaciju stanica te analizirati toksičnost staničnih kultura.

Hipoteze:

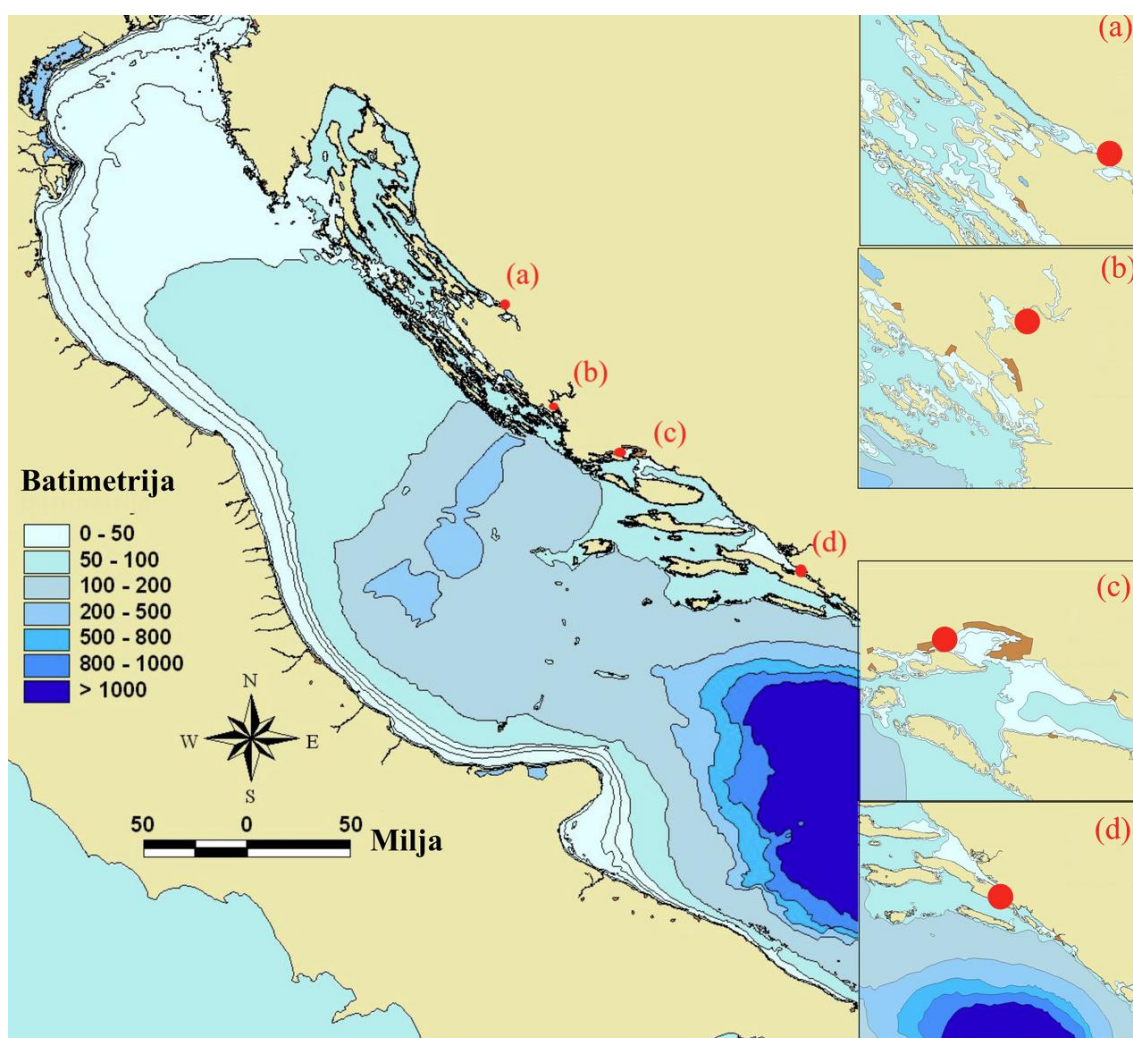
1. Analiza toksičnosti i stopa rasta staničnih kultura vrsta roda *Pseudo-nitzschia* pri standardnim laboratorijskim uvjetima:
 - 1.1. ne postoji razlika u toksičnosti između različitih ispitivanih vrsta;
 - 1.2. ne postoji razlika u toksičnosti unutar iste vrste tijekom različitih faza rasta stanične kulture;
 - 1.3. ne postoji razlika u toksičnosti ispitivane vrste s različitih područja;
 - 1.4. ne postoji razlika u stopi rasta između različitih ispitivanih vrsta;
 - 1.5. ne postoji razlika u stopi rasta unutar istih vrsta izoliranih s različitih područja.

2. Analiza toksičnosti i stopa rasta staničnih kultura vrsta roda *Pseudo-nitzschia* pri izmijenjenim uvjetima (promjena temperature i dostupnosti hranjivih tvari):
 - 2.1. ne postoji razlika u utjecaju promjene temperature na toksičnost ispitivanih vrsta;
 - 2.2. ne postoji razlika u utjecaju promjene dostupnosti hranjivih tvari na toksičnost ispitivanih vrsta;
 - 2.3. ne postoji razlika u utjecaju promjene temperature na stopu rasta ispitivanih vrsta;
 - 2.4. ne postoji razlika u utjecaju promjene dostupnosti hranjivih tvari na stopu rasta ispitivanih vrsta.

2 Materijali i metode

2.1 Područje istraživanja

Područje istraživanja obuhvaća četiri lokacije duž obale srednjeg Jadranskog mora, koje su značajna mjesta izlova i uzgoja školjkaša: Velebitski kanal (44.2696° S, 15.5165° I), Šibenski zaljev (43.7441° S, 15.8712° I), Kaštelanski zaljev (43.5208° S, 16.2717° I) i Malostonski zaljev (42.8676° S, 17.6871° I) (Slika 2.1). Istraživane postaje prostiru se od sjevernog prema južnom dijelu srednjeg Jadrana te obuhvaćaju različite tipove obalnih sustava - od otvorenijih kanala do poluzatvorenih i boćatih zaljeva.



Slika 2.1 Područje istraživanja i prikaz postaja: (a) V: Velebitski kanal, (b) S: Šibenski zaljev, (c) K: Kaštelanski zaljev, (d) M: Malostonski zaljev.

Velebitski kanal je smješten između sjevernih jadranskih otoka (Krka, Prvića, Paga i Raba) i kopna te je najduži kanal u sjevernom dijelu srednjeg Jadrana. Velebitski i Paški kanal zajedno čine sustav dug 40 km i širok 4-14 km koji je paraleleran s obalom. Kanal je povezan s otvorenim morem kroz Kvarnerić, dok je južni dio kanala spojen s ušćem rijeke Zrmanje preko Novigradskog mora. Hidrografske karakteristike područja definirane su dotokom rijeke Zrmanje i brojnim slatkovodnim izvorima - vruljama (Novosel i sur., 2002). Tijekom kišne sezone (od listopada do prosinca) i razdoblja topljenja snijega (od ožujka do svibnja), posebno je izražen utjecaj dotoka rijeke i vrulja (Bonacci, 2001). Osim toga, na hidrografiju utječe vjetar bura s brzinama do 40 m/s. Zbog dotoka slatke vode i bure, u kanalu je smanjen salinitet i temperatura površinskih voda u usporedbi s područjem izvan kanala (Novosel i sur., 2002).

Šibenski kanal je pod utjecajem estuarija rijeke Krke kojeg karakterizira izražena haloklina koja se može javljati tijekom cijele godine ovisno o dotoku rijeke Krke te ima važan utjecaj na biogeokemijske procese (Svensen i sur., 2007). Haloklina predstavlja akumulacijski sloj za slatkovodne i morske fitoplanktonske vrste te je i područje intenzivne bakterijske aktivnosti (Fuks i sur., 1991; Viličić i sur., 1989). Ovo područje je bogato nutritivnim tvarima koje dolaze iz rijeke Krke - nitrati i silikati, te fosforom koji je antropogenog podrijetla (Legović i sur., 1994). Temperatura i salinitet definirani su kao najvažniji pokazatelji dotoka riječne vode koji utječu na sastav fitoplanktonskih zajednica i njihove sezonske dinamike (Cetinić i sur., 2006).

Kaštelanski zaljev najveći je zaljev srednjeg Jadrana, smješten između Trogira i Splita, u urbaniziranom području koje je osobito tijekom druge polovice 20. stoljeća bilo izloženo snažnom antropogenom utjecaju. Najznačajniji izvor slatke vode je rijeka Jadro, koja se ulijeva u istočni dio zaljeva, dok su podmorski izvori prisutni, ali znatno manjeg intenziteta. Povijesno opterećenje zaljeva bilo je povezano s ispuštima nepročišćenih komunalnih i industrijskih otpadnih voda, urbanim otjecanjem te unosom organske tvari i hranjivih soli, osobito u istočnom dijelu zaljeva uz ušće Jadra i područje Vranjica (Ujević i sur., 2000; Lovrenčić Mikelić i sur., 2017). Nakon izgradnje centralnog kanalizacijskog kolektora 2004. godine antropogeni pritisak znatno je smanjen, što je povezano s postupnim prijelazom trofičkog stanja prema oligotrofnijim uvjetima (Skejić i sur., 2015). Na cirkulaciju u zaljevu utječu vjetrovi, pri čemu bura i maestral pogoduju ciklonalnoj, a jugo anticiklonalnoj cirkulaciji; tijekom ljeta istočni dio zaljeva može biti slabije povezan s ostatkom zaljeva i ponašati se kao djelomično izdvojeno vodeno tijelo (Zore-Armanda, 1980; Lovrenčić Mikelić i sur., 2017). Zbog kombinacije dotoka rijeke Jadro, urbanog utjecaja i specifične hidrodinamike, istočni dio Kaštelanskog zaljeva razlikuje se od otvorenijih dijelova zaljeva po hidrografskim uvjetima i sastavu fitoplanktonske zajednice (Bužančić i sur., 2012; Skejić i sur., 2024).

Malostonski zaljev duboko je uvučeno obalno područje smješteno između kopna i poluotoka Pelješca, na završetku Neretvanskog kanala (Bužančić i sur., 2016). Hidrografiju zaljeva oblikuju dotok slatke vode rijeke Neretve, najveće rijeke istočne obale Jadrana, podmorski krški izvori unutar zaljeva te stalna izmjena vode s otvorenijim dijelom mora. Estuarij Neretve pripada tipu slanog klina, pri čemu se bočata voda površinski širi prema moru, dok slanija morska voda ulazi ispod halokline (Bužančić i sur., 2016; Krvavica i Ružić 2020).

Zbog takvih hidrografskih obilježja, kao i izraženog utjecaja Neretve i podzemskih izvora, Malostonski zaljev ima specifične uvjete za rast fitoplanktona te se prema koncentracijama hranjivih soli, prozirnosti vodenog stupca i količini fitoplanktona opisuje kao umjereno prirodno eutrofiziran sustav (Viličić, 1989; Bužančić i sur., 2016; Jasprica i sur., 2012.; Skejić i sur., 2015; Viličić i sur., 1998). Zbog povoljnih hidrografskih uvjeta i primarne proizvodnje, zaljev je poznat po uzgoju školjkaša te danas predstavlja jedno od najvažnijih područja uzgoja školjkaša u Hrvatskoj (Čalić i sur., 2013).

2.2 Prikupljanje uzoraka, uspostava i održavanje staničnih kultura

Uzorkovanje u svrhu uspostave staničnih kultura se vršilo svaki mjesec u trajanju od dvije godine (od veljače 2022. do veljače 2024) na uzgojnim područjima školjkaša. Uzorak morske vode prikupljen je fitoplanktonskom mrežicom promjera oka 20 μm u vertikalnom potegu od 5 m na svim postajama osim u Šibenskom kanalu gdje se mreža vukla od 7 m do površine zbog halokline.

Nakon prikupljanja uzorka, u što kraćem vremenu su se izolirale pojedinačne stanice ili lanac stanica *Pseudo-nitzschia*. Izolacija stanica iz okolišnog uzorka morske vode obavila se pod inverznim svjetlosnim mikroskopima Olympus IX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japan) i Leica DMI 4000B (Leica Microsystems CMS, Wetzlar, Njemačka) pri povećanjima od 100x ili 200x.

Nakon izolacije, stanica se prenijela u kapljicu sterilnog staničnog medija u svrhu ispiranja i uklanjanja ostatka izvornog uzorka. Stanice su zatim presađene na ploče s jažicama ispunjenima istim staničnim medijem. Rast novoizoliranih kultura praćen je redovitim mikroskopskim pregledom, pri čemu se procjenjivala brojnost stanica i opće stanje kulture. Kada bi kultura postigla dovoljnu gustoću stanica za daljnje održavanje, presađila bi se u veći volumen staničnog medija, od 25 do 35 mL. Stanične kulture održavane su u svjetlosnoj komorama (modeli:BJPX-L250 i BJPX-L350, BIOBASE, Narodna Republika Kina) pri ciklusu svjetlosti 12 h : 12 h, odnosno dan : noć, i intenzitetu svjetla od 108 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Temperatura održavanja staničnih kultura kretala se u rasponu od 14 °C do 20 °C \pm 0,5 °C, ovisno o okolišnim uvjetima pri izolaciji, pri čemu su pojedine skupine staničnih kultura održavane na odgovarajućoj temperaturi unutar navedenog raspona. Stanične kulture su se presađivale u svježi sterilni medij svakih 15 dana.

Za izolaciju i uzgoj kultura korišten je stanični medij f/2 uz dodatak silikata, odnosno obogaćeni medij na bazi morske vode namijenjen uzgoju morskih mikroalgi, osobito dijatomeja (Guillard, 1975). Medij f/2 + Si pripremljen je dodatkom makrohranjivih tvari, elemenata u tragovima i vitamina u prethodno obrađenu morsku vodu. U standardnoj pripremi, po litri medija dodano je 1 mL stock otopine nitrata (NaNO_3 ; 75 g/L), 1 mL stock otopine fosfata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 5 g/L) te 1 mL stock otopine silikata u obliku natrijeva metasilikata nonahidrata ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$; 30 g/L), čime su konačne koncentracije iznosile približno 882 μM nitrata, 36 μM fosfata i 106 μM silikata. Elementi u tragovima i vitamini dodani su prema standardnom sastavu medija f/2 (Guillard, 1975).

Stanični medij se pripremao s predfiltiranom morskom vodom sakupljenom s područja otvorenog mora (veličina pora 1 μm ; GF 6, Whatman, Maidstone, UK). Nakon prefiltracije morska voda je bila u tami najmanje 2 mjeseca kako bi se razgradila organska tvar. Potom se morska voda autoklavirala (1 sat na 121°C) te su se dodale hranjive tvari nakon (Guillard, 1975) čega je uslijedila filtracija kroz filter pore 0,22 μm (Whatman, Maidstone, UK). Prije dodatka nutrijenata, salinitet morske vode određen je salinometrom te je korigiran dodatkom autoklavirane Milli-Q vode do vrijednosti od 35 do 36 PSU. Nakon podešavanja saliniteta dodane su hranjive tvari prema sastavu medija f/2 + Si, a pH pripremljenog medija iznosio je od 8,11 do 8,19. Stanične kulture su bile nesterilne (engl. non-axenic), te su potencijalno sadržavale prirodno prisutne nepatogene bakterije koje ne utječu značajno na rast stanica, ali mogu doprinijeti stvaranju uravnoteženog mikrobnog okoliša unutar stanične kulture.

Stakleno laboratorijsko posuđe korišteno u radu sa staničnim kulturama prethodno je temeljito oprano deterdžentom specijalne namjene (Contrad 70, Beckman Coulter, SAD) nakon čega je višestruko isprano destiliranom vodom. Posuđe je potom napunjeno 1 M otopinom klorovodične kiseline (HCl) i ostavljeno 24 sata radi uklanjanja mogućih organskih ostataka. Nakon kiselinskog tretmana, posuđe je ponovno isprano destiliranom vodom te napunjeno istom i ostavljeno stajati 24 sata kako bi se osigurala potpuna neutralizacija zaostalih tragova kiseline. Nakon završetka procesa čišćenja, sav stakleni materijal je autoklaviran (121 °C, 20 minuta) radi sterilizacije te pohranjen u sterilnim uvjetima do trenutka uporabe.

Po završetku eksperimenata, preostali volumen staničnih kultura zasebno je prikupljan u posude predviđene za biološki otpad. Prikupljeni materijal autoklaviran je najmanje 1 sat, zatim fiksiran formalinom te potom zbrinut prema važećem internom protokolu ustanove za zbrinjavanje biološkog otpada. Stakleno posuđe korišteno u radu sa staničnim kulturama nakon toga je obrađeno prema prethodno opisanom postupku, koji uključuje pranje, kiselinski tretman, višestruko ispiranje i sterilizaciju autoklaviranjem.

2.3 Praćenje rasta stanične kulture *in vivo* fluorescencijom

Rast staničnih kultura praćen je mjerenjem *in vivo* fluorescencije klorofila *a* fluorimetrom (Turner Designs fluorometar, model 7200-000, Turner Designs, San Jose, CA, SAD). Fluorescencija klorofila *a* korištena je kao neizravan pokazatelj gustoće stanica i dinamike rasta staničnih kultura.

Za mjerenje fluorescencije uzimao se poduzorak od 1 mL stanične kulture dva sata nakon početka svjetlosne faze u staničnoj komori. Prije uzimanja poduzorka, stanična kultura ručno je homogenizirana najmanje 15 sekundi kako bi se stanice ravnomjerno rasporedile u mediju. Prije mjerenja, uzorak u bočici dodatno je homogeniziran blagim okretanjem desetak puta, nakon čega je vanjska površina bočice pažljivo obrisana radi uklanjanja kapljica i nečistoća koje bi mogle utjecati na očitavanje fluorescencije. Fluorimetrijska analiza kod staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* prvenstveno se koristila za kvantifikaciju klorofila *a*, koji predstavlja pokazatelj biomase i rasta stanica, te omogućuje praćenje dinamike rasta tijekom eksperimenata. Fluorimetar mjeri fluorescenciju klorofila, čime se neinvazivno i brzo može

procijeniti koncentracija fotosintetski aktivnog materijala u staničnoj kulturi. Svaki poduzorak je mjeran tri puta te je za daljnje analize uzeta aritmetička sredina. Prema izmjerenim vrijednostima fluorescencije tijekom eksperimentalnog perioda odredila se faza rasta u kojoj se stanična kultura nalazila. Stopa rasta staničnih kultura određuje se između dvije točke u vremenu (t_1 i t_2) kada se stanična kultura nalazi u eksponencijalnoj fazi rasta, odnosno u fazi kada se stanice dijele konstantnom brzinom te se populacija povećava eksponencijalno. Za svaku staničnu kulturu izrađen je graf logaritamske funkcije fluorescencije u funkciji vremena (Prilozi-Slika 7.1). Na temelju tog grafa odredio se interval u kojem stanična kultura pokazuje linearan porast u logaritamskoj skali - taj interval odgovara eksponencijalnoj fazi rasta. Stopa rasta (μ) se izračunala prema jednadžbi:

$$\mu = \frac{\ln(f_{t2} / f_{t1})}{t_2 - t_1}$$

Prirodni logaritam od f_{t2} predstavlja fluorescenciju mjerenu u vremenskoj točki t_2 , a f_{t1} predstavlja fluorescenciju mjerenu u vremenskoj točki t_1 (Guillard, 1975; D’Alelio i sur., 2009).

S obzirom na to da su mjerenja fluorescencije provedena svakodnevno tijekom eksperimenta, ovaj je parametar omogućio pouzdaniju procjenu stope rasta u odnosu na brojnost stanica, koja je određivana u pet odabranih vremenskih točaka. Povezanost između fluorescencijskog signala i odgovarajuće brojnosti stanica za svaku analiziranu vrstu roda *Pseudo-nitzschia* određena je linearnom regresijskom analizom. Za sve analizirane vrste nagib regresijske linije bio je statistički značajan ($p < 0,005$), a vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) kretale su se od 0,6963 do 0,9761. Ovisnost relativnih fluorescencijskih jedinica (RFU) o brojnosti stanica, odnosno linearna regresija RFU-a i brojnosti, za vrste analizirane u standardnim uvjetima prikazana je u Prilozima na slici 7.2, dok je za vrste analizirane u eksperimentalnim uvjetima prikazana na slikama 7.3-7.6. U slučajevima u kojima presjek regresijske linije nije bio statistički značajan ($p = 0,2121-0,8685$), regresijski model postavljen je kroz ishodište, odnosno presjek je fiksiran na nulu (Wood i sur., 2005). Fluorescencija se tijekom eksponencijalne faze rasta pokazala pouzdanim pokazateljem gustoće stanica; međutim, u fazi raspadanja stanica rezultati nisu bili pouzdani (Álvarez i sur., 2017). Zbog toga su podatci koji odgovaraju fazi raspadanja/odumiranja isključeni iz analize.

2.4 Određivanje brojnosti stanične kulture

Odrađivanje brojnosti stanične kulture provodila se na način da se poduzorak (3 mL) stanične kulture uzimao u pet vremenskih točaka. Prije uzorkovanja, stanična kultura se ručno homogenizirala barem 15 sekundi. Nakon homogenizacije, uzorak je prebačen u tubicu te je dodana kisela Lugolova otopina radi fiksacije. Prije samog brojanja, svaki uzorak ponovno je homogeniziran inverzijom gore–dolje najmanje 50 puta. Po potrebi, uzorci su bili razrijeđeni kako bi se postigao optimalan broj stanica po vidnom polju (15-30 stanica); potreba za razrijeđivanjem procjenjivala se na temelju visoke intenzivnosti fluorescencije. Brojenje je provedeno u Sedgewick–Rafter komorici na invertnim sjetlosnom mikroskopima Olympus IX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japan) i Leica DMI 4000B (Leica Microsystems CMS,

Wetzlar, Njemačka) pri povećanjima od 100x ili 200x. U svakom uzorku izbrojalo se najmanje 50 polja i 500 stanica (Guillard i Sieracki 2005). Brojnost stanica izračunata je prema jednadžbi:

$$Nt \left(\frac{st}{mL} \right) = \left(\frac{n \text{ (broj stanica)}}{\text{broj izbrojanih polja}} \right) \times 1000 \times DF$$

Nt predstavlja broj stanica u mililitru u trenutku uzorkovanja, a *DF* faktor razrjeđenja.

2.5 Priprema uzoraka za analizu tekućinskom kromatografijom - tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS)

Uzorci su se filtrirali kroz filter veličine pore 0,7 µm (GF/F, Whatman, Maidstone, Ujedinjeno Kraljevstvo) najmanjim mogućim vakumom filtriralo se od 50 do 100 mL. Volumen filtriranog uzorka ovisio je o gustoći stanične kulture, pri čemu se manji volumen filtrirao u slučajevima veće gustoće, budući da prevelika koncentracija stanica onemogućuje pravilno filtriranje i može dovesti do začepjenja filtera. Filteri su se do analize pohranjivali na -20 °C.

Ekstrakcija toksina domoične kiseline vršila se iz stanica sakupljenih na filteru. Filter se stavio u tubicu od 2 mL zajedno sa stakleno/cirkonijskim perlicama promjera 0,5mm i 1 mL metanola kao ekstrakcijskim otapalom. Tubice bi se potom stavile u Magna Lyser (Roche, Basel, Švicarska) 30 sekundi na brzinu okretaja 6000 rpm. Perlice su korištene za mehaničko pucanje filtera i stanica zadržanih na njegovoj površini, kako bi se omogućilo oslobađanje DK iz stanica, ukoliko je bila prisutna. Nakon mehaničkog pucanja stanica, tubice su prenešene u centrifugu na 4 °C te su se centrifugirali dva puta pri 14000 rpm u trajanju od 20 min. Nakon svake centrifuge, supernatant se prenio u novu tubicu. Nakon sakupljanja supernatanta, uzorak se profiltrirao kroz filter pore 0,22 µm (Nylon Syringe Filter, 13 mm diameter, FilterBio, Nantong, Kina). Tako pripremljeni uzorci analizirali su se tekućinskom kromatografijom - tandemskom spektrometrijom masa (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) na instrumentu Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD), opremljenom sustavom Triple Quad 6410, Degasser 1200, Quaternary Pump 1200, Auto Sampler 1290 i Thermostatted Column Compartment 1290 (Slika 2.2).



Slika 2.2 Vezani sustav tekućinska kromatografija – tandemski spektrometrija masa (LC-MS/MS).

2.6 Analiza tekućinskom kromatografijom - tandemskom spektrometrijom masa

Uvjeti za kromatografiju za Poroshell 120 (EC-C18, 2.1 mm x 50 mm, 2,7 μ m) kolonu povezanu s Poroshell 120 (EC-C18, 2.1 mm x 5 mm, 2,7 μ m) predkolonom bili su: protok 0,3 mL/min, temperatura 30 °C, a gradijanti mobilnih faza su prikazani u Tablici 2.5. Mobilna faza A sastojala se od 100% vode s 2 mM amonijevog formata i 50 mL mravlje kiseline, dok se mobilna faza B sastojala od 95% acetonitrila, 5% vode s 2 mM amonijevog formata i 50 mL mravlje kiseline (Tablica 2.1).

Tablica 2.1 Gradijenti mobilnih faza za analizu DK na LC-MS/MS-u.

Vrijeme (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
4	20	80
6	20	80
6,5	90	10
10,5	90	10
11	90	10

DK je bila kvantificirana pomoću kalibracijske krivulje šest radnih standardnih otopina. Standardne radne otopine pripremile su se razrijeđenjem temeljne standardne otopine koja sadrži certificirani DK standard (National Research Council of Canada, Halifax, Kanada).

Koncentracija DK u temeljnoj standardnoj otopini bila je 3000 ng/mL, a pripravljena je u metanolu. Temeljna standardna otopina je bila razrijeđena u šest radnih otopina s koncentracijama 30, 60, 90, 180, 300 i 450 ng mL⁻¹. Uzorak volumen od 2 µL injektiran je u LC-MS/MS. Granica detekcije (LOD) izračunata je temeljem omjera signala i šuma 3:1. Za ovo istraživanje koristila se samo LOD koncentracija, budući da su eksperimenti bili provedeni u relativno malom volumenu medija u kojem su stanice rasle.

Vrijednost domoične kiseline (DK) izražena je po stanici te izračunata prema slijedećoj jednadžbi:

$$DK \left(\frac{ng}{stanica} \right) = \frac{DK \text{ koncentracija } (ng \text{ mL}^{-1}) \times \text{volumen ekstrakcijske otopine } (mL)}{\text{broj stanica } (stanica \text{ mL}^{-1}) \times \text{volumen filtrirane kulture } (mL)}$$

2.7 Ustroj eksperimenata

U svrhu analize toksičnosti i dinamike rasta odabrane su stanične kulture roda *Pseudonitzschia* koje su prethodno identificirane do razine vrste primjenom molekularnih metoda i/ili pretražne elektronske mikroskopije (SEM). Identifikacija vrsta provedena je u okviru povezanih istraživačkih aktivnosti primjenom morfoloških i molekularnih metoda, a sekvence korištene za potvrdu taksonomske pripadnosti većinom su objavljene u radu Bonačić i sur. (2025). Za daljnje analize odabrane su kulture koje su pokazivale stabilan rast u laboratorijskim uvjetima, što je procijenjeno redovitim mikroskopskim praćenjem povećanja brojnosti stanica, očuvane morfologije i izostanka vidljive kontaminacije. Analize staničnih kultura uglavnom su provedene unutar četiri mjeseca nakon izolacije stanica.

Istraživanje je bilo podijeljeno u dva eksperimentalna dijela: prvi je obuhvaćao analizu toksičnosti i dinamike rasta u standardnim uzgojnim uvjetima, odnosno uvjetima prethodno opisanim za održavanje staničnih kultura, dok je drugi obuhvaćao analizu istih parametara pri izmijenjenoj temperaturi i različitim koncentracijama hranjivih tvari.

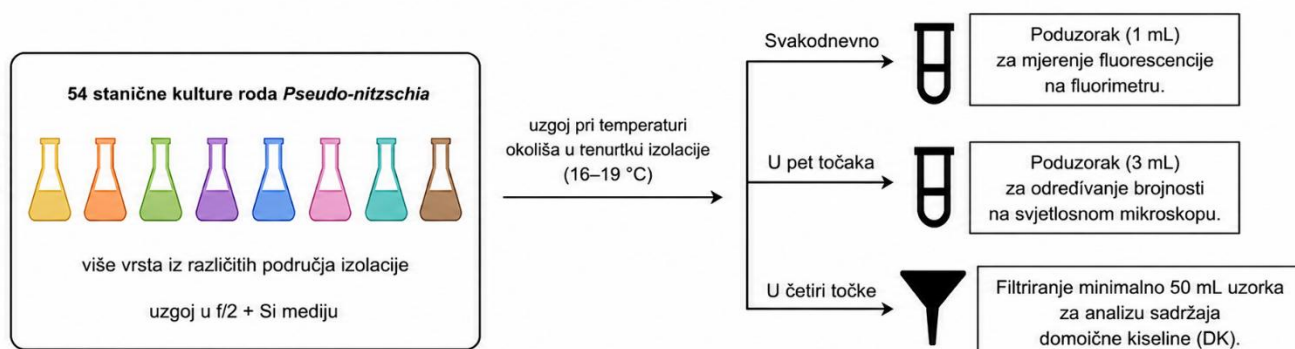
Analize toksičnosti u oba dijela istraživanja provedene su tijekom četiri ključne faze rasta stanične kulture. Faze su određene na temelju promjena gustoće stanica, praćenih fluorimetrijskom metodom mjerenja klorofila:

1. Rana eksponencijalna faza (faza rasta 1) - početno razdoblje eksponencijalnog rasta, tijekom kojeg se stanice počinju dijeliti, a stopa rasta pokazuje uzlazni trend
2. Kasna eksponencijalna faza (faza rasta 2) - faza intenzivnog proliferacijskog rasta, obilježena visokom stopom diobe stanica, porastom brojnosti stanica i izraženom metaboličkom aktivnošću
3. Stacionarna faza (faza rasta 3) - razdoblje u kojem se rast usporava i uspostavlja ravnoteža između stope diobe i mortaliteta; ukupna brojnost stanica ostaje približno nepromjenjiva
4. Faza raspadanja/odumiranja (faza rasta 4) - završna faza u kojoj dolazi do smanjenja ukupne gustoće stanica, zbog povećane stope mortaliteta u odnosu na staničnu diobu, što rezultira opadanjem gustoće stanica.

Osim poduzoraka za mjerenje fluorescencije, uzimani su i poduzorci za određivanje gustoće stanica i koncentracije domoične kiseline. Poduzorci od 3 mL za određivanje gustoće stanica uzeti su na dan inokulacije, odnosno dan 0, te u četiri ključne faze rasta. Uzorci za određivanje koncentracije domoične kiseline uzimani su filtracijom 50 do 100 mL stanične kulture u istim fazama rasta.

2.8 Eksperimentalni pristup I: analiza staničnih kultura u standardnim uzgojnim uvjetima

U prvom eksperimentalnom pristupu analizirane su 54 stanične kulture roda *Pseudo-nitzschia* u standardnim uzgojnim uvjetima, s ciljem dobivanja šireg uvida u osnovne parametre rasta i proizvodnje domoične kiseline u većem broju kultura. Sve stanične kulture uzgajane su u staničnom mediju f/2 s dodatkom silikata prema protokolu Guillard (Guillard, 1975) (Slika 2.3).



Slika 2.3 Pojednostavljeni shematski prikaz uzgoja staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* u standardnim uvjetima.

Temperaturni uvjeti u ovom dijelu istraživanja nisu bili eksperimentalno zadani, nego su odgovarali temperaturama okoliša zabilježenima u trenutku izolacije pojedinih kultura. Na taj je način svaka kultura održavana pri temperaturi koja je odražavala izvorne okolišne uvjete u vrijeme izolacije (Tablica 2.2).

Tablica 2.2 Popis analiziranih staničnih kultura pri standardnim uzgojnim uvjetima s područjem izolacije, datumima izolacije i temepraturom uzgoja. Oznaka vrste predstavlja jedinstvenu identifikacijsku oznaku dodijeljenu pojedinoj vrsti ili staničnoj kulturi radi preglednijeg prikaza rezultata i povezivanja podataka između tablica, slika i analiza.

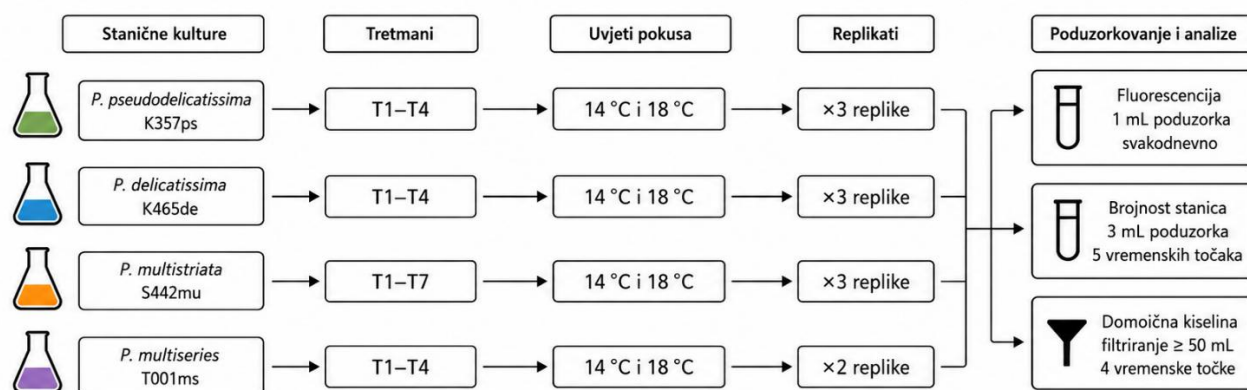
Vrsta	Oznaka vrste	Područje	Datum izolacije	Temperatura tijekom eksperimenta (°C)
<i>P. allochirona</i>	S222al	Šibenik	Sep 2022	19
<i>P. allochirona</i>	S223al	Šibenik	Sep 2022	19
<i>P. allochirona</i>	S280al	Šibenik	Oct 2022	19
<i>P. calliantha</i>	M074ca	Malostonski zaljev	Feb 2022	18
<i>P. calliantha</i>	V061ca	Velebitski Kanal	Feb 2022	18
<i>P. calliantha</i>	V065ca	Velebitski kanal	Feb 2022	18
<i>P. calliantha</i>	V068ca	Velebitski kanal	Feb 2022	18
<i>P. calliantha</i>	V070ca	Velebitski kanal	Feb 2022	18
<i>P. calliantha</i>	V071ca	Velebitski kana	Feb 2022	18
<i>P. calliantha</i>	V072ca	Velebitski kanal	Feb 2022	18
<i>P. calliantha</i>	V077ca	Velebitski kanal	Feb 2022	18
<i>P. calliantha</i>	V079ca	Velebitski kanal	Feb 2022	18
<i>P. delicatissima</i>	K057de	Kaštelanski zaljev	Dec 2021	18
<i>P. delicatissima</i>	K058de	Kaštelanski zaljev	Dec 2022	18
<i>P. delicatissima</i>	K129de	Kaštelanski zaljev	Mar 2022	18
<i>P. delicatissima</i>	K134de	Kaštelanski zaljev	Apr 2022	18
<i>P. delicatissima</i>	M075de	Malostonski zaljev	Feb 2022	18
<i>P. delicatissima</i>	M085de	Malostonski zaljev	Feb 2023	18
<i>P. delicatissima</i>	M088de	Malostonski zaljev	Feb 2024	18
<i>P. delicatissima</i>	M144de	Malostonski zaljev	Apr 2022	19
<i>P. delicatissima</i>	M461de	Malostonski zaljev	Jan 2024	16
<i>P. delicatissima</i>	M462de	Malostonski zaljev	Jan 2024	16
<i>P. delicatissima</i>	V040de	Velebitski kanal	Nov 2021	18
<i>P. delicatissima</i>	V041de	Velebitski kanal	Nov 2021	18
<i>P. delicatissima</i>	V042de	Velebitski kanal	Nov 2021	18
<i>P. delicatissima</i>	V043de	Velebitski kanal	Nov 2021	18
<i>P. fraudulentata</i>	K450fr	Kaštelanski zaljev	Dec 2023	16
<i>P. fraudulentata</i>	K455fr	Kaštelanski zaljev	Dec 2023	16
<i>P. fraudulentata</i>	K456fr	Kaštelanski zaljev	Dec 2023	16
<i>P. fraudulentata</i>	K458fr	Kaštelanski zaljev	Dec 2023	16
<i>P. galaxiae</i>	K136ga	Kaštelanski zaljev	Apr 2022	18
<i>P. galaxiae</i>	M232ga	Malostonski zaljev	Sep 2022	19
<i>P. manni</i>	K231ma	Kaštelanski zaljev	Sep 2022	19
<i>P. manni</i>	K237ma	Kaštelanski zaljev	Sep 2022	19
<i>P. manni</i>	M233ma	Malostonski zaljev	Sep 2022	19
<i>P. manni</i>	M236ma	Malostonski zaljev	Sep 2022	19
<i>P. manni</i>	M239ma	Malostonski zaljev	Sep 2022	19
<i>P. manni</i>	M240ma	Malostonski zaljev	Sep 2022	19
<i>P. manni</i>	M241ma	Malostonski zaljev	Sep 2022	19
<i>P. manni</i>	V229ma	Velebitski kanal	Sep 2022	19
<i>P. multistriata</i>	S290mu	Šibenik	Nov 2022	18
<i>P. multistriata</i>	S442mu	Šibenik	Nov 2022	16
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K328pa	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18

<i>P. pseudodelicatissima</i>	K336ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K339ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K340ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K349ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K350ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K351ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K352ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K356ps	Kaštelanski zaljev	Dec 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K357ps	Kaštelanski zaljev	Dec 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K358ps	Kaštelanski zaljev	Dec 2022	18
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K359ps	Kaštelanski zaljev	Dec 2022	18

2.9 Eksperimentalni pristup II: analiza odabranih staničnih kultura u izmijenjenim uvjetima rasta

U drugom eksperimentalnom pristupu analizirane su četiri odabrane stanične kulture roda *Pseudo-nitzschia* pri kontroliranim promjenama temperature i dostupnosti hranjivih tvari. Cilj ovog pristupa bio je ispitati fiziološki i toksikološki odgovor odabranih kultura na nutritivni i temperaturni stres.

Za eksperimente u izmijenjenim uvjetima odabrane su kulture *P. pseudodelicatissima* K357ps, *P. delicatissima* K465de, *P. multistriata* S442mu i *P. multiseriis* T001ms (Slika 2.4.). Stanična kultura *P. pseudodelicatissima* K357ps odabrana je zbog potvrđene proizvodnje domoične kiseline u ovom istraživanju, dok su ostale kulture uključene zbog potvrđenog toksičnog potencijala pripadajućih vrsta prema literaturnim podacima.



Slika 2.4 Shematski prikaz uzgoja četiri stanične kulture *Pseudo-nitzschia* pri izmijenjenim uvjetima.

U istraživanje je uključen izolat vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* T001ms, podrijetlom iz Mramornog mora, Turska. Usporedna analiza provedena je kako bi se procijenile moguće razlike u fiziološkim i toksikološkim svojstvima među kulturama koje potječu iz različitih

hidroloških i ekoloških uvjeta, s naglaskom na varijabilnost u rastu, proizvodnji domoične kiseline i odgovoru na izmijenjene eksperimentalne uvjete (Tablica 2.3).

Tablica 2.3 Popis analiziranih staničnih kultura pri izmijenjenim eksperimentalnim uvjetima s područjem izolacije i datumima uzorkovanja.

Vrsta	Oznaka vrste	Područje	Datum izolacije
<i>P. pseudodelicatissima</i>	K357ps	Kaštelanski zaljev	Dec 2022.
<i>P. delicatissima</i>	K465de	Kaštelanski zaljev	Jan 2024.
<i>P. multistriata</i>	S442mu	Šibenik	Nov 2023.
<i>P. multiseries*</i>	T001ms	Mramorno more, Turska	2023.

*Sezgin i sur., 2025

Za sve četiri odabrane stanične kulture ispitani su dinamika rasta i proizvodnja domoične kiseline pri dva temperaturna režima, 18 °C i 14 °C. Temperatura od 18 °C korištena je kao standardna temperatura uzgoja, odnosno kontrolni temperaturni uvjet, dok je temperatura od 14 °C predstavljala sniženi temperaturni tretman. Uz promjenu temperature, stanične kulture izložene su i različitim uvjetima dostupnosti hranjivih tvari. Kao kontrolni tretman korišten je standardni f/2 medij s dodatkom silikata, dok su eksperimentalni tretmani uključivali smanjenu početnu koncentraciju fosfata, smanjenu početnu koncentraciju silikata te kombinirano smanjenje početnih koncentracija fosfata i silikata (Tablica 2.4).

Tablica 2.4 Opis tretmana za izmijenjene uvjete uzgoja staničnih kultura *Pseudo-nitzschia*.

Tretman	Opis uvjeta tretmana	Temperature
T1	f/2 uz dodatak silikata	14 °C i 18 °C
T2	–50 % fosfata	14 °C i 18 °C
T3	–50 % silikata	14 °C i 18 °C
T4	–50 % fosfata i –50 % silikata	14 °C i 18 °C

Standardni f/2 + Si medij pripremljen je u sterilnoj morskoj vodi prema protokolu Guillard (1975). U standardnoj pripremi po litri medija dodano je 1 mL stock otopine NaNO₃ koncentracije 75 g/L, 1 mL stock otopine NaH₂PO₄·H₂O koncentracije 5 g/L te 1 mL stock otopine Na₂SiO₃·9H₂O koncentracije 30 g/L. Time su konačne koncentracije glavnih hranjivih tvari u standardnom mediju iznosile približno 882 μM nitrata, 36 μM fosfata i 106 μM silikata (Guillard, 1975). U tretmanima smanjene dostupnosti hranjivih tvari dodatak

fosfata i/ili silikata smanjen je za 50 % u odnosu na kontrolni tretman, odnosno dodano je 0,5 mL odgovarajuće stock otopine po litri medija. Na taj su način konačne koncentracije iznosile približno 18 μM fosfata i/ili 53 μM silikata, dok su ostale komponente medija ostale nepromijenjene. Takva prilagodba medija omogućila je kvantitativnu usporedbu rasta i proizvodnje domoične kiseline između kontrolnih i tretiranih kultura.

Stanična kultura vrste *Pseudo-nitzschia multiseries*, održavana je u K mediju (Keller i sur., 1987), koji predstavlja standardni medij korišten u laboratoriju iz kojeg stanična kultura potječe. Budući da se K i f/2 medij razlikuju u sastavu i koncentracijama pojedinih hranjivih tvari, stanična kultura je tijekom eksperimentalnog razdoblja zadržana u izvornom mediju kako bi se izbjegao dodatni fiziološki stres i potencijalni utjecaj prilagodbe na dinamiku rasta i metabolizam stanica. U odnosu na f/2 + Si medij, K medij sadržava dodatni izvor anorganskog dušika u obliku NH_4Cl , organski oblik fosfora u obliku $\text{Na}_2 \beta$ -glicerofosfata te višu koncentraciju silikata, uz drukčiji sastav elemenata u tragovima i veći udio kelatora EDTA. U K mediju konačne koncentracije iznose 882 μM nitrata, 50 μM amonijeva klorida, 10 μM β -glicerofosfata i 504 μM silikata, dok u f/2 + Si mediju iznose 882 μM nitrata, 36 μM fosfata i 106 μM silikata. Ovakav pristup omogućuje očuvanje stabilnosti stanične kulture i smanjuje mogućnost da promjene u fiziološkom odgovoru budu posljedica nagle promjene medija, a ne eksperimentalnih uvjeta. Iako su stanične kulture održavane u različitim medijima, eksperimentalni tretmani temeljili su se na istim relativnim promjenama dostupnosti hranjivih tvari unutar svakog medija, čime je omogućena usporedba fizioloških odgovora između staničnih kultura.

Eksperimentalni tretmani provedeni su u tri replike po tretmanu za većinu analiziranih kultura. Iznimku je činila kultura *P. multiseries* T001ms, kod koje je zbog slabijeg rasta i smanjene sposobnosti namnažanja u laboratorijskim uvjetima broj replika bio ograničen na dvije. Ova je prilagodba eksperimentalnog dizajna bila nužna kako bi se omogućilo održavanje stabilne kulture tijekom trajanja pokusa.

U tretmanima smanjene dostupnosti hranjivih tvari, stanične kulture vrsta *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima* i *P. multistriata* (K357ps, K465de, S442mu) su bile postupno prilagođene na uvjete smanjene dostupnosti hranjivih tvari. Prilagodba je provedena kako bi se smanjio nagli fiziološki stres uzrokovan promjenom nutritivnih uvjeta te kako bi se omogućila stabilizacija rasta prije početka eksperimentalnih mjerenja. Za razliku od promjene u dostupnosti hranjivih tvari, za temperaturni uvjet od 14°C nije se provodila faza prilagodbe staničnih kultura.

Prilagodba staničnih kultura na eksperimentalne uvjete provela se tijekom izmjene barem 20 generacija (Thorel i sur, 2014; Wingert i Cochlan, 2021). Broj generacija (k) određivao se mjerenjem *in vivo* fluorescencije (RFU) te se izračunao prema slijedećoj jednadžbi:

$$k = \frac{\log_2\left(\frac{f_t}{f_0}\right)}{\Delta t}$$

f_t označava fluorescenciju izmjerenu u vremenskoj točki t , a f_0 označava fluorescenciju izmjerenu u vremenskoj točki t_0 (Lundholm i sur., 2004).

Za razliku od autohtonih izolata, kultura *Pseudo-nitzschia multiseriis* pokazivala je sporiji rast, niže stope rasta i manju gustoću stanica, što se može povezati s činjenicom da je ova kultura dulje održavana u laboratorijskim uvjetima u odnosu na ostale analizirane kulture. Zbog ograničene gustoće stanica i slabije prilagodbe na uzastopna presađivanja, faza prilagodbe na smanjene koncentracije hranjivih tvari nije provedena, nego je kultura izravno izložena eksperimentalnim tretmanima. Pokus je proveden u dvije replike, u skladu s dostupnom količinom stanične kulture. Unatoč tome, izolat je uključen u istraživanje zbog izrazite toksičnosti vrste *P. multiseriis* i njegove vrijednosti za usporedbu fizioloških i toksikoloških odgovora s autohtonim vrstama roda *Pseudo-nitzschia*.

U eksperimentima s vrstama *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (K357ps), *P. delicatissima* (K465de) i *P. multiseriis* (T001ms) korišten je eksperimentalni dizajn koji je uključivao kontrolni tretman (T1) i tri tretmana sa smanjenim koncentracijama odabranih hranjivih tvari (T2–T4) (Tablica 2.4). Za vrstu *P. multistriata* (S442mu) u eksperimentu ispitan je i prošireni skup tretmana, kako bi se procijenio fiziološki odgovor stanica na dodatne nutritivne uvjete te njihov utjecaj na brojnost, stope rasta i potencijalnu proizvodnju domoične kiseline (Tablica 2.5).

Tablica 2.5 Proširenje eksperimentalnog dizajna za vrstu *Pseudo-nitzschia multistriata* (treći eksperiment).

Tretman	Opis uvjeta tretmana	Temperature
T1	f/2 uz dodatak silikata	14 °C i 18 °C
T2	–50 % fosfata	14 °C i 18 °C
T3	–50 % silikata	14 °C i 18 °C
T4	–50 % fosfata i –50 % silikata	14 °C i 18 °C
T5	–75 % silikata	14 °C i 18 °C
T6	–75 % fosfata	14 °C i 18 °C
T7	–75 % fosfata i –75 % silikata	14 °C i 18 °C

Proširenje eksperimentalnog dizajna temeljilo se na hipotezi da proizvodnja domoične kiseline može biti potaknuta specifičnim kombinacijama okolišnih čimbenika ili stresnih uvjeta koji nisu bili obuhvaćeni u početnim eksperimentima. Uključivanjem dodatnih tretmana nastojalo se povećati vjerojatnost detekcije potencijalnog toksičnog odgovora. Takav pristup omogućio je sustavno testiranje poticanja proizvodnje toksina te preciznije razgraničenje uvjeta pod kojima dolazi do promjena u metabolizmu toksina ispitivanih vrsta.

2.10 Analiza podataka

Analiza podataka obuhvaćala je grafičku vizualizaciju i statističku obradu. Grafički prikazi i statistička obrada izrađeni su u programskom okruženju RStudio, uz korištenje odgovarajućih R paketa za obradu i vizualizaciju podataka (R Core Team, 2019).

Normalnost i homogenost varijanci provjerene su dijagnostikom statističkog modela, odnosno analizom reziduala. Normalnost reziduala procijenjena je grafički pomoću Q–Q dijagrama i testom normalnosti reziduala, dok je homogenost varijanci procijenjena pregledom odnosa reziduala i prilagođenih vrijednosti modela. Budući da su podaci fluorescencije i koncentracije domoične kiseline odstupali od normalnosti i homogenosti varijance, obje su varijable log-transformirane radi stabilizacije varijance i smanjenja utjecaja ekstremnih vrijednosti. Log-transformacija je odabrana jer su vrijednosti fluorescencije i koncentracije domoične kiseline bile pozitivne i raspoređene u širokom rasponu, pri čemu su pojedine visoke vrijednosti mogle nerazmjerno utjecati na analizu. Promjene fluorescencijskog signala i koncentracije domoične kiseline analizirane su linearnim mješovitim modelima (engl. *linear mixed models*, LMM). LMM je odabran zbog strukture podataka koja uključuje ponovljena mjerenja istih eksperimentalnih jedinica, odnosno tikvica, kroz vrijeme. Takav pristup omogućuje procjenu učinaka eksperimentalnih čimbenika, poput tretmana, temperature i vremena/faze uzorkovanja, uz istodobno uvažavanje varijabilnosti između pojedinih tikvica.

Promjene fluorescencijskog signala analizirane su zasebnim LMM-om. U model su kao fiksni učinci uključeni tretman, temperatura i dan mjerenja te njihove interakcije. Budući da rast staničnih kultura nije linearan proces, dan mjerenja uključen je kao kategorijska varijabla, čime se nije pretpostavljao linearan trend promjene fluorescencije kroz vrijeme. Umjesto toga, uspoređivale su se vrijednosti fluorescencijskog signala između pojedinih vremenskih točaka mjerenja. U LMM analizu uključene su samo vremenske točke u kojima su bile zastupljene sve kombinacije tretmana i temperaturnih uvjeta. Budući da je svaka tikvica mjerena više puta tijekom eksperimenta, mjerenja unutar iste tikvice mogu biti međusobno sličnija nego mjerenja između različitih tikvica. Zbog toga je tikvica uključena u model kao slučajni učinak, čime se uzima u obzir ovisnost ponovljenih mjerenja unutar iste eksperimentalne jedinice.

Vrijednost domoične kiseline analizirana je drugim LMM-om. U model su kao fiksni učinci uključeni tretman, temperatura i faza uzorkovanja te njihove interakcije. Slučajni presjek za tikvicu uključen je iz istog razloga kao i u modelu fluorescencije, odnosno radi uvažavanja povezanosti mjerenja unutar iste tikvice.

Parametri linearnih mješovitih modela procijenjeni su metodom ograničene najviše vjerojatnosti (REML). Značajnost fiksnih učinaka procijenjena je analizom varijance tipa III uz Satterthwaiteovu aproksimaciju stupnjeva slobode. Za detaljnije tumačenje značajnih interakcija provedene su post-hoc usporedbe procijenjenih marginalnih sredina korištenjem paketa emmeans. Za usporedbe među tretmanima primijenjena je Tukeyjeva korekcija za

višestruka testiranja, dok je za usporedbe između temperatura primijenjena Holmova korekcija p-vrijednosti. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$.

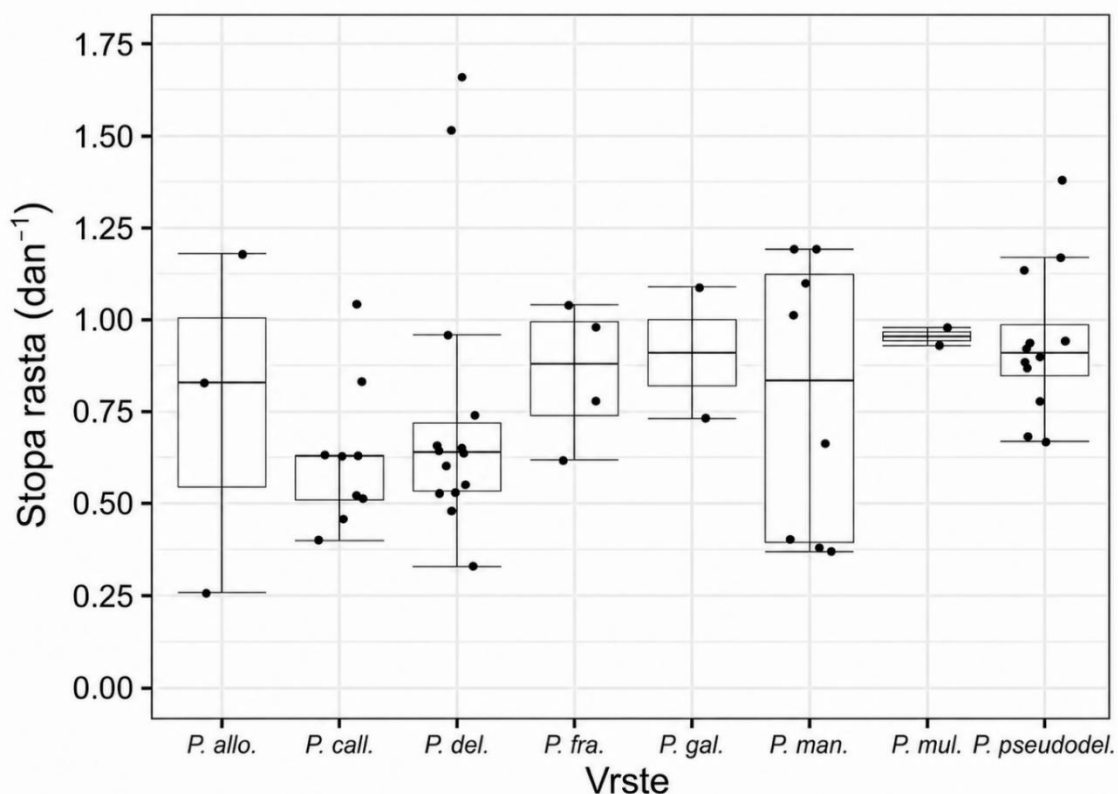
Pretpostavke modela provjerene su analizom reziduala, uključujući QQ-grafove i grafove reziduala u odnosu na predviđene vrijednosti. Stabilnost slučajnog učinka provjerena je funkcijom isSingular. U slučajevima kada je model pokazivao granično rješenje ili kada pojedine kombinacije faktora nisu bile dovoljno zastupljene za pouzdanu procjenu svih parametara, korišten je jednostavniji model bez prekomjerno složenih interakcija, uz zadržavanje glavnih eksperimentalnih čimbenika relevantnih za tumačenje rezultata.

3 Rezultati

3.1 Analiza staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* pri standardnim uzgojnim uvjetima

U ovom dijelu istraživanju analizirane su stope rasta i proizvodnja domoične kiseline (DK) za ukupno 54 izolata roda *Pseudo-nitzschia* spp., koji obuhvaćaju osam vrsta: *Pseudo-nitzschia allochroa*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. mannii*, *P. multistriata* i *P. pseudodelicatissima*. Izolati su izolirani s četiri istraživačka lokaliteta u središnjem Jadranu. Iz Velebitskog kanala izolirane su tri vrste (*P. calliantha*, *P. delicatissima* i *P. mannii*), iz Šibenskog kanala dvije vrste (*P. allochroa* i *P. multistriata*), iz Kaštelanskog zaljeva pet vrsta (*P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. mannii* i *P. pseudodelicatissima*), dok su iz Malostonskog zaljeva izolirane četiri vrste (*P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. galaxiae* i *P. mannii*).

Vrijednosti stope rasta su pokazale izraženu varijabilnost među vrstama, ali i među sojevima iste vrste, što upućuje na razlike u dinamici rasta unutar roda *Pseudo-nitzschia* (Slika 3.1.) Najviše stope rasta zabilježene su kod izolata vrste *P. delicatissima*, s najvišim vrijednostima do $1,66 \text{ dan}^{-1}$, dok su visoke vrijednosti zabilježene i kod pojedinih izolata vrsta *P. pseudodelicatissima* i *P. mannii*. Umjerene stope rasta zabilježene su kod izolata vrsta *P. calliantha*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae* i *P. multistriata*, u rasponu od 0,40 do $1,09 \text{ dan}^{-1}$. Najniža pojedinačna vrijednost stope rasta zabilježena je kod izolata *P. allochroa* S222a1, dok se raspon vrijednosti za ovu vrstu kretao od 0,26 do $1,18 \text{ dan}^{-1}$. Raspon zabilježenih vrijednosti pokazuje da se potencijal rasta razlikuje ne samo među vrstama, nego i među sojevima.



Slika 3.1 Stope rasta (dan^{-1}) svih analiziranih izolata za svaku vrstu. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, linije raspona prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

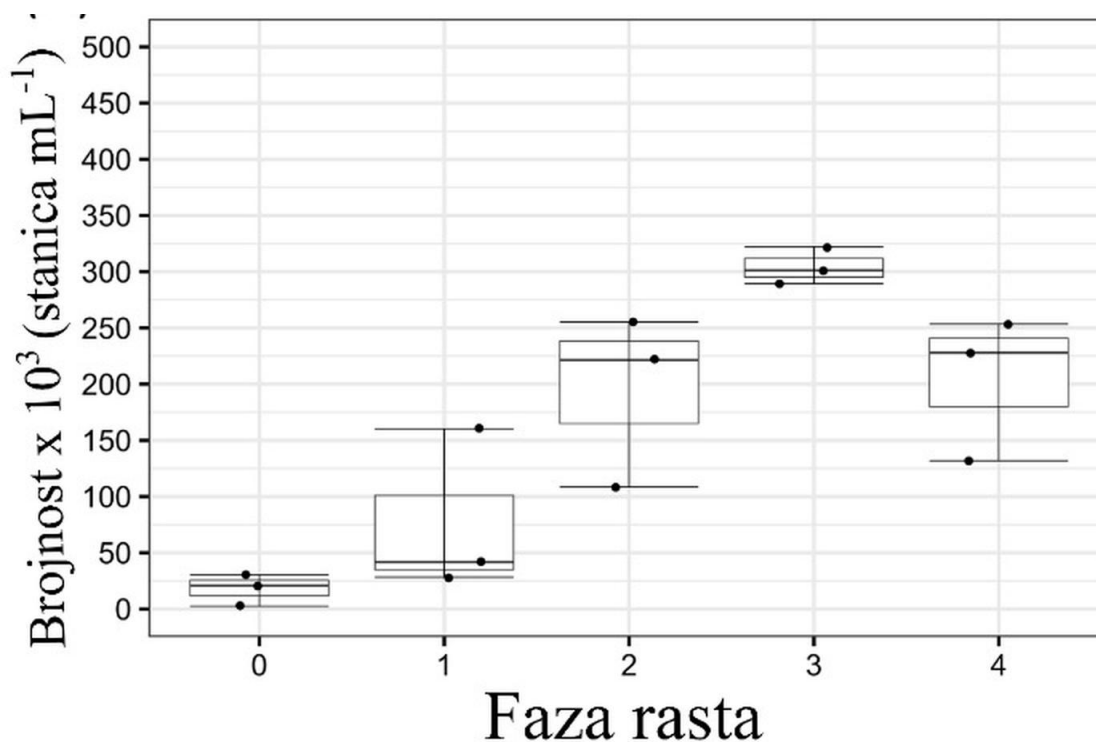
Pseudo-nitzschia allochroa

Analizirana su tri izolata vrste *Pseudo-nitzschia allochroa* (S222al, S223al i S280al), izolirana krajem ljeta i početkom jeseni sa područja Šibenskog kanala (Tablica 3.1).

Tablica 3.1 Popis analiziranih izolata vrste *P. allochroa* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL^{-1}), stopama rasta (dan^{-1}) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL^{-1})	Stopa rasta μ (dan^{-1})	Maks. brojnosti $\times 10^3$ (stanica mL^{-1})
<i>P. allochroa</i> / S222al	< LOD	0,26	322,20
<i>P. allochroa</i> / S223al	< LOD	0,83	301,20
<i>P. allochroa</i> / S280al	< LOD	1,18	289,40

Analize su provedene pri temperaturi od 19 °C. Početna brojnost stanica zabilježena je u rasponu od $2,64 \times 10^3$ do $30,34 \times 10^3$ stanica mL^{-1} . Najviše brojnosti zabilježene su u stacionarnoj fazi rasta (faza 3) i iznosile su između $289,40 \times 10^3$ i $322,20 \times 10^3$ stanica mL^{-1} . Stopa rasta iznosila je 0,26–1,18 dan^{-1} . Nijedan od analiziranih sojeva nije pokazao proizvodnju domoične kiseline, neovisno o fazi rasta (Slika 3.2).



Slika 3.2 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolote vrsta roda *Pseudo-nitzschia allochroa*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, linije raspona prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

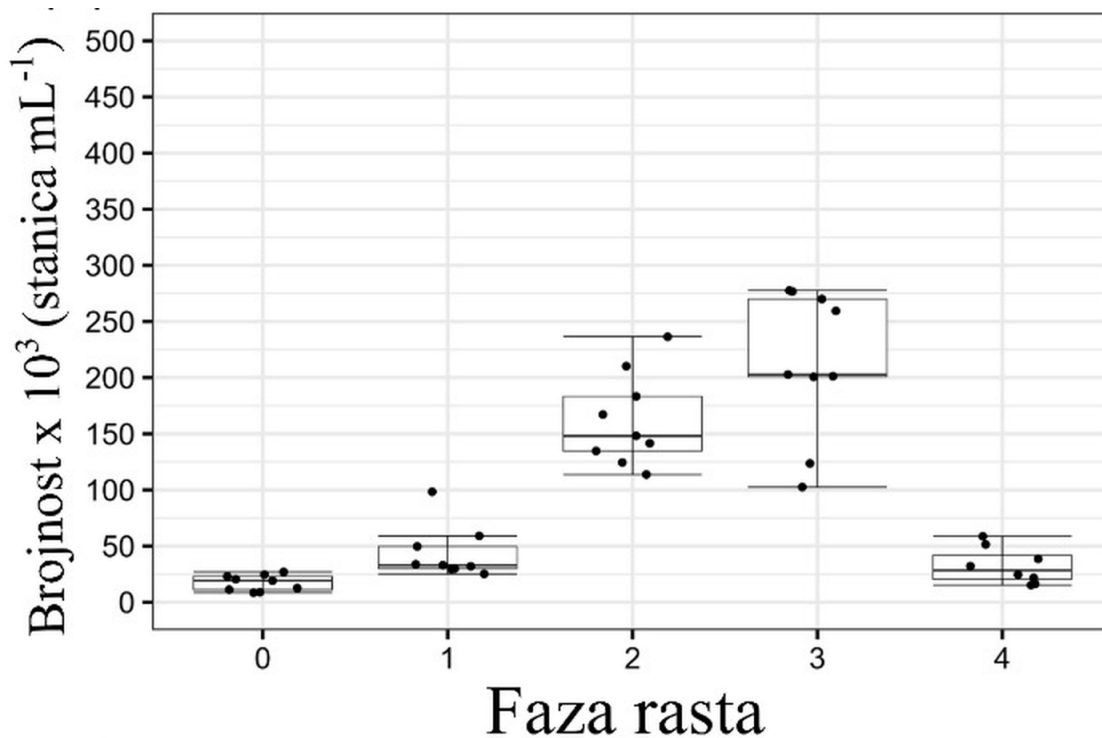
Pseudo-nitzschia calliantha

Ukupno je analizirano devet izolata vrste *Pseudo-nitzschia calliantha* koji su izolirani s dva područja istraživanja: Velebitskog kanala (izolati V061ca, V065ca, V068ca, V070ca, V071ca, V072ca, V077ca i V079ca) te Malostonskog zaljeva (izolat M074ca) (Tablica 3.2).

Tablica 3.2 Popis analiziranih izolata vrste *P. calliantha* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL ⁻¹)	Stopa rasta μ (dan ⁻¹)	Maks. brojnosti ×10 ³ (stanica mL ⁻¹)
<i>P. calliantha</i> / M074ca	< LOD	0,63	201,20
<i>P. calliantha</i> / V061ca	< LOD	0,83	276,68
<i>P. calliantha</i> / V065ca	< LOD	0,51	124,44
<i>P. calliantha</i> / V068ca	< LOD	0,63	277,60
<i>P. calliantha</i> / V070ca	< LOD	1,04	259,40
<i>P. calliantha</i> / V071ca	< LOD	0,46	270,00
<i>P. calliantha</i> / V072ca	< LOD	0,40	202,80
<i>P. calliantha</i> / V077ca	< LOD	0,52	200,60
<i>P. calliantha</i> / V079ca	< LOD	0,63	113,75

Svi izolati vrste *P. calliantha* izolirani su tijekom zimskog razdoblja i uzgajani pri temperaturi od 18 °C. Početna brojnost stanica kretala se u rasponu od $8,49 \times 10^3$ do $24,60 \times 10^3$ stanica mL⁻¹, dok su najviše brojnosti iznosile između $113,75 \times 10^3$ i $277,60 \times 10^3$ stanica mL⁻¹. Najviše brojnosti zabilježene su u fazi rasta 3 (Slika 3.3). Stopa rasta iznosile su 0,40–1,04 dan⁻¹. Budući da je većina izolata potjecala iz Velebitskog kanala, dok je iz Malostonskog zaljeva analiziran samo jedan izolat, usporedba stopa rasta s obzirom na područje izolacije nije bila uravnotežena. Izolat iz Malostonskog zaljeva imao je stopu rasta unutar raspona vrijednosti zabilježenih za izolate iz Velebitskog kanala, pa se na temelju ovih podataka ne može izdvojiti učinak područja izolacije na rast vrste *P. calliantha*. Najmanje razlike u brojnosti stanica među izolatima vrste *P. calliantha* uočene su na dan inokulacije, dok su najveće razlike zabilježene u fazi rasta 3. Nijedan od analiziranih izolata vrste *Pseudonitzschia calliantha* nije pokazao proizvodnju domoične kiseline, neovisno o fazi rasta kulture.



Slika 3.3 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia calliantha*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, linije raspona prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

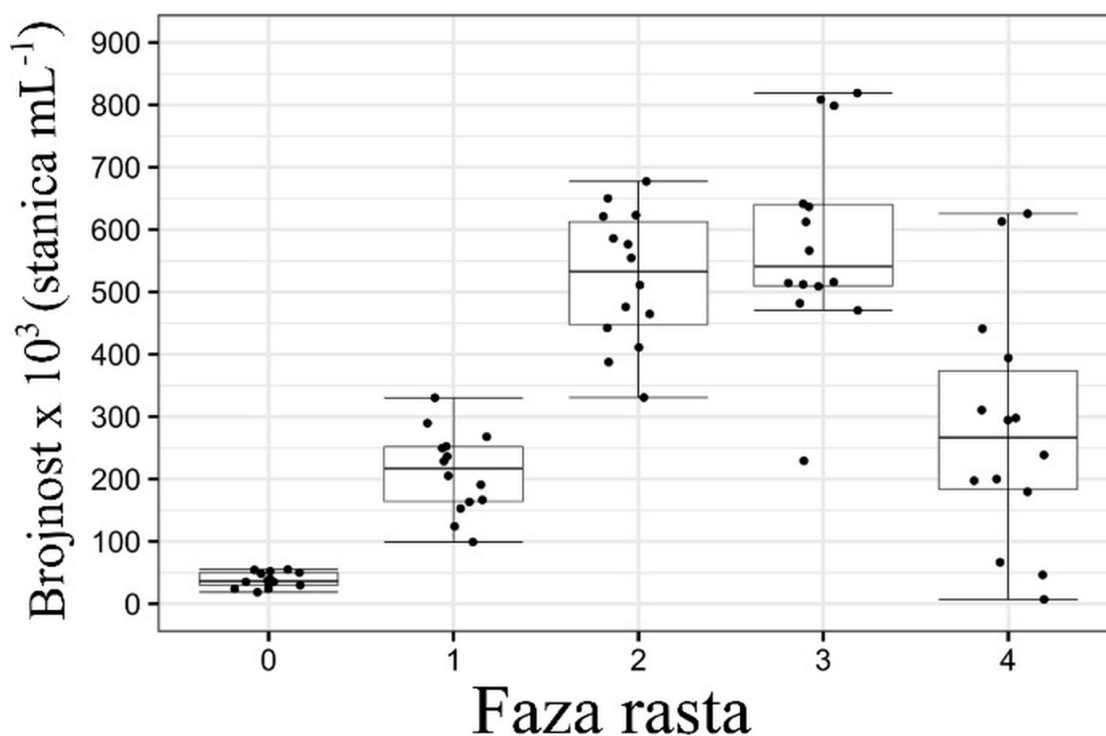
Pseudo-nitzschia delicatissima

Ukupno je analizirano četrnaest izolata vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima*, izoliranih tijekom jeseni i kasne zime s tri područja istraživanja: Kaštelanskog zaljeva (izolati K057de, K058de, K129de i K134de), Velebitskog kanala (izolati V040de, V041de, V042de i V043de) te Malostonskog zaljeva (izolati M075de, M085de, M088de, M144de, M461de i M462de) (Tablica 3.3).

Tablica 3.3 Popis analiziranih izolata vrste *P. delicatissima* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL^{-1}), stopama rasta (dan^{-1}) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL^{-1})	Stopa rasta μ (dan^{-1})	Maks. brojnost $\times 10^3$ (stanica mL^{-1})
<i>P. delicatissima</i> / K057de	< LOD	0,53	512,22
<i>P. delicatissima</i> / K058de	< LOD	0,65	789,60
<i>P. delicatissima</i> / K129de	< LOD	0,64	636,60
<i>P. delicatissima</i> / K134de	< LOD	0,66	515,80
<i>P. delicatissima</i> / M075de	< LOD	0,74	482,00
<i>P. delicatissima</i> / M085de	< LOD	0,96	411,20
<i>P. delicatissima</i> / M088de	< LOD	0,48	509,20
<i>P. delicatissima</i> / M144de	< LOD	0,33	566,40
<i>P. delicatissima</i> / M461de	< LOD	1,66	641,60
<i>P. delicatissima</i> / M462de	< LOD	1,52	514,40
<i>P. delicatissima</i> / V040de	< LOD	0,64	808,60
<i>P. delicatissima</i> / V041de	< LOD	0,55	819,00
<i>P. delicatissima</i> / V042de	< LOD	0,60	612,40
<i>P. delicatissima</i> / V043de	< LOD	0,53	677,40

Izolati vrste *P. delicatissima* analizirani su pri temperaturnim uvjetima u rasponu od 16 do 18 °C. Brojnosti stanica na dan inokulacije kretale su se između $18,78 \times 10^3$ i $55,28 \times 10^3$ stanica mL^{-1} (Slika 3.4). Najviše brojnosti zabilježene su u stacionarnoj fazi rasta (faza rasta 3), u rasponu od $411,20 \times 10^3$ do $819,00 \times 10^3$ stanica mL^{-1} . Interval stope rasta iznosio je 0,33–1,66 dan^{-1} . Najviše stope rasta zabilježene su kod izolata iz Malostonskog zaljeva, osobito M461de i M462de, dok su izolati iz Kaštelanskog zaljeva i Velebitskog kanala imali uže i niže raspone vrijednosti. Ipak, zbog neujednačenog broja izolata po područjima, zabilježene razlike treba tumačiti kao moguću varijabilnost među izolatima, a ne kao jednoznačan učinak područja izolacije. Najveće razlike u brojnosti stanica među izolatima uočene su u fazi propadanja kulture (faza rasta 4). Nijedan od analiziranih izolata vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima* nije pokazao proizvodnju domoične kiseline, neovisno o fazi rasta kulture.



Slika 3.4 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia delicatissima*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, brkovi prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

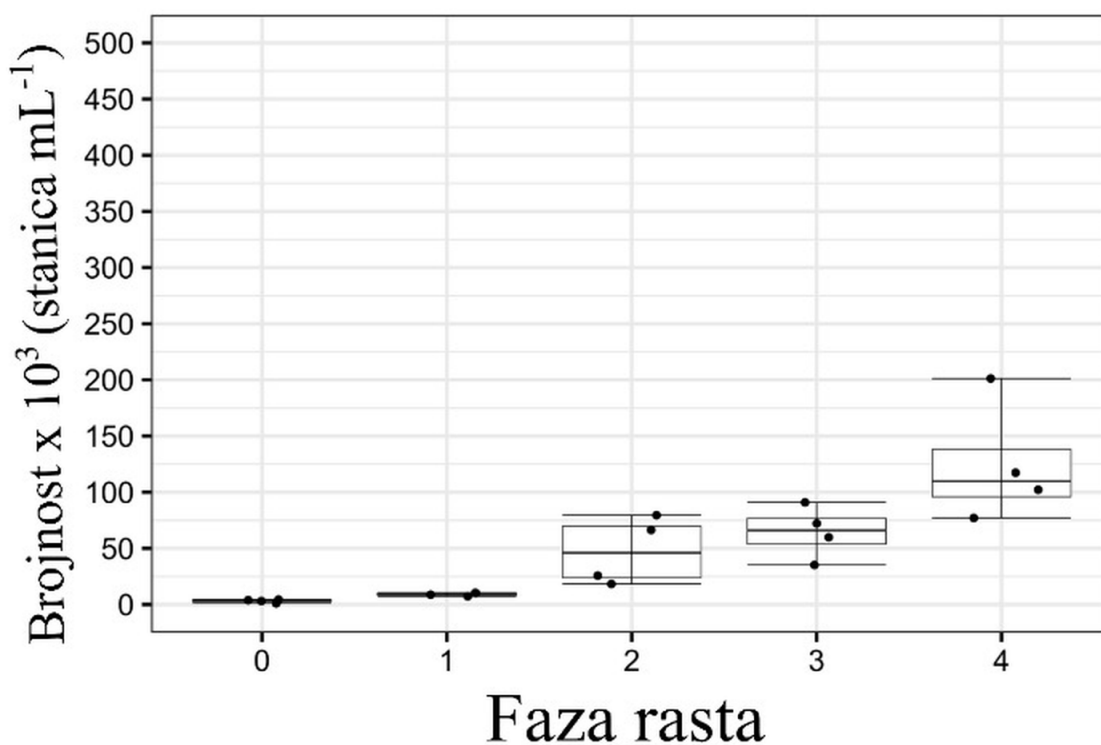
Pseudo-nitzschia fraudulentata

Analizirana su četiri izolata vrste *Pseudo-nitzschia fraudulentata*, pri čemu su svi izolirani iz Kaštelanskog zaljeva početkom zimskog razdoblja (izolati K450fr, K455fr, K456fr i K458fr) (Tablica 3.4.).

Tablica 3.4 Popis analiziranih izolata vrste *P. fraudulentata* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL^{-1}), stopama rasta (dan^{-1}) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL^{-1})	Stopa rasta μ (dan^{-1})	Maks. brojnost $\times 10^3$ (stanica mL^{-1})
<i>P. fraudulentata</i> / K450fr	< LOD	0,98	201,30
<i>P. fraudulentata</i> / K455fr	< LOD	0,78	117,20
<i>P. fraudulentata</i> / K456fr	< LOD	0,62	77,10
<i>P. fraudulentata</i> / K458fr	< LOD	1,04	102,20

Analiza kultura stanica vrste *P. fraudulenta* provedena je pri temperaturi od 16 °C. Izolati su inokulirani s početnim brojem stanica u rasponu od $1,04 \times 10^3$ do $4,51 \times 10^3$ stanica mL^{-1} (Slika 3.5). Najviše brojnosti stanica zabilježene su u fazi rasta 4 te su iznosile između $77,10 \times 10^3$ i $201,30 \times 10^3$ stanica mL^{-1} . Interval stope rasta kretao se između 0,62 i 1,04 dan^{-1} . Najmanje razlike u brojnosti stanica među izolatima uočene su u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta (faza rasta 1), dok su najveće razlike zabilježene u fazi rasta 4. U ovom slučaju faza rasta 4 nije odgovarala fazi propadanja kulture, već se može opisati kao kasna stacionarna faza rasta. Istraživani izolati vrste *Pseudo-nitzschia fraudulenta* nisu pokazali proizvodnju domoične kiseline.



Slika 3.5 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolote vrsta roda *Pseudo-nitzschia fraudulenta*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, linije raspona prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

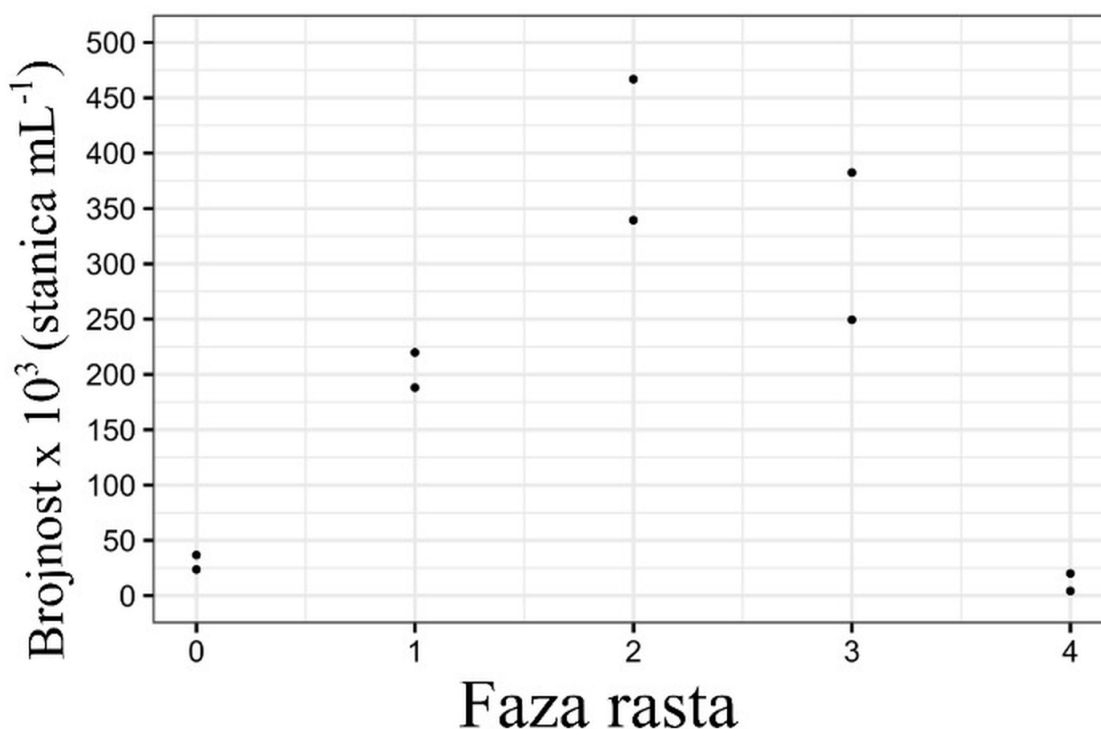
Pseudo-nitzschia galaxiae

Analizirana su dva izolata vrste *Pseudo-nitzschia galaxiae*: jedan izoliran iz Kaštelanskog zaljeva (K136ga), analiziran pri temperaturi od 18 °C, te jedan izoliran iz Malostonskog zaljeva (K232ga) (Tablica 3.5), analiziran pri temperaturi od 19 °C.

Tablica 3.5 Popis analiziranih izolata vrste *P. galaxiae* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL ⁻¹)	Stopa rasta μ (dan ⁻¹)	Maks. brojnost ×10 ³ (stanica mL ⁻¹)
<i>P. galaxiae</i> / K136ga	< LOD	1,09	466,80
<i>P. galaxiae</i> / M232ga	< LOD	0,73	382,40

Početne brojnosti stanica iznosile su $4,28 \times 10^3$ i $36,76 \times 10^3$ stanica mL⁻¹, dok su najviše brojnosti stanica iznosile $382,40 \times 10^3$ i $466,80 \times 10^3$ stanica mL⁻¹ te su zabilježene u fazi rasta 3 (Slika 3.6). Stope rasta iznosile su 0,73 i 1,09 dan⁻¹. Niti jedan od analiziranih izolata vrste *Pseudo-nitzschia galaxiae* nije pokazao proizvodnju domoične kiseline, neovisno o fazi rasta kulture.



Slika 3.6 Brojnost stanica (stanica mL⁻¹) po fazama rasta za sve analizirane izolote vrsta roda *Pseudo-nitzschia galaxiae*.

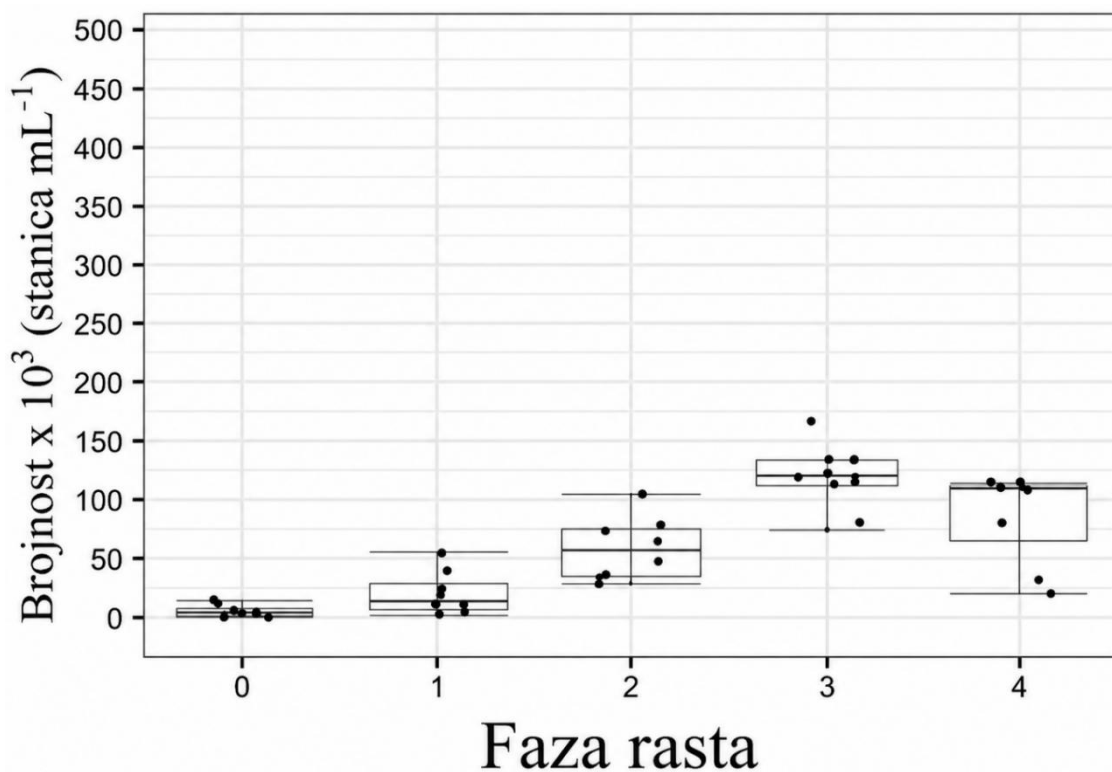
Pseudo-nitzschia mannii

Ukupno je analizirano osam izolata vrste *Pseudo-nitzschia mannii*, izoliranih tijekom kasnog ljeta s tri istraživačka područja: Velebitskog kanala (V229ma), Malostonskog zaljeva (M233ma, M236ma, M239ma, M240ma i M241ma) te Kaštelanskog zaljeva (K231ma i K237ma) (Tablica 3.6).

Tablica 3.6 Popis analiziranih izolata vrste *P. mannii* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL ⁻¹)	Stopa rasta μ (dan ⁻¹)	Maks. brojnost ×10 ³ (stanica mL ⁻¹)
<i>P. mannii</i> / K231ma	< LOD	0,66	108,70
<i>P. mannii</i> / K237ma	< LOD	0,37	130,80
<i>P. mannii</i> / M233ma	< LOD	0,38	114,70
<i>P. mannii</i> / M236ma	< LOD	1,01	105,30
<i>P. mannii</i> / M239ma	< LOD	1,19	164,35
<i>P. mannii</i> / M240ma	< LOD	1,19	130,80
<i>P. mannii</i> / M241ma	< LOD	0,40	113,20
<i>P. mannii</i> / V229ma	< LOD	1,10	119,64

Svi izolati vrste *P. mannii* analizirani su pri temperaturi od 19 °C. Na dan inokulacije najniža brojnost stanica iznosila je 930 stanica mL⁻¹, dok je najviša brojnost na dan inokulacije iznosila 17,10 × 10³ stanica mL⁻¹ (Slika 3.7). Najviše brojnosti stanica zabilježene su u fazi rasta 3 (stacionarna faza) te su se kretale u rasponu od 108,70 × 10³ do 164,35 × 10³ stanica mL⁻¹. Izračunate brzine rasta kretale su se između 0,37 i 1,19 dan⁻¹. Najviše stope rasta zabilježene su kod pojedinih izolata iz Malostonskog zaljeva te kod izolata iz Velebitskog kanala, dok su izolati iz Kaštelanskog zaljeva imali niže vrijednosti. Međutim, zbog neujednačenog broja izolata po područjima, ove razlike nije moguće jednoznačno pripisati području izolacije, nego ih treba tumačiti kao razlike među pojedinim izolatima. Najmanje razlike u brojnosti stanica među izolatima uočene su na dan inokulacije, dok su najveće razlike zabilježene tijekom faze propadanja kulture (faza rasta 4). Nijedan od osam analiziranih izolata vrste *Pseudo-nitzschia mannii* nije pokazao proizvodnju domoične kiseline.



Slika 3.7 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia mannii*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, brkovi prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

Pseudo-nitzschia multistriata

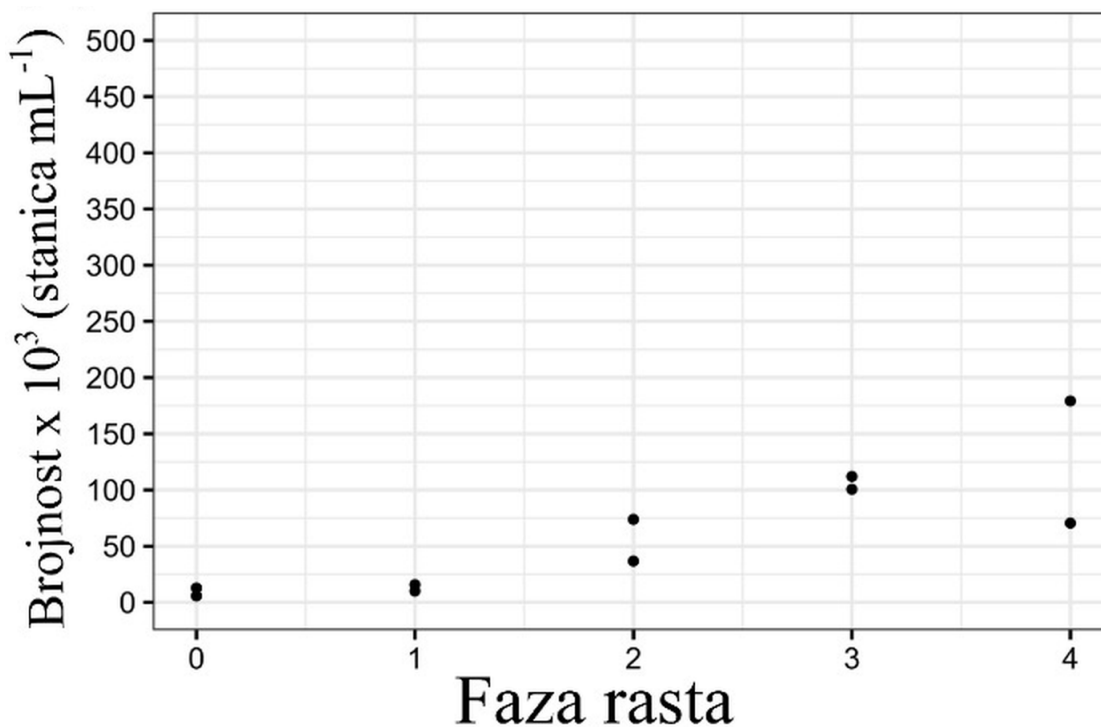
Analizirana su dva izolata vrste *Pseudo-nitzschia multistriata*, izolirana tijekom jeseni iz Šibenskog kanala (S290mu i S442mu) (Tablica 3.7). Izolat S290mu analiziran je pri temperaturi od $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, dok je izolat S442mu analiziran pri temperaturi od $16\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tablica 3.7 Popis analiziranih izolata vrste *P. multistriata* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL^{-1}), stopama rasta (dan^{-1}) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL^{-1})	Stopa rasta μ (dan^{-1})	Maks. brojnost $\times 10^3$ (stanica mL^{-1})
<i>P. multistriata</i> / S290mu	< LOD	0,93	179,20
<i>P. multistriata</i> / S442mu	< LOD	0,98	100,60

Izolati su inokulirani s početnom brojnošću stanica od $5,67 \times 10^3$ i $12,77 \times 10^3$ stanica mL^{-1} (Slika 3.8). Najviše brojnosti stanica u kulturi iznosile su $100,60 \times 10^3$ stanica mL^{-1} za izolat S290mu te $179,20 \times 10^3$ stanica mL^{-1} za S442mu. Kod izolata S290mu najviša brojnost

stanica zabilježena je u fazi rasta 4; međutim, ovaj izolat nije pokazao fazu propadanja kulture, stoga faza rasta 4 u ovom slučaju odgovara stacionarnoj fazi rasta. Kod izolata S442mu najviša brojnost stanica zabilježena je u fazi rasta 3. Stope rasta iznosile su 0,93 i 0,98 dan⁻¹. Analizirani izolati vrste *Pseudo-nitzschia multistriata* nisu pokazali proizvodnju domoične kiseline.



Slika 3.8 Brojnost stanica (stanica mL⁻¹) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia multistriata*.

Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima

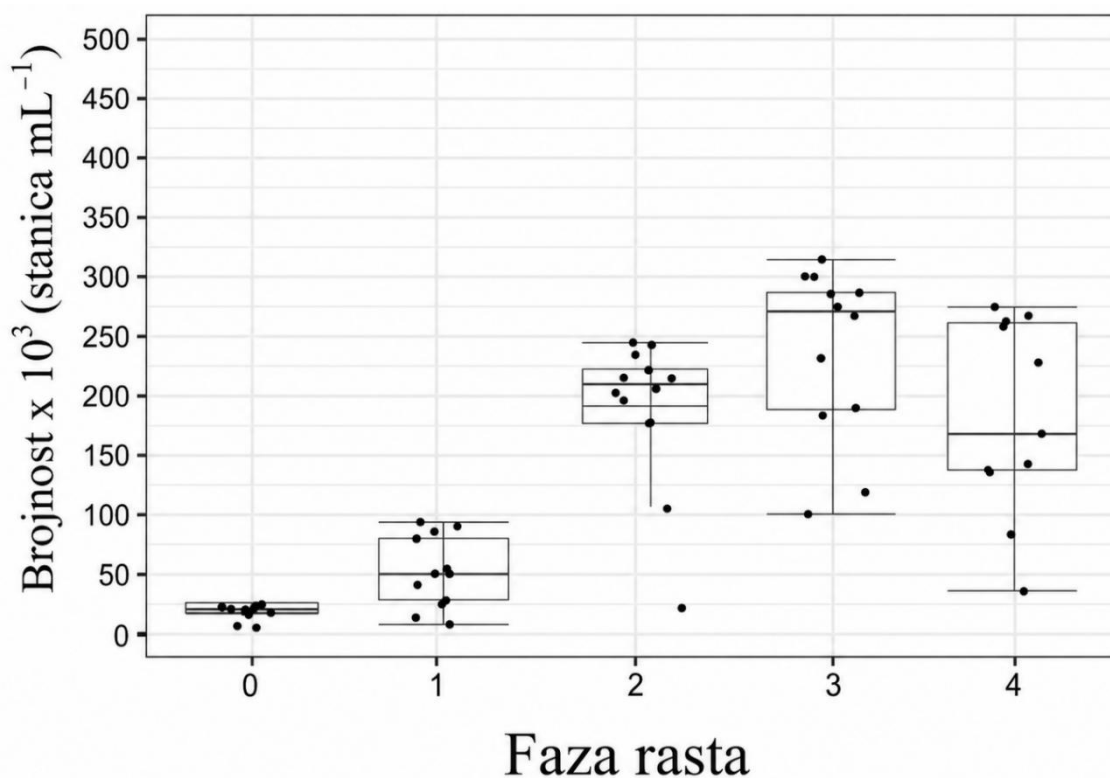
U ovom je istraživanju analizirano dvanaest izolata vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*, pri čemu su svi izolirani s istraživačkog područja Kaštelanski zaljev tijekom kasne jeseni (Tablica 3.8).

Tablica 3.8 Popis analiziranih izolata vrste *P. pseudodelicatissima* uzgajanih pri standardnim uvjetima, s pripadajućim vrijednostima partikulatne domoične kiseline (pDK) u kulturi stanica (ng mL⁻¹), stopama rasta (dan⁻¹) te najvišim zabilježenim brojnostima stanica (×10³ stanica mL⁻¹).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL ⁻¹)	Stopa rasta μ (dan ⁻¹)	Maks. brojnost ×10 ³ (stanica mL ⁻¹)
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K328ps	1,78-2,10	1,38	113,10
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K336ps	5,42-6,32	1,17	309,20
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K339ps	0,96–5,66	0,87	259,80
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K340ps	4,72*	0,90	268,60
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K349ps	4,78*	0,94	294,40
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K350ps	< LOD	0,68	96,27
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K351ps	5,44*	0,92	278,00
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K352ps	0,96-6,26	0,67	293,40
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K356ps	0,22-0,93	0,78	236,40
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K357ps	1,00-4,01	0,88	187,96
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K358ps	0,68-3,93	0,94	277,80
<i>P. pseudodelicatissima</i> / K359ps	0,28-0,68	1,13	237,60

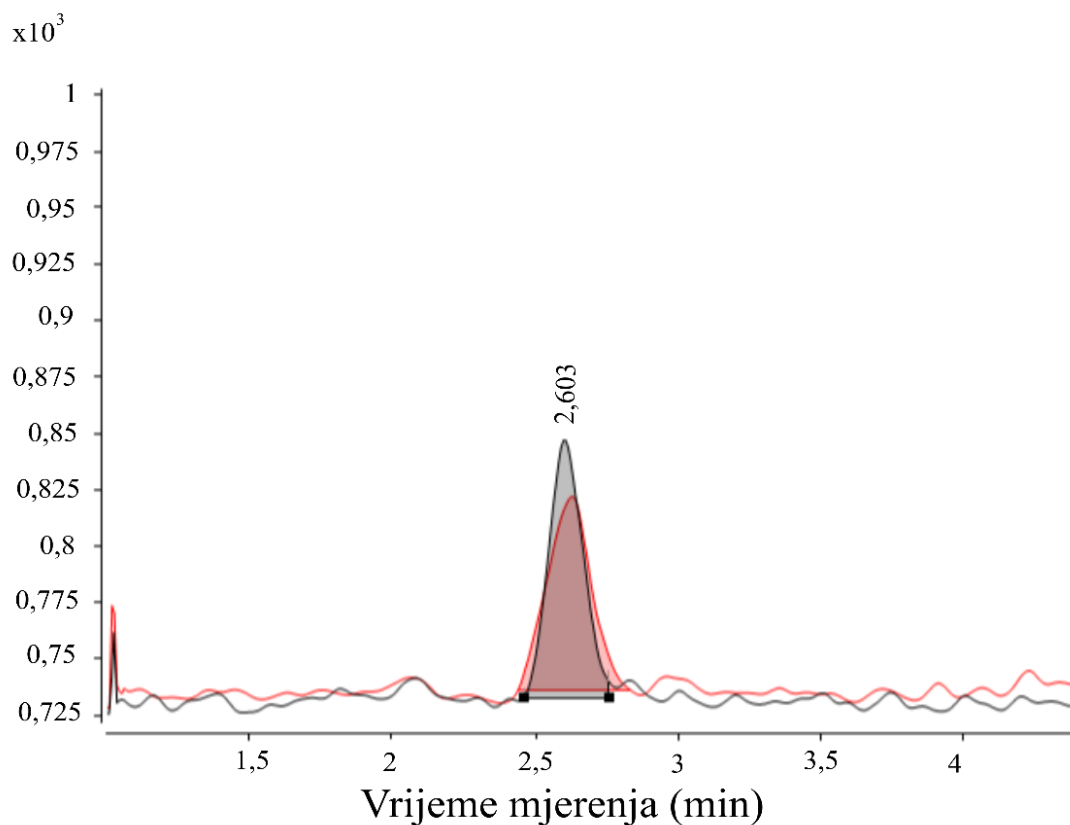
*pDK je određena samo u jednoj fazi rasta stanične kulture

Sve kulture stanica vrste *P. pseudodelicatissima* analizirane su pri temperaturi od 18 °C. Istraživani izolati inokulirani su s početnim brojnostima stanica u rasponu od 2,75 × 10³ do 25,18 × 10³ stanica mL⁻¹ (Slika 3.9), dok su najviše zabilježene brojnosti stanica varirale između 96,27 × 10³ i 309,20 × 10³ stanica mL⁻¹. Najviše brojnosti stanica zabilježene su kod svih izolata u fazi rasta 3 (stacionarnoj fazi). Prosječne brzine rasta kretale su se u rasponu od 0,60 do 1,46 dan⁻¹. Budući da su svi analizirani izolati vrste *P. pseudodelicatissima* potjecali iz Kaštelanskog zaljeva, razlike u stopama rasta među izolatima ne mogu se povezati s područjem izolacije, nego upućuju na varijabilnost među izolatima iste vrste iz istog područja.



Slika 3.9 Brojnost stanica (stanica mL^{-1}) po fazama rasta za sve analizirane izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*. Središnja linija prikazuje medijan, donji rub okvira donji kvartil, a gornji rub okvira gornji kvartil. T-oblikovane linije raspona protežu se do posljednje vrijednosti koja se još nalazi unutar 1,5-strukog interkvartilnog raspona. Ako nema izdvojenih vrijednosti, brkovi prikazuju najniže odnosno najviše vrijednosti.

Od ukupno dvanaest analiziranih izolata, za jedanaest izolata dokazana je proizvodnju toksina (Slika 3.10), pri čemu je izolat K350ps bio jedini koji nije pokazao proizvodnju toksina ni u jednoj fazi rasta.



Slika 3.10 LC–MS/MS kromatogram dobiven LC–MS/MS analizom izolata *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps u stacionarnoj fazi rasta (faza rasta 3), koji sadrži pik domoične kiseline pri retencijskom vremenu 2,603 min (crna krivulja). Crvena krivulja predstavlja kromatogram standarda domoične kiseline iz kalibracijske serije, prikazan radi usporedbe retencijskog vremena i potvrde identifikacije analita.

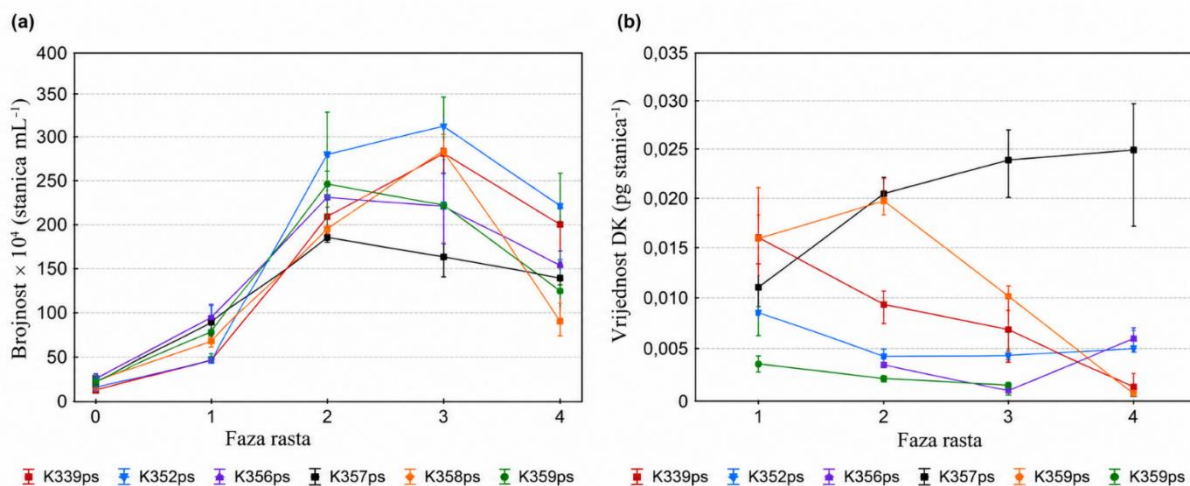
Kontinuirano visoka proizvodnja toksina zabilježena je kod izolata K357ps, koji je pokazao najvišu vrijednost toksina DK među svim toksičnim izolatima ($0,0250 \text{ pg stanica}^{-1}$), izmjerenu tijekom faze propadanja kulture (faza rasta 4) (Tablica 3.9).

Tablica 3.9 Srednje brojnosti stanica (stanica mL⁻¹, n=3), u pojedinim fazama rasta tijekom kojih su izolati vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* proizvodili domoičnu kiselinu, s pripadajućim srednjim vrijednostima domoične kiseline u kulturi stanica i po stanicu.

Izolat	Faza rasta	Srednja brojnost ×10 ³ (stanica mL ⁻¹)	DK u kulturi (ng mL ⁻¹)	DK po stanici (pg stanica ⁻¹)
K328ps	3	89,20	1,78	0,0128
	4	105,44	2,10	0,0097
K336ps	4	316,33	6,32	0,0014
	5	271,83	5,42	0,0027
K339ps	2	48,51	0,96	0,0163
	3	209,55	4,18	0,0095
	4	282,60	5,66	0,0070
	5	202,16	4,04	0,0026
K340ps	5	236,03	4,72	0,0034
K349ps	5	238,62	4,78	0,0116
K351ps	5	272,54	5,44	0,0021
	2	48,79	0,96	0,0086
	3	281,37	5,62	0,0044
	4	313,56	6,26	0,0044
	5	223,43	4,46	0,0052
K356ps	3	233,23	0,78	0,0035
	4	222,42	0,22	0,0010
	5	154,35	0,93	0,0061
K357ps	2	89,83	1,00	0,0112
	3	187,17	3,89	0,0208
	4	165,07	4,01	0,0241
	5	140,90	3,53	0,0250
	2	69,42	1,09	0,0160
K358ps	3	196,40	3,93	0,0200
	4	286,95	2,98	0,0104
	5	92,45	0,68	0,0007
	2	79,61	0,28	0,0036
K359ps	3	247,47	0,54	0,0022
	4	224,36	0,34	0,0015

Slično tome, izolat K358ps također je pokazao visoku proizvodnju toksina (0,0200 pg stanica⁻¹), pri čemu je najviša vrijednost zabilježena tijekom kasne ekspanzijske faze rasta (faza rasta 2). Kod većine analiziranih izolata proizvodnja toksina zabilježena je tijekom faze propadanja kulture (faza rasta 4), s iznimkom izolata K328ps i K359ps. Četiri izolata

(K339ps, K352ps, K357ps i K358ps) pokazala su proizvodnju toksina tijekom sve četiri analizirane faze rasta. Kod tih izolata, koji su pokazivali kontinuiranu proizvodnju toksina, sadržaj toksina po stanici smanjivao se tijekom rasta kulture, pri čemu su najviše vrijednosti toksina zabilježene u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta (faza rasta 1) (Slika 3.4). Jedini izuzetak predstavljao je izolat K357ps, kod kojeg je vrijednost toksina postupno rasla tijekom faza rasta te je dosegla maksimum u fazi propadanja kulture (faza rasta 4).



Slika 3.11 (a) Brojnost stanica (stanica mL⁻¹) u određenim točkama rasta izolata *Pseudonitzschia pseudodelicatissima* koji su pokazali proizvodnju toksina u najmanje tri faze rasta. (b) Srednja vrijednost i raspon vrijednosti domoične kiseline (pg stanica⁻¹) u replikatnim uzorcima tijekom faza rasta izolata koji su proizvodili toksin u najmanje tri različite faze.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

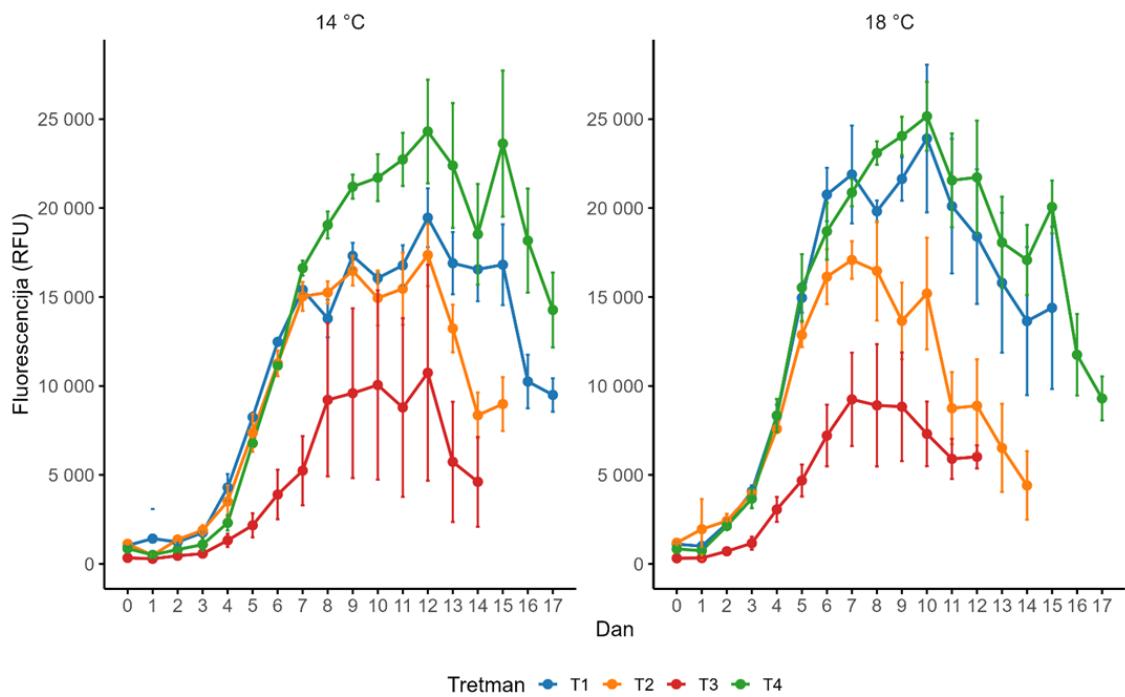
[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]



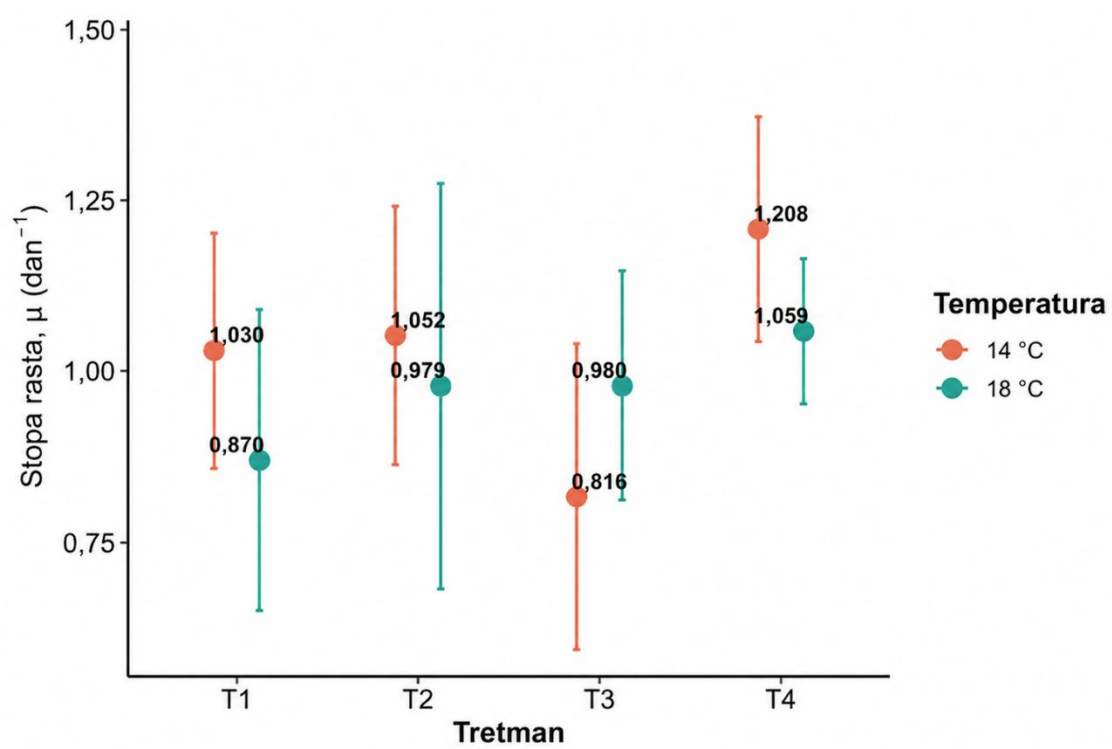
[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

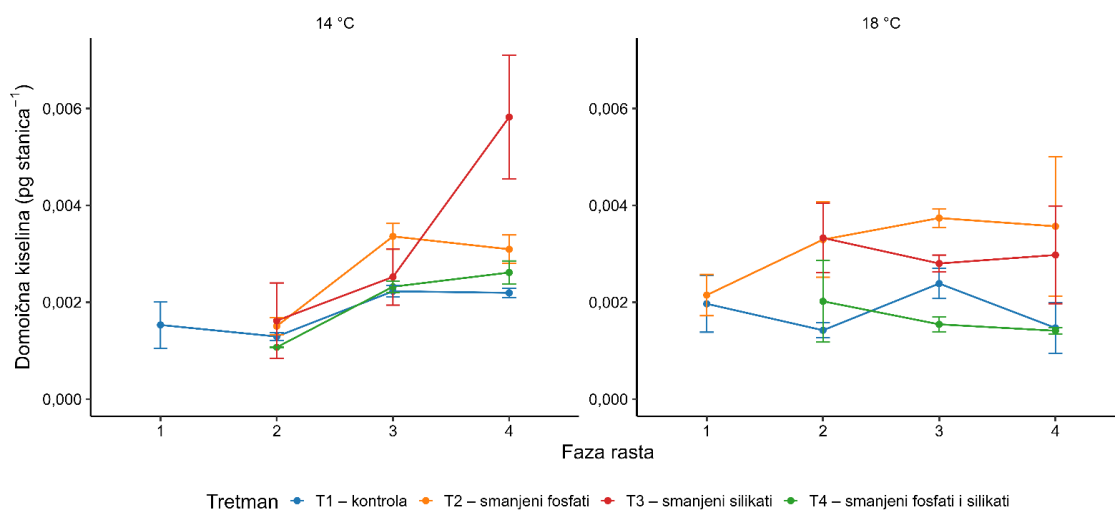
[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

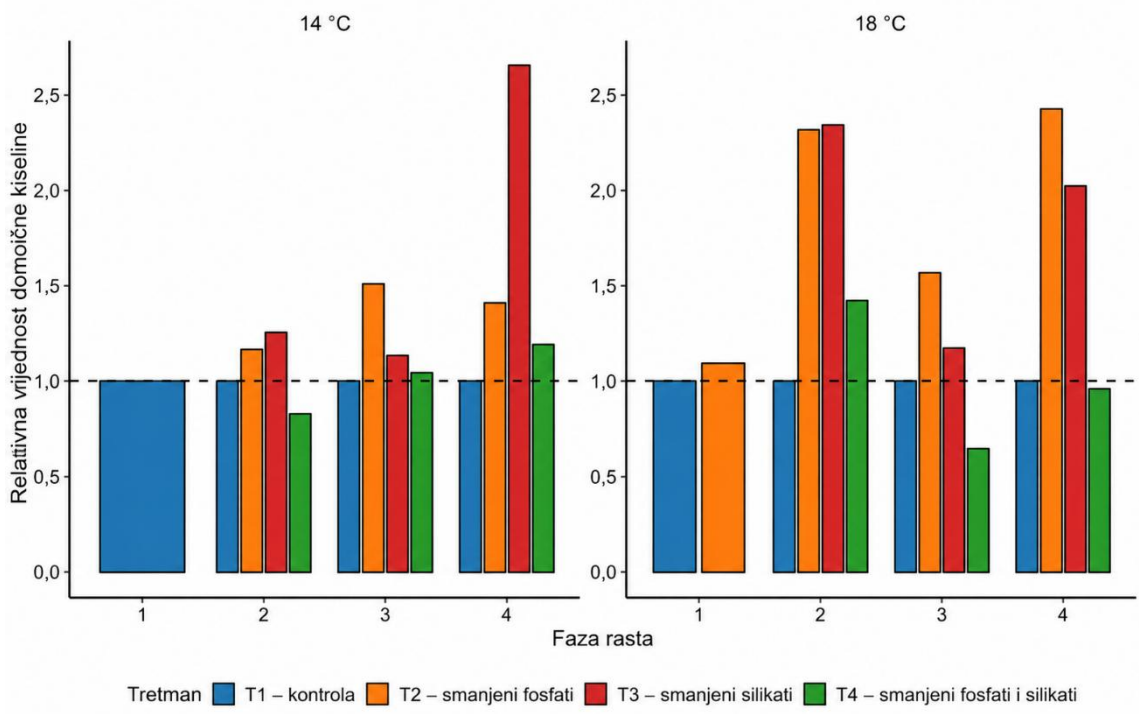
[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text]



[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

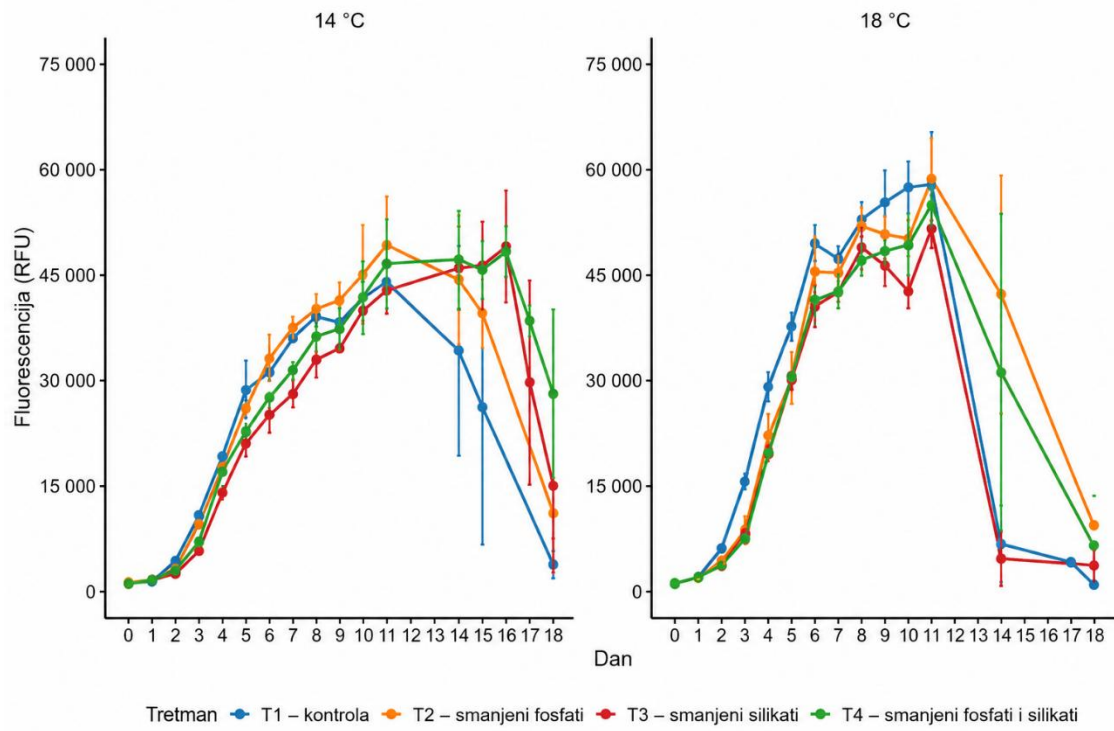
[Redacted text]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

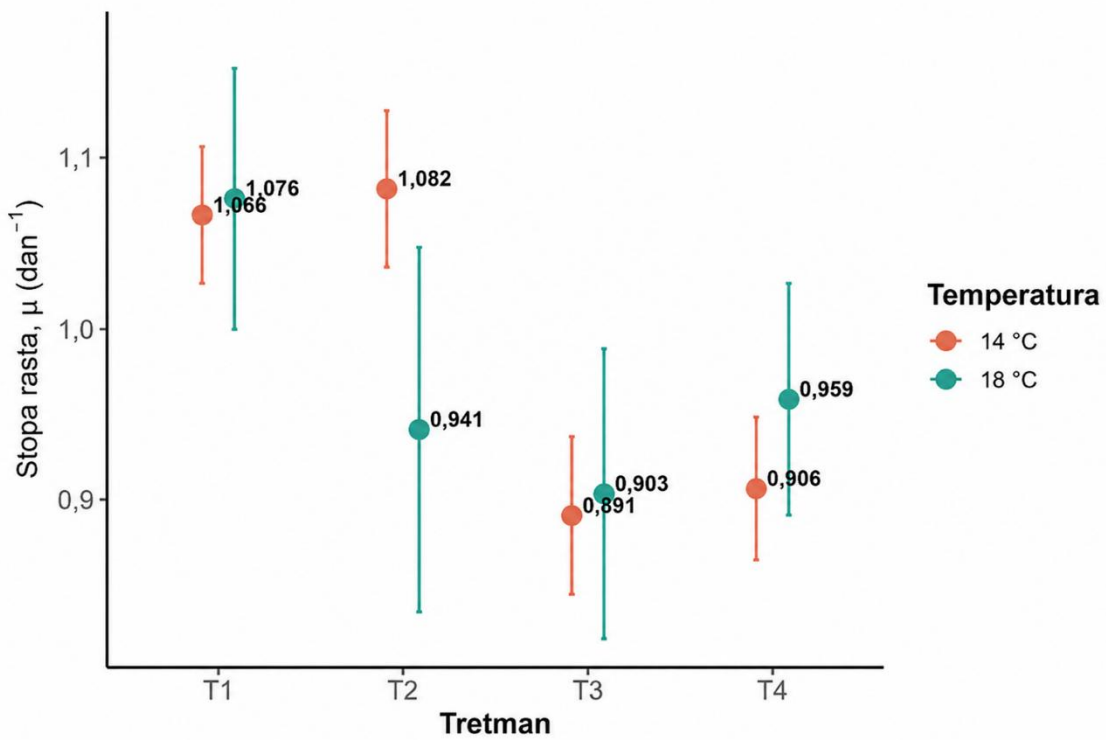


[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
------------	------------	------------	------------	------------	------------

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
------------	------------	------------	------------	------------	------------

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

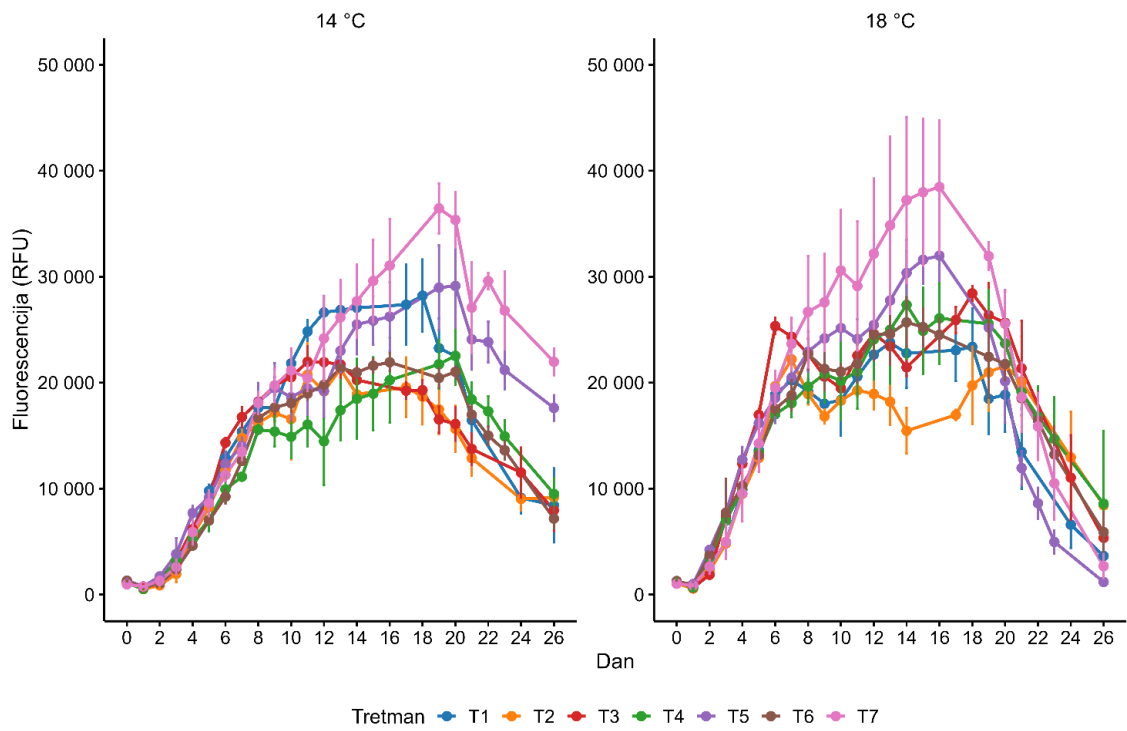
[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]



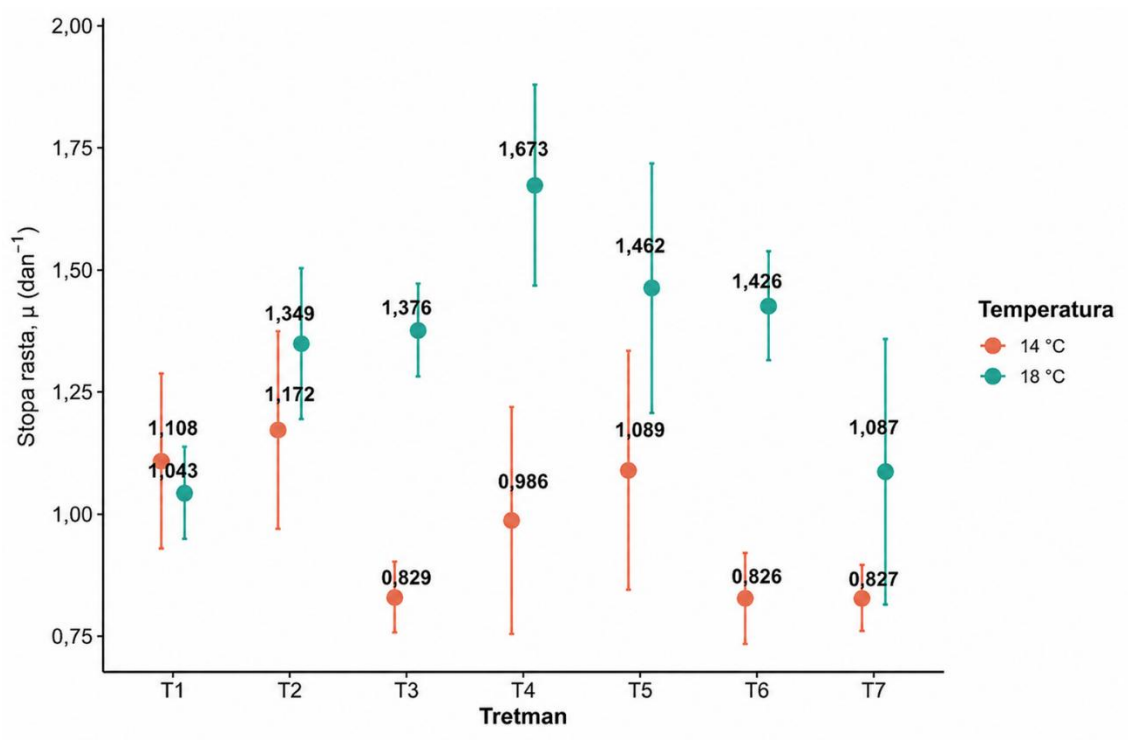
[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text]



[Redacted text]

[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

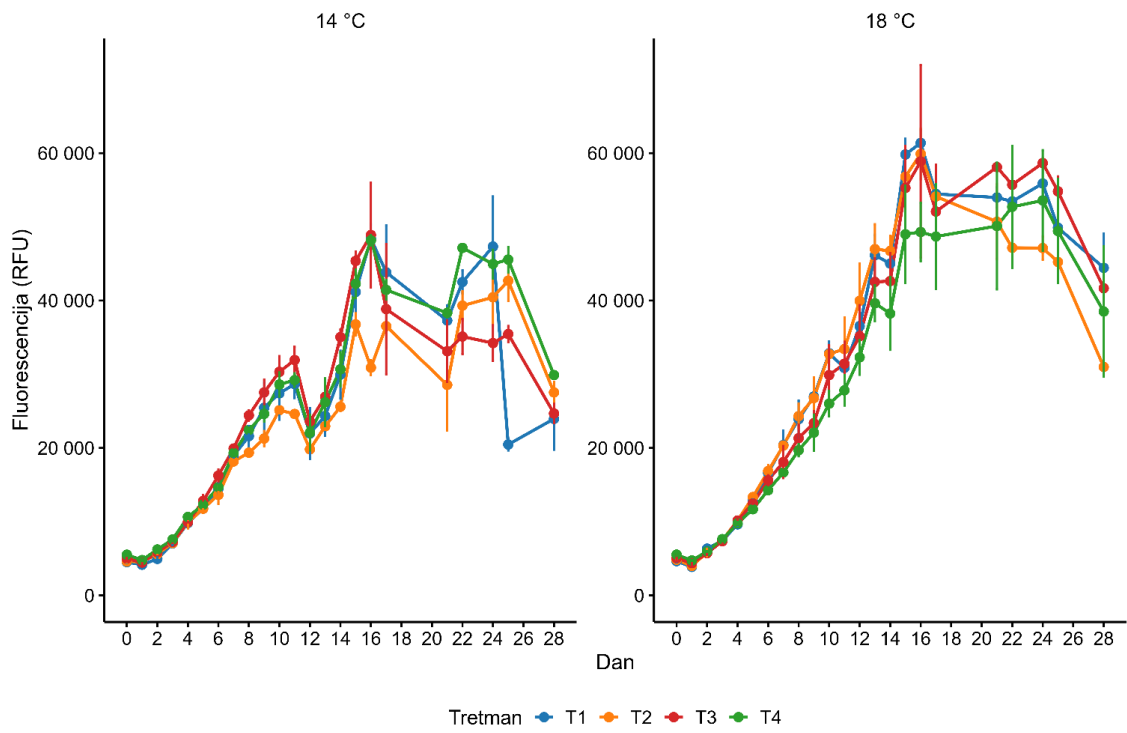
[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]



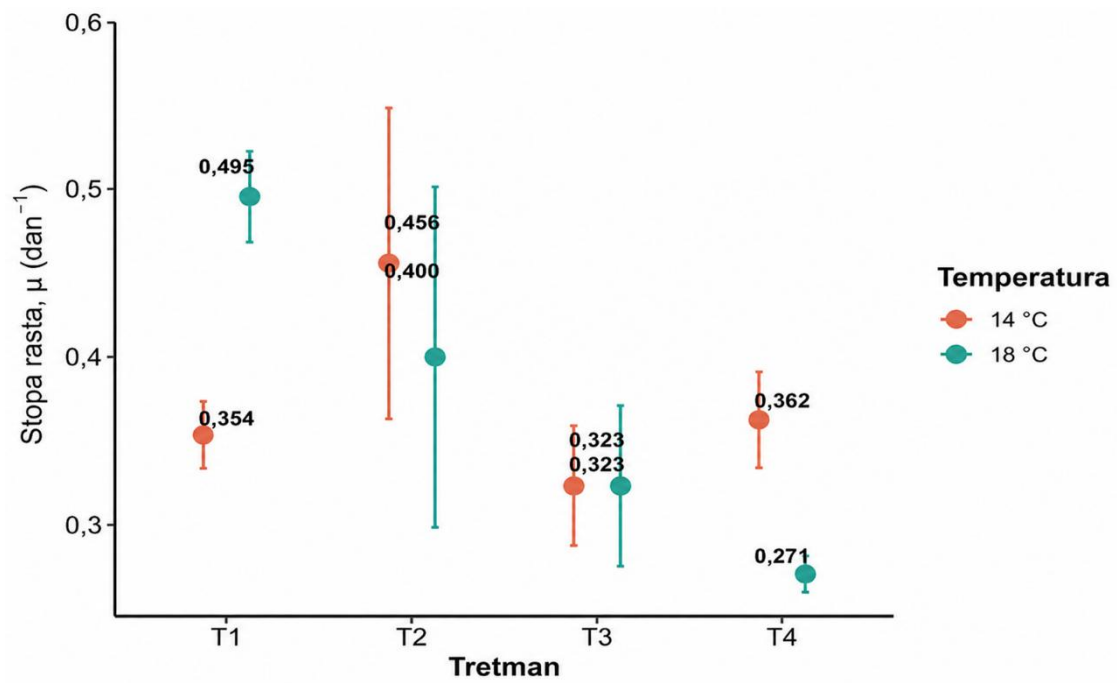
[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text]



[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

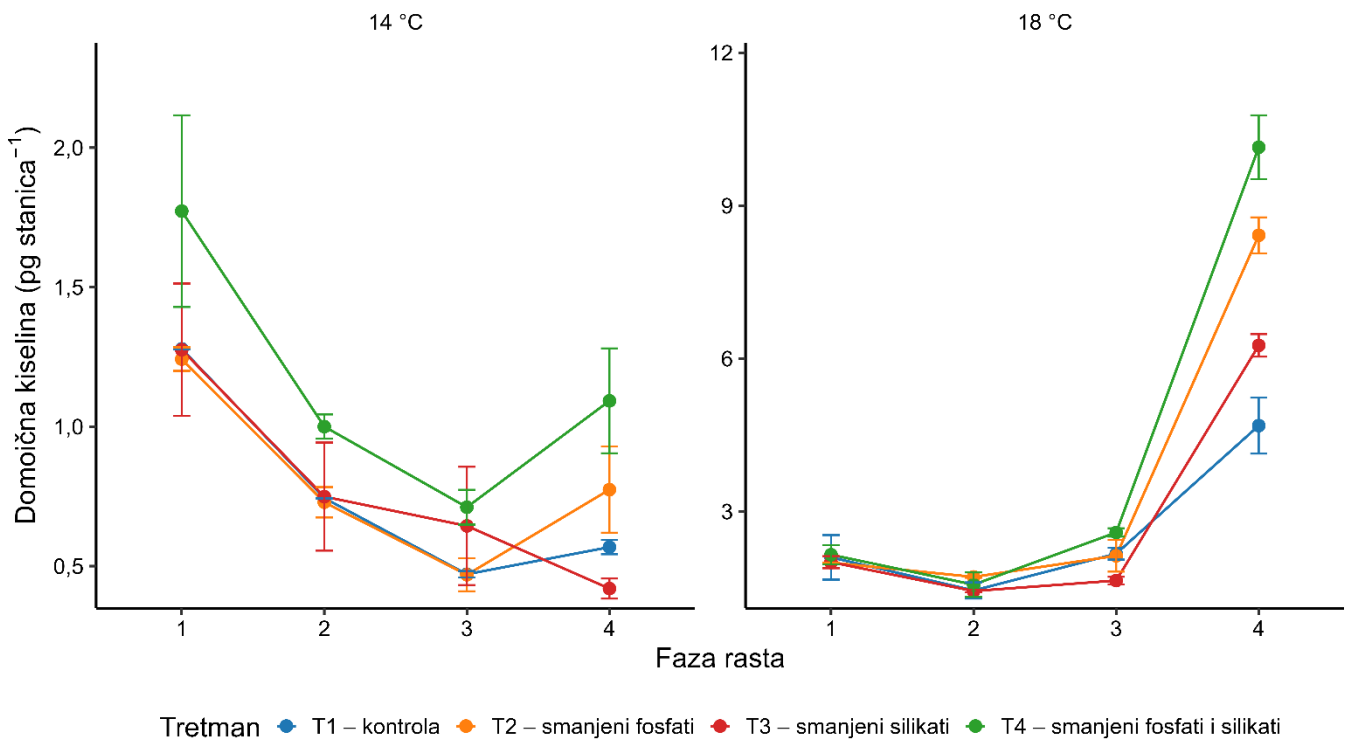
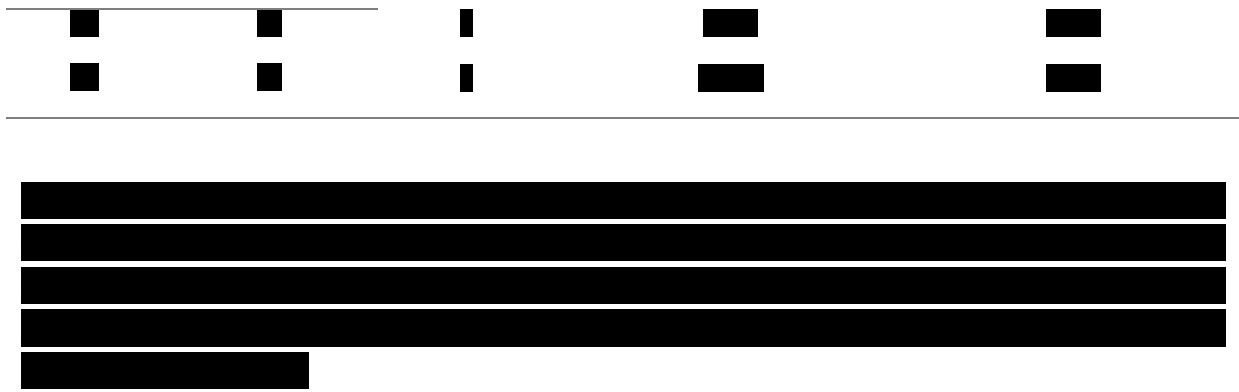
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

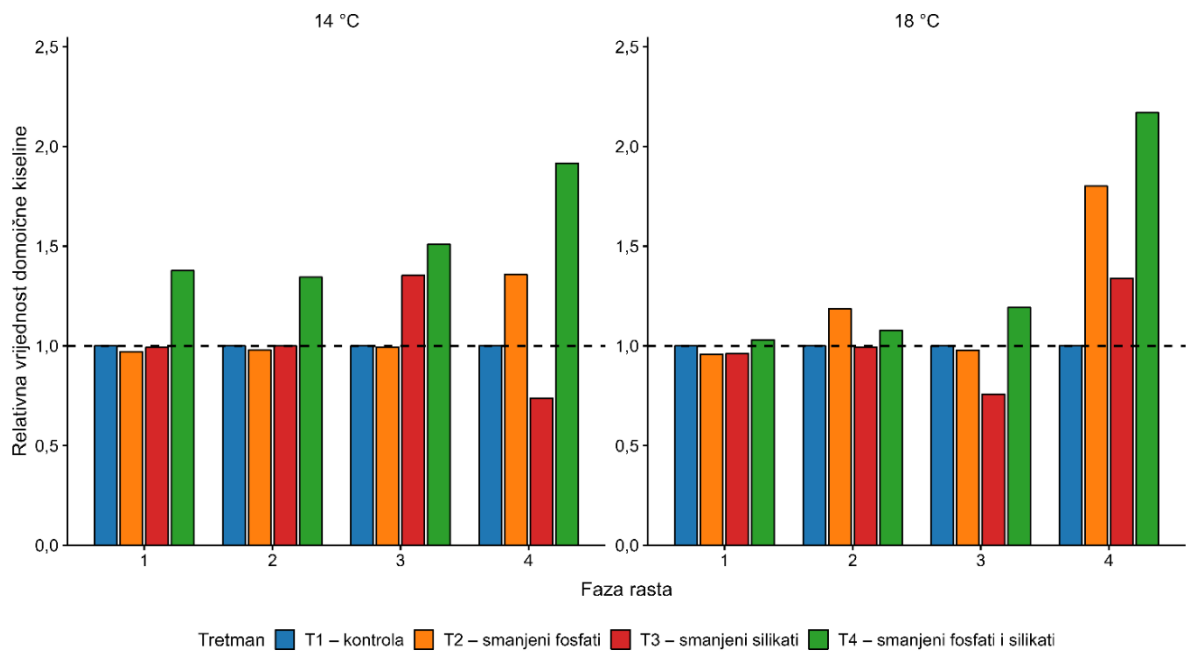
[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



4 Diskusija

4.1 Analiza staničnih kultura pri standardnim uzgojnim uvjetima

Ovaj dio istraživanja predstavlja prvo sveobuhvatno istraživanje brzine rasta i toksičnosti, koje je obuhvatilo 54 izolata roda *Pseudo-nitzschia* s područja srednjeg Jadranskog mora. Istraživanje uključuje osam vrsta izoliranih iz srednjeg Jadrana: *P. allochirona*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. mannii*, *P. multistriata* i *P. pseudodelicatissima*. Iako su prethodna istraživanja u Jadranskom moru uključila više vrsta ovoga roda te značajno pridonijela poznavanju njihove raznolikosti, sezonske dinamike i toksičnosti, uglavnom su bila prostorno vezana uz sjeverni i sjeverozapadni Jadran ili su se odnosila na ograničen broj izolata, vrsta i/ili istraživanih uvjeta. Primjerice, u sjevernom Jadranu istražena su ekološka, morfološka i molekularna obilježja sedam vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Toksičnost je ispitana u ukupno 20 uzoraka staničnih kultura više vrsta, pri čemu je DK određena u jednoj točki uzorkovanja, bez praćenja promjena tijekom različitih faza rasta stanične kulture (Marić Pfannkuchen, 2013). U sjeverozapadnom Jadranu analizirano je 138 kultiviranih izolata roda *Pseudo-nitzschia*, pri čemu je morfološkim i molekularnim metodama utvrđeno šest taksona. Proizvodnja DK također je analizirana, ali toksin nije zabilježen ni u jednom ispitivanom izolatu (Giulietti i sur., 2021). Također, u sjevernom Jadranu provedena su istraživanja toksičnosti više vrsta, uključujući *P. multistriata*, *P. delicatissima* i *P. galaxiae* (Turk Dermastia i sur., 2022). U tom je istraživanju svih 33 analizirana izolata najprije ispitano u jednoj točki stacionarne faze rasta, dok je kod triju toksičnih izolata vrste *P. multistriata* i jednog izolata vrste *P. delicatissima* proizvodnja DK dodatno praćena u više vremenskih točaka tijekom rasta kulture. Za razliku od prethodnih istraživanja, ovo istraživanje istodobno uspoređuje velik broj izolata i vrsta s područja uzgoja školjkaša srednjeg Jadrana te prati rast i proizvodnju domoične kiseline kroz više faza rasta stanične kulture, čime se omogućuje detaljnija procjena razlika u fiziološkim svojstvima i toksičnom potencijalu jadranskih populacija roda *Pseudo-nitzschia*.

4.1.1 Brojnost stanica i stopa rasta staničnih kultura

Od analiziranih vrsta, za izolate *P. delicatissima* zabilježene su najveće gustoće stanica tijekom cijelog ciklusa rasta, dosežući vrijednosti do $819,00 \times 10^3$ stanica mL^{-1} , što je u skladu s prethodnim istraživanjima u kojima su zabilježene gustoće do $1,6 \times 10^6$ stanica mL^{-1} (Fehling i sur., 2005). Slično tome, visoke gustoće stanica zabilježene su i za *P. galaxiae*, pri čemu su analizirani sojevi dosegili maksimalne vrijednosti do $466,80 \times 10^3$ stanica mL^{-1} . Ovakvi su rezultati u skladu s navodima, prema kojima *P. galaxiae* u kulturi može doseći gustoće veće od 1×10^6 stanica mL^{-1} (Turk Dermastia i sur., 2022). Visoke brojnosti ove vrste zabilježene su i u prirodnim populacijama; primjerice, u Napuljskom zaljevu zabilježili su brojnost od $9,4 \times 10^3$ stanica mL^{-1} (Cerino i sur., 2005).

U ovom istraživanju izolati *P. calliantha* postigli su maksimalne gustoće stanica u rasponu od $113,75 \times 10^3$ do $277,60 \times 10^3$ stanica mL^{-1} . Za usporedbu, prethodna istraživanja navode da najviše gustoće stanica *P. calliantha* u laboratorijskim uvjetima mogu biti između 272×10^3 i $1,97 \times 10^6$ stanica mL^{-1} (Thessen i sur., 2009).

Najviše vrijednosti stope rasta među istraživanim vrstama zabilježene su za vrstu *P. delicatissima*, zatim u *P. pseudodelicatissima* i *P. mannii*. Kod vrsta zastupljenih sa više područja, osobito *P. delicatissima* i *P. mannii*, najviše stope rasta zabilježene su kod pojedinih izolata iz Malostonskog zaljeva, no zbog neujednačenog broja izolata po područjima ove razlike nije moguće jednoznačno pripisati području. Autori Lundholm i sur., 2004 su za *P. delicatissimu* su također zabilježili visoke stopu rasta od $1,47 \text{ dan}^{-1}$, dok su u uvjetima različite dostupnosti željeza i bakra zabilježene niže vrijednosti, s najvišom stopom rasta od $0,91 \text{ dan}^{-1}$ u kontrolnim staničnim kulturama (Lelong i sur., 2013). U ranijem istraživanju Lundholm i sur. (1997) visoke su stope rasta zabilježene i za vrstu *P. pseudodelicatissima*.

Uočeno je da u pojedinim slučajevima veća početna brojnost inokuluma rezultira nižim stopama rasta, iako je eksponencijalna faza rasta i dalje bila jasno prepoznatljiva. Nadalje, kod nekoliko izolata (S290mu, K450fr, K455fr, K456fr i K458fr) faza odumiranja nije bila jasno uočljiva, a četvrta faza rasta odgovarala je stacionarnoj fazi. Ta odstupanja vjerojatno su posljedica manjih vremenskih neusklađenosti uzorkovanja, koje su mogle utjecati na tumačenje dinamike rasta, iako se primijenjeni pristup općenito pokazao pouzdanim.

Rezultati također potvrđuju da na gustoću stanica, brzinu rasta i rast utječe niz čimbenika, uključujući fazu rasta početne (matične) kulture u trenutku inokulacije, moguće pogreške pri brojanju te metode pripreme uzoraka. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Turk Dermastia i sur. (2022) te dodatno potvrđuju složenost čimbenika koji određuju dinamiku rasta vrsta roda *Pseudo-nitzschia*.

4.1.2 Toksičnost ispitivanih vrsta

Svi analizirani izolati praćeni su kroz četiri faze rasta s ciljem određivanja proizvodnje domoične kiseline (DK). Od osam vrsta (ovdje se mogu navesti sve vrste) roda *Pseudo-nitzschia* obuhvaćenih ovim istraživanjem, samo je *P. pseudodelicatissima* pri standardnim uvjetima proizvodila mjerljive količine DK. Izolati vrste *P. pseudodelicatissima* dobiveni su iz uzoraka prikupljenih tijekom razdoblja u kojem su u dagnjama zabilježene mjerljive koncentracije DK, što je upućivalo na moguću prisutnost toksičnih izolata roda *Pseudo-nitzschia* na istraživanom području. Dosada, DK u školjkašima srednjeg Jadrana povezivani su s pojavom roda *Pseudo-nitzschia*, no vrsta odgovorna za proizvodnju toksina nije bila jednoznačno utvrđena. U sjevernom Jadranu DK u školjkašima zabilježena je nakon cvatnje *P. calliantha* (Marić Pfannkuchen i sur. 2011), dok je u srednjem Jadranu DK zabilježena u školjkašima i planktonskim mrežnim uzorcima tijekom cvatnje roda *Pseudo-nitzschia*, uz istovremenu prisutnost više potencijalno toksičnih vrsta (Arapov i sur., 2016). Proizvodnja DK naknadno je potvrđena u kulturama *P. calliantha* izoliranim iz srednjeg Jadrana (Arapov i sur., 2020).

Prethodna istraživanja ukazuju na značajnu varijabilnost u proizvodnji DK kod vrste *P. pseudodelicatissima* ovisno o temperaturi uzgoja. Izolat iz sjevernog Jadrana i uzgajan pri 16 °C pokazao je niže vrijednosti DK (Tanković i sur., 2022). Slično tome, Lapworth, i sur., 2001 zabilježili su proizvodnju toksina u samo jednoj od pet staničnih kultura izoliranih iz australskih voda i uzgajanih pri 14 °C. Nasuprot tome, svih šest izolata iz Solunskog zaljeva (Grčka) proizvodilo je DK pri 19 °C (Moschandreou i sur., 2010), dok izolati uzgajani pri višim temperaturama, poput 20 °C (Napuljski zaljev) i 24 °C (Danski prolaz), nisu pokazali proizvodnju DK (Lundholm i sur., 2003; Orsini i sur., 2002). U standardnim uvjetima svi analizirani izolati vrste *P. pseudodelicatissima* uzgajani su pri 18 °C, pri čemu je DK potvrđena kod 11 od 12 izolata. Zbog toga se u ovom dijelu istraživanja ne može izravno procijeniti temperaturni učinak na proizvodnju DK među izolatima. Ipak, kasniji eksperiment s izmijenjenim uvjetima pokazao je da izolat K357ps proizvodi DK i pri 14 °C, što upućuje na to da toksičnost ove vrste nije ograničena samo na uvjete od 18 °C.

Osim temperature, i drugi okolišni i fiziološki čimbenici, poput dostupnosti hranjivih tvari, svjetlosnih uvjeta i sezonske varijabilnosti, mogu značajno utjecati na biosintezu toksina (Lelong i sur., 2012). Međutim, vrsta *P. pseudodelicatissima* još uvijek nije dovoljno istražena u različitim okolišnim uvjetima te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se bolje razumjela njezina toksičnost (Lelong i sur., 2012).

U ovom dijelu istraživanja pri standardnim uvjetima uzgoja izolat vrste *P. pseudodelicatissima* K357ps pokazao je najveću proizvodnju toksina, zabilježenu u fazi odumiranja pri relativno visokoj gustoći stanica. Nadalje, ukupno devet od jedanaest izolata proizvodilo je DK tijekom faze odumiranja, što je u skladu s rezultatima Moschandreou i Nikolaidis, 2010, koji su također zabilježili sintezu toksina kod *P. pseudodelicatissima* u toj fazi rasta.

Suprotno tome, prethodna istraživanja ukazuju na drugačije obrasce produkcije toksina kod drugih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Tako je primjerice *P. calliantha* izolirana iz srednjeg Jadrana pokazala najviše vrijednosti toksina u ranoj fazi rasta, uz najnižu gustoću stanica (Arapov i sur., 2020). Slično tome, sojevi *P. multistriata* iz sjevernog Jadrana proizvodili su DK u ranoj fazi rasta, također pri nižoj gustoći stanica (Turk Dermastia i sur., 2022). U ovom dijelu istraživanja nije utvrđen jednoznačan odnos između brojnosti stanica i proizvodnje DK tijekom analiziranih faza rasta. Naime, proizvodnja toksina zabilježena je i pri niskoj brojnosti stanica u ranoj fazi rasta, dok visoka brojnost stanica u stacionarnoj fazi nije nužno bila povezana s višim vrijednostima DK.

Otprije je poznato da proizvodnja DK varira ne samo između različitih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*, nego i između sojeva unutar iste vrste. Primjerice, Thessen i sur. (2009) utvrdili su toksičnost u samo dva od devet izolata *P. calliantha* i dva od pet izolata *P. fraudulentata*. Nadalje, različite vrste i izolati mogu pokazivati različite obrasce produkcije toksina, pri čemu neki započinju sintezu DK tijekom eksponencijalne faze rasta, dok drugi povećavaju proizvodnju u stacionarnoj fazi, često kao odgovor na ograničenje hranjivih tvari ili druge okolišne stresne čimbenike. Ove varijacije naglašavaju složenost biosinteze DK i upućuju na utjecaj fizioloških i okolišnih čimbenika (Bates i sur., 2018).

U skladu s rezultatima ovog istraživanja, Percopo i sur. (2022) nisu zabilježili proizvodnju DK kod analiziranih izolata vrste *P. allochrysa*. Također, izolati *P. mannii* nisu pokazali proizvodnju toksina, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Amato i Montresor, 2008; Hlaili i sur., 2016; Percopo i sur., 2022; Quijano-Scheggia i sur., 2010).

Suprotno rezultatima ovog istraživanja, u kojima sojevi *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulentata*, *P. galaxiae* i *P. multistriata* nisu proizvodili mjerljive količine DK, brojna istraživanja potvrđuju proizvodnju toksina DK kod ovih vrsta. Međutim, ove se vrste općenito smatraju slabo ili varijabilno toksičnima te ne proizvode nužno DK u svim uvjetima, što može objasniti razlike među istraživanjima. Proizvodnja DK može se mijenjati ovisno o dostupnosti hranjivih tvari, osobito silikata, fosfata i dušika, temperaturi, intenzitetu svjetlosti, salinitetu i fazi rasta. Stoga izostanak mjerljive proizvodnje DK u analiziranim izolatima ne isključuje njihov toksikološki potencijal, nego upućuje na to da se proizvodnja toksina kod ovih vrsta može aktivirati samo u određenim okolišnim ili eksperimentalnim uvjetima. Proizvodnja DK prethodno je zabilježena kod *P. calliantha* (Arapov i sur., 2020; Hlaili i sur., 2016; Tanković i sur., 2022); *P. delicatissima* (Turk Dermastia i sur. 2022; Fernandes i sur., 2014; Penna i sur., 2013; Sahraoui i sur., 2011; Tanković i sur., 2022); *P. fraudulentata* (Fernandes i sur., 2014; Lema i sur., 2017; Tatters, i sur., 2012); *P. galaxiae* (Turk Dermastia i sur., 2022; Moschandreu i sur., 2012); *P. multistriata* (Turk Dermastia i sur., 2022; Orsini i sur., 2002; Pistocchi i sur., 2012).

4.2 Analiza staničnih kultura pri izmijenjenim uzgojnim uvjetima

4.2.1 Dinamika rasta pri izmijenjenim uzgojnim uvjetima

U ovom istraživanju analizirana je dinamika rasta četiri vrste roda *Pseudo-nitzschia* (*P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima*, *P. multistriata* i *P. multiseriata*) pri izmijenjenim uvjetima uzgoja. Izolati *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima* i *P. multistriata* su izolirani iz hrvatskog dijela Jadranskog mora, dok izolat *P. multiseriata* potječe iz Turske. Vrste su odabrane s obzirom na njihovu zastupljenost u Jadranskom moru i toksični potencijal. *P. pseudodelicatissima* odabrana je jer je bila jedina vrsta kod koje je u prvom dijelu ovog istraživanja potvrđena proizvodnja DK. *P. delicatissima* čest je predstavnik zajednice roda *Pseudo-nitzschia* na istraživanim područjima, a toksičnost vrste je prethodno potvrđena u Jadranskom moru (Penna i sur., 2013; Tanković i sur., 2022; Turk Dermastia i sur., 2022). *P. multistriata* također je zabilježena u Jadranskom moru, a prethodna istraživanja potvrdila su njezinu sposobnost proizvodnje DK i izražen toksični potencijal pojedinih izolata (Turk Dermastia i sur., 2022). *P. multiseriata* uključena je kao izrazito toksična vrsta povezana s prvim opisanom slučajem amnezijskog trovanja školjkašima. Njezina potvrda u Mramornom moru važna je i u širem mediteranskom kontekstu jer ukazuje na potrebu praćenja mogućeg širenja ove vrste prema povezanim morskim područjima, uključujući Jadransko more (Bates, 1989; Sezgin i sur., 2025).

Sve analizirane vrste pokazale su porast fluorescencijskog signala i brojnosti stanica tijekom eksperimenta, što potvrđuje da su kulture bile fiziološki aktivne u ispitivanim uvjetima.

Međutim, vrste su se razlikovale u dinamici rasta, najvišoj brojnosti i odgovoru na nutritivne tretmane, što upućuje na različitu prilagodbu pojedinih vrsta na izmijenjene uvjete uzgoja.

Ovaj dio istraživanja predstavlja integrirano ispitivanje dinamike rasta i toksičnosti odabranih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* tijekom eksperimentalnog uzgoja, pri čemu su istodobno razmatrani učinci temperature, dostupnosti hranjivih tvari i faze rasta staničnih kultura. Takav pristup je važan jer odgovor vrsta *Pseudo-nitzschia* na promjene okolišnih uvjeta nije određen samo jednim čimbenikom, nego proizlazi iz njihove međusobne interakcije te iz fiziološkog stanja kulture u određenoj fazi rasta (Lelong i sur., 2012).

Usporedba između ispitivanih vrsta pokazala je da se najveća brojnost nije javljala u istim uvjetima kao i najveća stopa rasta. To pokazuje da pojedini pokazatelji rasta opisuju različite komponente dinamike stanične kulture. Fluorescencijski signal odražava ukupnu promjenu gustoće stanica i fiziološkog stanja stanične kulture tijekom eksperimenta, dok stopa rasta opisuje najveći relativni porast tijekom ekspanzijske faze. Zbog toga tretman u kojem je zabilježena najveća stopa rasta ne mora nužno biti isti tretman u kojem su zabilježene najviše vrijednosti fluorescencije ili gustoće stanica. Ovakav obrazac osobito je bio izražen kod vrste *P. multistriata*, kod koje je tretman T7 dosezao najviše prosječne i maksimalne vrijednosti fluorescencije, dok je najveća stopa rasta zabilježena u tretmanu T4 pri 18 °C (Tablica 4.1).

Tablica 4.1 Utjecaj ispitivanih nutritivnih tretmana i temperature na rast analiziranih izolata roda *Pseudo-nitzschia*.

Vrsta	Utjecaj tretmana	Utjecaj temperature	Zaključak za rast
<i>P. pseudodelicatissima</i>	T3 je imao značajno niži RFU od kontrole i ostalih tretmana, a pri 14 °C zabilježena je i najniža stopa rasta. T4 je imao najviše stope rasta pri obje temperature.	Ukupni RFU bio je viši pri 18 °C, ali su stope rasta u T1, T2 i T4 bile više pri 14 °C.	Samostalno smanjenje silikata najviše je ograničilo rast, dok kombinirano smanjenje fosfata i silikata nije djelovalo jednako negativno.
<i>P. delicatissima</i>	T3 je imao značajno niži RFU od kontrole, dok se T2 i T4 nisu značajno razlikovali od T1. Pri 18 °C svi nutritivni tretmani imali su niže stope rasta od kontrole.	RFU je ukupno bio viši pri 18 °C, ali su razlike u stopama rasta među temperaturama bile male i ovisile o tretmanu.	Smanjena dostupnost silikata dala je najjasnije negativno odstupanje, dok je učinak ostalih tretmana bio slabiji.
<i>P. multistriata</i>	T7 je imao značajno viši RFU od kontrole, dok ostali tretmani nisu značajno odstupali od T1. Najviša stopa rasta zabilježena je u T4 pri 18 °C.	Učinak temperature ovisio je o tretmanu; većina tretmana imala je više stope rasta pri 18 °C.	Izmijenjeni nutritivni uvjeti nisu nužno ograničili rast, a viša temperatura pogodovala je stopi rasta u većini tretmana.
<i>P. multiseriis</i>	Glavni učinak tretmana na RFU nije bio značajan, ali su pri 18 °C svi nutritivni tretmani imali niže stope rasta od kontrole.	RFU je bio viši pri 18 °C u svim tretmanima, dok se učinak temperature na stopu rasta razlikovao među tretmanima.	Temperatura je snažno povećala fluorescencijski signal, ali viši RFU nije uvijek bio praćen višom stopom rasta.

4.2.1.1 Usporedba rasta među analiziranim vrstama

Najveća brojnost zabilježena je za vrstu *P. delicatissima* u tretmanu T1 pri 18 °C, zatim kod *P. pseudodelicatissima* u tretmanu T4 pri 14 °C. S druge strane, vrste *P. multistriata* i *P. multiseriis* ostvarile su niže maksimalne brojnosti. Dobivene vrijednosti gustoće stanica usoredive su s vrijednostima dobivenim u analizi staničnih kultura pri standardnim uvjetima pri kojima je također vrsta *P. delicatissima* postigla najveću brojnost. Kod tri od četiri analizirane vrste najveće brojnosti zabilježene su u nekom od tretmana sa smanjenom dostupnošću hranjivih tvari, dok je kod *P. delicatissima* najveća brojnost zabilježena u kontrolnom tretmanu. Međutim, veća brojnost u pojedinim tretmanima sa smanjenom dostupnošću hranjivih tvari ne znači nužno da takvi uvjeti potiču brži rast. Vjerojatnije je da dobivene razlike odražavaju različit odgovor pojedinih vrsta na kombinacije nutritivnih tretmana. Slični rezultati zabilježeni su i u prethodnim istraživanjima, u kojima se brojnost stanica mijenjala ovisno o vrsti i dostupnosti pojedinih hranjivih tvari, bez jedinstvenog obrasca za sve tretmane (Pan i sur., 1996a).

Najviša vrijednost stope rasta u cijelom eksperimentu zabilježena je za vrstu *P. multistriata* u tretmanu T4 pri 18 °C, dok je za vrstu *P. pseudodelicatissima* najviša vrijednost zabilježena u tretmanu T4 pri 14 °C, za *P. delicatissima* u tretmanu T2 pri 14 °C, a za *P. multiseriis* u kontrolnom tretmanu pri 18 °C. Najniže vrijednosti stope rasta zabilježene su za vrstu *P. multiseriis* u tretmanu T4 pri 18 °C te za vrstu *P. pseudodelicatissima* u tretmanu T3 pri 14 °C. Ovaj obrazac pokazuje da pojedini tretmani mogu ograničiti lokalnu maksimalnu brzinu diobe, čak i kada ukupna fluorescencija ostaje relativno visoka. Relativno niska stopa rasta za *P. multiseriis* zabilježena je u ovom istraživanju za razliku od prethodnih istraživanja gdje su zabilježene više vrijednosti do 1,12 dan⁻¹ (Lundholm i sur., 2004; Martin-Jézéquel i sur., 2015). No, to se može objasniti činjenicom da je korištena stanična kultura dugotrajno održavana u laboratorijskim uvjetima te izolirana nekoliko godina prije eksperimenta. Produljeni uzgoj u kontroliranim uvjetima može utjecati na fiziološko stanje stanične kulture, uključujući stopu rasta i metaboličku aktivnost (Lakeman i sur., 2009; Lelong i sur., 2014).

Temperatura se pokazala kao važan čimbenik koji regulira rast istraživanih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Kod svih analiziranih izolata LMM analiza pokazala je značajan učinak temperature na fluorescencijski signal, pri čemu su ukupne vrijednosti bile više pri 18 °C nego pri 14 °C. Taj je učinak bio osobito izražen kod izolata *P. multiseriis*. Međutim, isti obrazac nije dosljedno zabilježen za sve pokazatelje rasta. Kod pojedinih izolata veće brojnosti stanica ili više stope rasta zabilježene su pri 14 °C ili su ovisile o nutritivnom tretmanu. Primjerice, kod vrste *P. pseudodelicatissima* više stope rasta u većini tretmana zabilježene su pri 14 °C, kod *P. delicatissima* najviša stopa rasta zabilježena je u T2 pri 14 °C, dok je kod *P. multistriata* najviša stopa rasta pri 18 °C bila zabilježena u tretmanu T4. Takvo razilaženje između fluorescencijskog signala, brojnosti stanica i stope rasta pokazuje da temperatura nije djelovala kao samostalan i jednoznačan pokretač rasta, nego kao čimbenik čiji se učinak ostvaruje ovisno vrsti, nutritivnom tretmanu i fiziološkom stanju kulture. Dosadašnja istraživanja pokazala su da temperatura utječe na stope rasta morskog fitoplanktona, ali se odgovor pojedinih vrsta razlikuje ovisno o njihovim biološkim značajkama i drugim okolišnim uvjetima (Bissinger i sur., 2008). Za vrstu *P. australis* stopa

rasta povećavala se do temperaturnog optimuma, koji se ovisno o intenzitetu svjetlosti kretao između 13,5 i 18,6 °C, a zatim je pri višim temperaturama opadala (Thorel i sur., 2014). U prirodnim populacijama Mramornog mora cvjetanja vrsta *P. calliantha* i *P. pungens* zabilježena su pri temperaturama od 9 do 15 °C, što pokazuje da najveće brojnosti nisu nužno povezane s najvišim temperaturama (Tas i Lundholm, 2017). Povišenje temperature unutar raspona povoljnog za određenu vrstu može povećati stopu rasta, ali taj odgovor ovisi i o svjetlosti i dostupnosti hranjivih tvari (Edwards i sur., 2016). To je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, u kojem učinak temperature nije bio jednak među vrstama i nutritivnim tretmanima.

U kontekstu klimatskih promjena, porast temperature mora, promjene u stratifikaciji vodenog stupca i dostupnosti hranjivih tvari mogu utjecati na sastav fitoplanktonske zajednice i uvjete pogodne za razvoj pojedinih štetnih vrsta (Gobler, 2020). Taj je odgovor dodatno uvjetovan dostupnošću hranjivih tvari, pa povećane metaboličke potrebe pri višoj temperaturi ne moraju dovesti do veće stope rasta ili brojnosti stanica (Boyd i sur., 2013).

No, budući da su u ovom istraživanju ispitane dvije temperature, 14 °C i 18 °C, dobiveni rezultati prikazuju odgovor vrsta roda *Pseudo-nitzschia* samo unutar ograničenog temperaturnog raspona. U sjevernom i srednjem Jadranu temperatura obalnih voda pokazuje izraženu sezonsku promjenjivost, s vrijednostima od približno 7 °C zimi do 27 °C ljeti, dok su dublje vode temperaturno stabilnije i kreću se približno od 10 °C zimi do 18 °C ljeti (Russo i sur., 2012).

4.2.1.2 Dinamika rasta *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*

Izolat *P. pseudodelicatissima* pokazao je jasan negativan odgovor u tretmanu T3, odnosno pri smanjenoj dostupnosti silikata. Tretman T3 imao je najniže maksimalne i prosječne vrijednosti fluorescencije pri obje temperature, a post-hoc usporedbe procijenjenih marginalnih sredina pokazale su da je fluorescencijski signal u T3 bio značajno niži nego u T1, T2 i T4. Takav obrazac, zajedno s nižim brojnostima stanica i nižom stopom rasta, upućuje na to da je smanjena dostupnost silikata bila povezana sa slabijim rastom ovog izolata. Budući da su dijatomeje ovisne o siliciju za izgradnju silicificirane stanične stijenke, smanjena dostupnost silikata može izravno utjecati na staničnu diobu i fiziologiju rasta (Pan, i sur., 1996a; Trainer i sur., 2012). Kombinirani tretman T4, u kojem su istodobno smanjeni silikat i fosfat, nije pokazao isti negativan obrazac kao samostalno smanjenje silikata u T3. Naprotiv, u T4 su zabilježene najviše prosječne vrijednosti fluorescencije pri obje temperature, visoke brojnosti stanica i najveće stope rasta. Takav rezultat upućuje na to da odgovor stanične kulture nije ovisio samo o smanjenju pojedinog nutrijenta, nego i o njihovom međusobnom omjeru. Brzezinski (1985) pokazao je da se omjeri silicija, ugljika i dušika razlikuju među vrstama dijatomeja te se mogu mijenjati ovisno o uvjetima uzgoja, što upućuje na različite nutritivne potrebe pojedinih vrsta. U okolišnom istraživanju zaljeva Seine Thorel i sur. (2017) utvrdili su da su visoke vrijednosti DK bile povezane s prisutnošću vrste *P. australis* i mogućim ograničenjem silikata, odnosno niskim omjerom Si:N. Ovi rezultati

podupiru zaključak da učinak nutritivnih uvjeta ne ovisi samo o koncentraciji pojedinog nutrijenta, nego i o njegovu odnosu s drugim hranjivim tvarima.

4.2.1.3 Dinamika rasta *Pseudo-nitzschia delicatissima*

Za vrstu *P. delicatissima* temperatura i tretman imali su statistički značajan učinak na fluorescencijski signal, dok su se brojnost stanica i stopa rasta mijenjale ovisno o kombinaciji temperature i nutritivnog tretmana. Najjasnije odstupanje od kontrole zabilježeno je u tretmanu T3, koji predstavlja smanjenu dostupnost silikata. U tom je tretmanu fluorescencijski signal bio statistički značajno niži nego u T1, T2 i T4, a stope rasta bile su niže od kontrolnih vrijednosti pri obje temperature. Takav rezultat upućuje na to da je smanjena dostupnost silikata bila najizraženiji ograničavajući čimbenik rasta ovog izolata. Za razliku od T3, smanjena dostupnost fosfata u tretmanu T2 nije pokazala jednako izražen negativan učinak. Pri 14 °C upravo je T2 imao najvišu stopu rasta, dok je pri 18 °C stopa rasta u istom tretmanu bila niža nego u kontroli. To pokazuje da učinak smanjene dostupnosti fosfata nije bio jednak pri obje temperature i da se ne može tumačiti kao jednoznačno ograničavajući za rast. Ovi rezultati mogu se povezati s podacima iz sjevernog Jadrana, gdje je kompleks vrste *P. delicatissima* često zabilježen u uvjetima nižih koncentracija fosfata (Turk Dermastia i sur., 2020).

Razlike u odgovoru na fosfatno i silikatno ograničenje ukazuju da pojedine hranjive tvari različito reguliraju komponente rasta vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima*. Fosfatno ograničenje izravno utječe na metabolizam i stopu rasta, dok se učinci silikatnog ograničenja primarno očituju kroz promjene u fiziologiji stanica, bez nužno proporcionalnog smanjenja rasta (Pan i sur., 1996b; Tatters i sur., 2012).

4.2.1.4 Dinamika rasta *Pseudo-nitzschia multistriata*

Za vrstu *P. multistriata* temperatura i tretman imali su statistički značajan učinak na fluorescencijski signal, a značajna je bila i interakcija tretmana i temperature. To pokazuje da učinak nutritivnih tretmana nije bio jednak pri 14 °C i 18 °C. Izražen učinak temperature vidljiv je i iz stopa rasta, koje su u svim nutritivnim tretmanima T2–T7 bile više pri 18 °C nego pri 14 °C. Jedino je u kontrolnom tretmanu T1 stopa rasta bila nešto viša pri 14 °C. U većini tretmana vrijednosti fluorescencije bile su više pri 18 °C nego pri 14 °C, dok je kontrolni tretman T1 imao nešto viši signal pri 14 °C. U odnosu na kontrolu, statistički značajno odstupanje zabilježeno je samo u tretmanu T7, koji je imao viši fluorescencijski signal od T1. Ostali tretmani nisu pokazali statistički značajno odstupanje od kontrole, iako su se opisno razlikovali u fluorescencijskom signalu, brojnosti stanica i stopi rasta. Iako je T7 predstavljao najizraženije kombinirano smanjenje dostupnosti fosfata i silikata, taj tretman nije ograničio rast vrste *P. multistriata*. Naprotiv, bio je povezan s najvišim vrijednostima fluorescencije i najvećim brojnostima stanica. Najviša stopa rasta zabilježena je u tretmanu T4 pri 18 °C, što pokazuje da viša temperatura u kombinaciji s određenim nutritivnim

uvjetima nije ograničila rast ovog izolata. Prema tome, odgovor vrste *P. multistriata* nije ovisio samo o smanjenju pojedinog nutrijenta, nego o zajedničkom učinku nutritivnog tretmana i temperature.

Važnost temperature za dinamiku vrste *P. multistriata* zabilježena je i u prirodnim populacijama sjeverozapadnog Japanskog mora. Utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost između temperature vode i brojnosti ove vrste, dok je dugoročno zatopljenje navedeno kao jedan od mogućih čimbenika promjene sastava cvjetajućih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Budući da je riječ o okolišnom istraživanju, taj odnos ne potvrđuje izravno uzročno djelovanje temperature, ali podupire zaključak da ona može sudjelovati u regulaciji dinamike vrste *P. multistriata* (Stonik, 2021).

4.2.1.5 Dinamika rasta *Pseudo-nitzschia multiseriis*

Analizom stanične kulture *P. multiseriis* utvrđen je značajan učinak temperature na fluorescencijski signal, pri čemu su prosječne vrijednosti RFU-a bile više pri 18 °C. Međutim, taj se temperaturni učinak nije jednako odrazio na stope rasta. Najviša stopa rasta zabilježena je u kontrolnom tretmanu T1 pri 18 °C, dok je u tretmanima T2 i T4 bila niža pri 18 °C nego pri 14 °C, a u T3 je bila jednaka pri obje temperature. Razlike u stopama rasta općenito su bile male, pa se na temelju ovog pokazatelja ne može zaključiti da je viša temperatura jednoznačno pogodovala rastu vrste *P. multiseriis*. Rezultati prije upućuju na to da je odgovor stanične kulture ovisio o kombinaciji temperature i dostupnosti hranjivih tvari, pri čemu je kombinirano nutritivno ograničenje u T4 pri 18 °C bilo povezano s najnižom stopom rasta. Ispitivana stanična kultura *P. multiseriis* je izvorno izolirana s područja Turske, iz Mramornog mora odnosno istočnog Mediterana (Sezgin i sur., 2025). No, s obzirom na trendove zagrijavanja mora i promjene u cirkulaciji i nutrijentnom režimu, širenje vrsta roda *Pseudo-nitzschia*, uključujući *P. multiseriis*, prema novim područjima postaje sve vjerojatnije. Klimatske promjene, osobito porast temperature mora, prepoznate su kao ključni čimbenik koji može potaknuti pojavu i učestalost štetnih cvjetanja, uključujući vrste ovog roda (Hallegraeff, 2010; Trainer i sur., 2012). Zbog navedenih činjenica vrsta *P. multiseriis* je uključena u ovo istraživanje.

Sveukupno, rezultati pokazuju da rast analiziranih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* pri izmijenjenim uvjetima nije bio jednak među vrstama, nego je ovisio o kombinaciji nutritivnog tretmana i temperature. Smanjena dostupnost silikata u tretmanu T3 najjasnije je ograničila rast vrsta *P. pseudodelicatissima* i *P. delicatissima*, dok učinak kombiniranih tretmana nije bio jednak među analiziranim vrstama. Za vrstu *P. multistriata* tretman T7 nije djelovao negativno, nego je bio povezan s najvišom fluorescencijom i najvećim brojnostima. Dok je temperatura je povećavala fluorescencijski signal. Stoga se odgovor rasta ne može tumačiti samo kroz jedan čimbenik, nego kroz zajednički učinak temperature, dostupnosti hranjivih tvari i razlika među analiziranim vrstama..

4.2.2 Toksičnost pri izmijenjenim uvjetima rasta

U ovom istraživanju proizvodnja domoične kiseline (DK) analizirana je kroz različite faze rasta staničnih kultura, temperaturne uvjete i nutritivne tretmane. Od četiri vrste analizirane pri izmijenjenim uvjetima uzgoja, mjerljivu proizvodnju DK pokazale su dvije: *P. pseudodelicatissima* i *P. multiseriis*. Za vrste *P. delicatissima* i *P. multistriata* DK nije zabilježena ni u jednom analiziranom tretmanu ni temperaturnom uvjetu. Vrijednosti DK po stanici znatno su se razlikovale između dviju vrsta kod kojih je potvrđena proizvodnja toksina. Za vrstu *P. pseudodelicatissima* vrijednosti su bile niže i kretale su se od 0,001071 do 0,005823 pg stanica⁻¹, dok su za vrstu *P. multiseriis* bile znatno više, u rasponu od 0,42 do 10,15 pg stanica⁻¹ (Tablica 4.2).

Tablica 4.2 Sažetak proizvodnje domoične kiseline kod toksičnih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u različitim temperaturnim i nutritivnim uvjetima.

Vrsta	Raspon prosječne DK (pg stanica ⁻¹)	Najveća vrijednost DK	Glavni učinak temperature	Glavni učinak tretmana
<i>P. pseudodelicatissima</i>	0,001071-0,005823	T3, 14 °C, faza 4	Učinak temperature ovisio je o fazi rasta; pri 18 °C DK je bila viša u fazi 2, a pri 14 °C u fazi 4.	T2 i T3 imali su značajno više vrijednosti DK od T1 i T4.
<i>P. multiseriis</i>	0,420-10,146	T4, 18 °C, faza 4	Viša temperatura bila je povezana s višim vrijednostima DK.	T2 i T4 imali su značajno više vrijednosti DK od T1 i T3.

U usporedbi s prvim dijelom istraživanja pri standardnim uvjetima uzgoja, u kojem je isti izolat *P. pseudodelicatissima* K357ps dosezao vrijednosti do 0,0250 pg stanica⁻¹, u eksperimentu s izmijenjenim uvjetima najveća zabilježena vrijednost bila je 0,005823 pg stanica⁻¹. Proizvodnja DK bila je nekoliko puta niža, unatoč primjeni različitih temperaturnih i nutritivnih uvjeta. Jedno od mogućih objašnjenja jest vremenski odmak između dviju analiza i dugotrajnije održavanje izolata u laboratorijskoj kulturi. Smanjenje toksičnosti tijekom vremena u kulturi prethodno je zabilježeno kod pojedinih izolata roda *Pseudo-nitzschia*, iako takav obrazac nije jednak kod svih vrsta i izolata (Fernandes i sur., 2014). Stoga se niža proizvodnja DK kod izolata K357ps ne može sa sigurnošću pripisati samo eksperimentalnim uvjetima, nego može odražavati i promjene u staničnoj kulturi tijekom dugotrajnog laboratorijskog održavanja.

Kod obje toksične vrste najniže vrijednosti DK zabilježene su u eksponencijalnim fazama rasta, odnosno u razdoblju intenzivne diobe stanica. Kod *P. pseudodelicatissima* vrijednosti DK u kasnoj eksponencijalnoj fazi bile su niske i kretale su se približno od 0,001071 do 0,003294 pg stanica⁻¹. Više vrijednosti zabilježene su u kasnijim fazama rasta, osobito u fazi odumiranja, u kojoj je kod *P. pseudodelicatissima* najveća prosječna vrijednost iznosila 0,005823 pg stanica⁻¹ u tretmanu T3 pri 14 °C. Kod *P. multiseriis* najveća vrijednost DK

također je zabilježena u fazi odumiranja, ali pri 18 °C i u znatno većem iznosu, do 10,146 pg stanica⁻¹.

U prethodnim istraživanjima vrste *P. pseudodelicatissima* najviše vrijednosti DK zabilježene su u stacionarnoj fazi rasta (Moschandreou i sur., 2010). Ipak, u istraživanjima roda *Pseudo-nitzschia* proizvodnja DK često se ne prati kroz cijeli ciklus rasta, nego se analizira u jednoj fazi ili u ograničenom broju vremenskih točaka. Primjerice, kod *P. pungens* uzorci za analizu DK uzimani su u ranoj stacionarnoj fazi (Accoroni i sur., 2020). Sličan eksperimentalni pristup primjenili su i Turk Dermastia i sur. (2022), u čijem je istraživanju toksičnost izolata roda *Pseudo-nitzschia* analizirana u stacionarnoj fazi rasta. Zbog toga praćenje proizvodnje DK kroz više faza rasta u ovom istraživanju omogućuje bolji uvid u promjene toksičnosti tijekom rasta stanične kulture.

4.2.2.1 Toksičnost *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*

Tretmani T2 i T3, koji predstavljaju smanjenu dostupnost fosfata odnosno silikata, imali su značajno više DK vrijednosti u odnosu na kontrolni tretman T1 i kombinirani tretman T4 za ispitivanu vrstu *P. pseudodelicatissima*. Iako se tretman T3 isticao najvišom prosječnom vrijednošću DK, razlika između T2 i T3 nije bila statistički značajna. Stoga se povećana proizvodnja DK kod *P. pseudodelicatissima* ne može pripisati isključivo silikatnom ograničenju, nego upućuje na to da pojedinačno smanjenje dostupnosti fosfata ili silikata može djelovati kao stresni čimbenik povezan s povećanom sintezom toksina. Kombinirani tretman T4 nije pokazao povišene vrijednosti DK u odnosu na kontrolu, što pokazuje da istodobno smanjenje dostupnosti fosfata i silikata nije imalo isti učinak kao njihovo pojedinačno smanjenje. Takav rezultat može biti povezan s promijenjenim omjerima hranjivih tvari i specifičnim fiziološkim odgovorom stanica na različite oblike nutritivnog stresa (Brzezinski, 1985). Prijašnja istraživanja pokazala su da nutritivni stres, osobito ograničenje fosfata i silikata, može potaknuti produkciju domoične kiseline kod pojedinih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. U uvjetima fosfatnog ili silikatnog ograničenja zabilježeno je povećanje staničnog sadržaja DK, osobito nakon usporavanja rasta i ulaska kulture u kasnije faze rasta, što se povezuje s fiziološkim stresom stanica (Pan i sur., 1996,1998). Takav odgovor nije jednak kod svih vrsta i izolata, nego ovisi o kombinaciji okolišnih čimbenika, uključujući dostupnost hranjivih tvari, temperaturu, svjetlost i fazu (Lelong i sur., 2012). Prethodna istraživanja pokazala su da nutritivni stres može značajno utjecati na proizvodnju DK za vrste roda *Pseudo-nitzschia*. Pan i sur (1996,1998) pokazali su da ograničena dostupnost silikata i fosfata može potaknuti promjene u proizvodnji DK, pri čemu se učinak pojedinog nutrijenta može razlikovati ovisno o vrsti, fiziološkom stanju stanica i uvjetima uzgoja. U prirodnim populacijama proizvodnja i akumulacija DK ovise o interakciji više čimbenika, uključujući sastav fitoplanktonske zajednice, dostupnost hranjivih tvari i fizikalne uvjete okoliša (Trainer i sur., 2012). Stoga i rezultate dobivene analizom staničnih kultura treba tumačiti kao odgovor na kombinaciju uvjeta uzgoja, a ne kao posljedicu samo jednog čimbenika.

Učinak temperature na proizvodnju DK kod vrste *P. pseudodelicatissima* razlikovao se ovisno o fazi rasta. Tijekom eksponencijalnog rasta viša temperatura bila je povezana s većom proizvodnjom DK, dok je u fazi odumiranja zabilježen suprotan trend.

4.2.2.2 Toksičnost *Pseudo-nitzschia delicatissima*

Za razliku od prethodne vrste, kod *P. delicatissima* domoična kiselina nije zabilježena ni u jednom uzorku, pri čemu su sve izmjerene vrijednosti bile ispod granice detekcije. Ovaj rezultat bio je dosljedan kroz sve tretmane i temperaturne uvjete, uključujući eksponencijalne faze rasta i fazu odumiranja. Ipak, prethodna istraživanja pokazuju da *P. delicatissima* može imati toksične izolate, ali najčešće s nižim vrijednostima DK. U sjeverozapadnom Jadranu Penna i sur. (2013) zabilježili su blago toksične izolate ove vrste, dok su Turk Dermastia i sur., (2022) u sjevernom Jadranu potvrdili i toksične i netoksične izolate *P. delicatissima*. S druge strane, Fehling i sur. (2005) opisali su netoksične izolate *P. delicatissima* pri različitim fotoperiodima, što potvrđuje da proizvodnja DK nije stalno izražena u svih izolata ove vrste.

4.2.2.3 Toksičnost *Pseudo-nitzschia multistriata*

Slično kao kod *P. delicatissima*, kod *P. multistriata* domoična kiselina nije zabilježena ni pri jednoj kombinaciji tretmana i temperature, iako je stanična kultura pokazivala visoke vrijednosti fluorescencije i povećanje brojnosti stanica. Ovakav rezultat pokazuje da rast u ispitivanim uvjetima nije bio povezan s proizvodnjom DK. Međutim, za *P. multistriata* su u literaturi zabilježeni toksični izolati, a proizvodnja DK može ovisiti o uvjetima uzgoja. Amato i sur. (2010) pokazali su da ograničena dostupnost silikata i fosfata te niska razina svjetlosti mogu povećati vrijednosti DK kod ove vrste, dok je viša temperatura smanjila proizvodnju toksina. Toksični izolati *P. multistriata* potvrđeni su i u sjevernom Jadranu, pri čemu su Turk Dermastia i sur., (2022) zabilježili proizvodnju DK kod pojedinih izolata, ali i netoksične izolate. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se proizvodnja DK razlikovala među analiziranim vrstama i izolatima te se mijenjala ovisno o uvjetima uzgoja. Takav je obrazac u skladu s prethodnim istraživanjima, koja također upućuju na izraženu varijabilnost toksičnosti unutar roda *Pseudo-nitzschia* (Bates i sur., 2018b; Trainer i sur., 2012). Ovakav rezultat posebno je važan u kontekstu Jadranskog mora, gdje je zabilježena velika raznolikost vrsta roda *Pseudo-nitzschia*, uz povremenu pojavu cvjetanja i postizanje visokih brojnosti pojedinih vrsta (Turk Demastia i sur., 2025).

4.2.2.4 Toksičnost *Pseudo-nitzschia multiseriis*

Proizvodnja domoične kiseline u vrste *P. mutiseriis* je zabilježena u širokom rasponu, od 0,0003 pg stanica⁻¹ do 21 pg stanica⁻¹ (Dong i sur., 2020; Nishimura i sur., 2021; Orlova i sur., 2008). U istraživanju koje su proveli Sezgin i sur., (2025), isti izolat *P. multiseriis*

analiziran je pri standardnim uvjetima uzgoja te je zabilježena proizvodnja DK u rasponu od 2,46 do 3,24 pg stanica⁻¹. Viša DK vrijednost je zabilježena u stacionarnoj fazi što je u skladu i s ovim istraživanjem (Sezgin i sur., 2025). Iako se radi o identičnoj staničnoj kulturi, u ovom istraživanju došlo je do biosinteze DK koja je više od tri puta veća od vrijednosti prethodno zabilježenih za isti izolat. Za razliku od *P. pseudodelicatissima*, kod *P. multiseris* nije uočen pad toksičnosti u odnosu na raniju analizu, nego su u pojedinim eksperimentalnim uvjetima vrijednosti DK bile više nego pri prethodnom uzgoju u standardnim uvjetima. Ispitivani izolat vrste *P. multiseris* proizveo je DK u rasponu od približno 0,42 do 10,15 pg stanica⁻¹. Najviše koncentracije zabilježene su u tretmanu T4 pri 18 °C u fazi 4, dok su i ostali tretmani pri toj temperaturi pokazivali visoke vrijednosti. Pri 14 °C vrijednosti su bile značajno niže bez izraženog porasta u kasnijim fazama rasta. Ovaj rezultat jasno ukazuje da je viša temperatura kod ispitivanog izolata bila povezana s povećanjem biosinteze DK. Prijašnja laboratorijska istraživanja pokazuju da viša temperatura može potaknuti proizvodnju DK, iako taj učinak ovisi o vrsti i uvjetima uzgoja. Kod *P. multiseris* Lewis i sur. (1993) pokazali su da se proizvodnje DK povećavala s porastom temperature. Slično tome, kod *P. seriata* sadržaj DK povećavao se s porastom temperature (Weber i sur., 2025), dok je kod *P. australis* učinak temperature ovisio i o dostupnosti hranjivih tvari te intenzitetu svjetlosti (Santiago-Morales i García-Mendoza, 2011; Thorel i sur., 2014)

4.2.2.5 Utjecaj temperature na proizvodnju DK

Osim laboratorijskih istraživanja, i terenska istraživanja upućuju na povezanost toplijih oceanografskih uvjeta i povećane toksičnosti. Na području sjeveroistočnog Pacifika povišene vrijednosti DK u školjkašima bile su povezane s razdobljima kada je temperatura površine mora bila viša od dugoročnog prosjeka za to područje, odnosno s pozitivnim temperaturnim anomalijama. Vrijednost od +1 °C znači da je temperatura mora bila za 1 °C viša od uobičajene prosječne temperature za isto mjesto i razdoblje, a takvi su uvjeti bili povezani s izraženijim toplim fazama Oceanic Niño Indexa (McKibben i sur., 2017). Autori pritom ne izdvajaju pojedinačne vrste roda *Pseudo-nitzschia*, nego razmatraju domoičnu kiselinu kao posljedicu prisutnosti toksičnih predstavnika toga roda u sustavu. U tom kontekstu, rezultati ovog istraživanja, u kojem su više vrijednosti DK pri 18 °C zabilježene kod dvije toksične vrste, mogu upućivati na to da povišena temperatura može povećati rizik od proizvodnje DK kod pojedinih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Međutim, takav zaključak treba tumačiti oprezno jer je istraživanje obuhvatilo ograničen broj vrsta i dvije temperaturne razine, 14 °C i 18 °C. Stoga se dobiveni rezultati ne mogu generalizirati na cijeli rod *Pseudo-nitzschia*, koji obuhvaća velik broj vrsta s različitim ekološkim i toksikološkim značajkama. Ipak, u kontekstu klimatskih promjena i zagrijavanja mora, ovi rezultati podupiru potrebu za daljnjim istraživanjima utjecaja temperature na rast i proizvodnju DK kod različitih vrsta i izolata roda *Pseudo-nitzschia* (Clark i sur., 2022; McKibben i sur., 2017; Zhu i sur., 2017).

Za vrstu *P. multiseris* najviše vrijednosti DK zabilježene su u tretmanu T4 pri 18 °C u fazi 4, što upućuje na to da kombinirano ograničenje hranjivih tvari, u uvjetima više temperature i kasne faze rasta, može dodatno pojačati biosintezu toksina. Sličan učinak nutritivnog stresa kod *P. multiseris* zabilježili su Tatters i sur., (2012) koji su ustanovili da ograničena

dostupnost hranjivih tvari može povećati proizvodnju DK. Autori Pan i sur. (1998) također su povezali proizvodnju DK kod *P. multiseriis* s fiziološkim stresom uzrokovanim ograničenom dostupnošću silikata i/ili fosfata. Općenito, Trainer i sur. (2012) su zaključili da je proizvodnja DK kod roda *Pseudo-nitzschia* često povezana s okolišnim stresom, ali da učinak pojedinih čimbenika ovisi o vrsti, izolatu i uvjetima okoliša.

4.2.2.6 Utjecaj smanjene dostupnosti hranjivih tvari na proizvodnju DK

Klimatske promjene ne utječu samo na temperaturu mora, već i na globalni ciklus svih hranjivih tvari pa tako i silicija, koji je ključan za rast dijatomeja. Promjene u kemijskom sastavu mora, osobito acidifikacija, mogu utjecati na procese otapanja i recikliranja biogenog silicija, odnosno na otapanje silikatnih frustula nakon odumiranja dijatomeja, remineralizaciju silicija u vodenom stupcu i sedimentu te ponovno vraćanje otopljenog silikata u površinske slojeve mora. Time se može promijeniti dostupnost silikata u eufotičkoj zoni, što dugoročno može utjecati na strukturu fitoplanktonskih zajednica (Taucher i sur., 2022; Tréguer i De La Rocha, 2013). Budući da je silicij jedan od ključnih nutrijenta za dijatomeje, uključujući vrste roda *Pseudo-nitzschia*, takve promjene mogu imati značajan utjecaj na njihov rast i fiziološki odgovor.

Rezultati ovog istraživanja dodatno podupiru važnost silicija kao ključnog čimbenika, budući da je smanjenje dostupnosti silikata bilo je povezano s promjenama u dinamici rasta, a kod toksičnih sojeva i s promjenama u proizvodnji domoične kiseline. Za vrstu *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* tretman sa smanjenim silikatom pokazao je najniže ukupne vrijednosti fluorescencije, ali istodobno i najvišu sintezu domoične kiseline u kasnijim fazama rasta, osobito u fazi odumiranja. Sličan obrazac povećane toksičnosti u kasnijim fazama rasta uočen je i kod *P. multiseriis*, gdje su najviše koncentracije domoične kiseline zabilježene pri višoj temperaturi i u fazi raspadanja stanica. Ovi rezultati upućuju na to da ograničenje silikata, osobito u kombinaciji s drugim stresnim čimbenicima poput povišene temperature, može biti povezano s pojačanom proizvodnjom toksina kod pojedinih toksičnih sojeva.

Smanjena dostupnost silicija u morskom ekosustavu mogla bi povećati učestalost fiziološkog stresa kod dijatomeja, čime se može potaknuti pojava i intenzitet toksičnih događaja. Međutim, rezultati ovog istraživanja također pokazuju da takav odgovor nije općenit, budući da kod izolata *P. delicatissima* i *P. multistriata* smanjenje dostupnosti silikata i povišena temperatura nisu potakli proizvodnju domoične kiseline. Time se potvrđuje da će potencijalni učinci klimatskih promjena na toksičnost roda *Pseudo-nitzschia* ovisiti o složenoj interakciji između dostupnosti hranjivih tvari, temperature te značajki pojedinih izolata.

Shodno tome, provedeno istraživanje, koje je obuhvatilo osam vrsta u standardnim uvjetima i detaljnu analizu četiriju odabranih vrsta pri izmijenjenim uvjetima uzgoja, pruža važnu osnovu za daljnje proširenje istraživanja uključivanjem dodatnih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* i šireg raspona temperatura. U Jadranskom moru dosad je potvrđeno pet toksičnih vrsta ovoga roda, a ovim su istraživanjem obuhvaćene tri od njih, čime je analiziran znatan dio poznatog toksičnog potencijala roda u Jadranu. Daljnja istraživanja mogla bi obuhvatiti temperaturni raspon koji odražava sezonske uvjete u Jadranu, približno od 10 do 26 °C, kao i dodatne

biotičke čimbenike, poput predacije. Budući da proizvodnja DK može ovisiti i o odnosima unutar hranidbene mreže, uključivanje takvih čimbenika omogućilo bi potpunije razumijevanje uvjeta koji pogoduju razvoju toksičnih populacija i pojavi toksičnih događaja u morskim ekosustavima.

5 Zaključci

Na temelju provedenih analiza rasta i proizvodnje domoične kiseline u staničnim kulturama vrsta roda *Pseudo-nitzschia* sa područja srednjeg Jadrana, razmotrene su hipoteze vezane uz toksičnost i stope rasta pri standardnim laboratorijskim uvjetima te pri izmijenjenim uvjetima temperature i dostupnosti hranjivih tvari.

Hipoteza 1.1, prema kojoj ne postoji razlika u toksičnosti između različitih ispitivanih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* pri standardnim laboratorijskim uvjetima, nije potvrđena. Od osam analiziranih vrsta, mjerljive količine domoične kiseline pri standardnim uvjetima proizvodila je samo *P. pseudodelicatissima*, dok kod ostalih vrsta DK nije bila zabilježena. Ovakav rezultat pokazuje da se toksičnost razlikovala među analiziranim vrstama te da proizvodnja DK nije opća značajka svih ispitivanih predstavnika roda *Pseudo-nitzschia*. Stoga se hipoteza 1.1 odbacuje.

Hipoteza 1.2, prema kojoj ne postoji razlika u toksičnosti unutar iste vrste tijekom različitih faza rasta stanične kulture, nije potvrđena. Kod *P. pseudodelicatissima* vrijednosti DK mijenjale su se kroz faze rasta, pri čemu su najniže vrijednosti zabilježene u eksponencijalnim fazama, a više vrijednosti u kasnijim fazama rasta, osobito u stacionarnoj fazi i fazi odumiranja. Time je potvrđeno da faza rasta ima važnu ulogu u proizvodnji DK kod ove vrste. Stoga se hipoteza 1.2 odbacuje za vrstu kod koje je proizvodnja DK bila mjerljiva.

Hipoteza 1.3, prema kojoj ne postoji razlika u toksičnosti ispitivane vrste s različitim područja, nije se mogla u potpunosti procijeniti za sve vrste jer je mjerljiva proizvodnja DK utvrđena samo kod izolata *P. pseudodelicatissima*, a svi toksični izolati te vrste potjecali su sa istog područja. Kod ostalih analiziranih vrsta DK nije bila zabilježena, neovisno o području izolacije. Stoga rezultati ne omogućuju usporedbu toksičnosti iste vrste među različitim područjima, nego upućuju na to da je u ovom istraživanju proizvodnja DK bila vezana uz određene izolate *P. pseudodelicatissima* iz jednog područja. Zbog toga se hipoteza 1.3 ne može jednoznačno odbaciti ni prihvatiti, već se može zaključiti da za njezinu pouzdaniju procjenu treba analizirati veći broj toksičnih i netoksičnih izolata iste vrste iz različitih područja.

Hipoteza 1.4, prema kojoj ne postoji razlika u stopi rasta između različitih ispitivanih vrsta, nije potvrđena. Analizirane vrste razlikovale su se u stopama rasta pri standardnim laboratorijskim uvjetima. Najviše vrijednosti zabilježene su kod *P. delicatissima*, zatim kod *P. pseudodelicatissima* i *P. mannii*, dok su ostale vrste pokazale niže vrijednosti rasta. Ovi rezultati pokazuju da sposobnost rasta nije bila jednaka među vrstama, nego je ovisila o biološkim značajkama pojedine vrste. Stoga se hipoteza 1.4 odbacuje.

Hipoteza 1.5, prema kojoj ne postoji razlika u stopi rasta unutar istih vrsta izoliranih s različitim područja, nije se mogla jednoznačno procijeniti za sve analizirane vrste. Kod dijela vrsta svi su izolati s istog područja, primjerice *P. allochroa* iz Šibenskog kanala, *P. fraudulenta* iz Kaštelanskog zaljeva, *P. multistriata* iz Šibenskog kanala i *P. pseudodelicatissima* iz Kaštelanskog zaljeva. Vrste koje su imale izolate s više područja broj

izolata po područjima nije bio ujednačen, što ograničava pouzdanu procjenu učinka područja izolacije na stopu rasta. Ipak, kod *P. delicatissima* i *P. mannii* najviše stope rasta zabilježene su kod pojedinih izolata iz Malostonskog zaljeva. Takav rezultat upućuje na moguće razlike među izolatima, ali zbog neujednačenog broja izolata po područjima nije moguće jasno odvojiti učinak područja od razlika među izolatima. Stoga se hipoteza 1.5 ne može jednoznačno odbaciti ni potvrditi, već rezultati upućuju na potrebu za dodatnim istraživanjima s većim i uravnoteženijim brojem izolata iste vrste iz različitih područja.

Hipoteza 2.1, prema kojoj ne postoji razlika u utjecaju promjene temperature na toksičnost ispitivanih vrsta pri izmijenjenim uvjetima, nije potvrđena. Najizraženiji učinak temperature zabilježen je kod *P. multiseriis*, kod koje su vrijednosti DK bile značajno više pri 18 °C nego pri 14 °C u svim fazama rasta. Kod *P. pseudodelicatissima* temperatura kao glavni učinak nije bila značajna, ali je učinak temperature ovisio o fazi rasta, pa su se razlike između 14 °C i 18 °C mijenjale tijekom razvoja kulture. Ovi rezultati pokazuju da učinak temperature na proizvodnju DK nije bio jednak kod obje toksične vrste, zbog čega se hipoteza 2.1 odbacuje.

Hipoteza 2.2, prema kojoj ne postoji razlika u utjecaju promjene dostupnosti hranjivih tvari na toksičnost ispitivanih vrsta, nije potvrđena. Drugim riječima, ispitivane vrste nisu jednako odgovorile na promijenjenu dostupnost hranjivih tvari. Kod vrste *P. pseudodelicatissima* tretmani sa smanjenom dostupnošću pojedinačnih hranjivih tvari, osobito fosfata i silikata, bili su povezani s višim vrijednostima DK, dok kombinirani tretman nije pokazao isti učinak. Suprotno tome, kod vrste *P. multiseriis* najviše vrijednosti DK zabilježene su u kombiniranom tretmanu smanjene dostupnosti hranjivih tvari. Stoga se hipoteza 2.2 odbacuje.

Hipoteza 2.3, prema kojoj ne postoji razlika u utjecaju promjene temperature na stopu rasta ispitivanih vrsta pri izmijenjenim uvjetima, nije potvrđena. Stope rasta nisu se jednako mijenjale između 14 °C i 18 °C kod svih analiziranih vrsta. Kod *P. pseudodelicatissima* više stope rasta uglavnom su zabilježene pri 14 °C, dok su kod *P. delicatissima* razlike između temperatura bile manje izražene i ovisile su o tretmanu. Kod *P. multistriata* većina tretmana imala je više stope rasta pri 18 °C. Kod *P. multiseriis* najviša stopa rasta zabilježena je u kontrolnom tretmanu pri 18 °C, dok su nutritivni tretmani pri istoj temperaturi imali niže vrijednosti od kontrole. LMM analiza fluorescencijskog signala dodatno je pokazala značajan učinak temperature kod svih analiziranih izolata, ali se taj učinak nije uvijek jednako odrazio na stope rasta i brojnost stanica. Stoga se učinak temperature na rast ne može tumačiti jednoznačno, nego ovisi o vrsti i nutritivnom tretmanu, zbog čega se hipoteza 2.3 odbacuje.

Hipoteza 2.4, prema kojoj ne postoji razlika u utjecaju promjene dostupnosti hranjivih tvari na stopu rasta ispitivanih vrsta pri izmijenjenim uvjetima, nije potvrđena. Stope rasta nisu imale jednak odgovor na nutritivne tretmane kod svih analiziranih vrsta. Kod *P. pseudodelicatissima* kombinirani tretman smanjenja fosfata i silikata imao je najviše stope rasta pri obje temperature, dok se smanjena dostupnost silikata izdvojila najnižom stopom rasta. Kod *P. delicatissima* nutritivni tretmani uglavnom su smanjili stope rasta u odnosu na kontrolu. Kod *P. multistriata* pojedini tretmani imali su više stope rasta od kontrole, dok je kod *P. multiseriis* kontrolni tretman pokazao najvišu stopu rasta. Ovi rezultati pokazuju da učinak hranjivih tvari na stopu rasta ovisi o vrsti, temperaturi i kombinaciji nutritivnog tretmana, zbog čega se hipoteza 2.4 odbacuje.

U konačnici, većina postavljenih hipoteza nije potvrđena. Rezultati pokazuju da se vrste roda *Pseudo-nitzschia* razlikuju u toksičnosti, stopama rasta i odgovoru na promjene temperature i dostupnosti hranjivih tvari. Proizvodnja DK nije bila izravno povezana samo s brojnošću stanica ili stopom rasta, nego je ovisila o vrsti, fazi rasta, nutritivnom tretmanu i temperaturnim uvjetima. Također, rezultati potvrđuju da je odgovor vrsta roda *Pseudo-nitzschia* na promjene uvjeta uzgoja složen te da proizvodnja DK ovisi o međudjelovanju vrste, faze rasta i uvjeta dostupnosti hranjivih tvari. Dobiveni nalazi doprinose boljem razumijevanju rasta i toksičnosti potencijalno toksičnih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* te pružaju temelj za daljnja istraživanja.

6 Literatura

- Accoroni S., Giulietti S., Romagnoli T., Siracusa M., Bacchiocchi S., Totti C. Morphological Variability of *Pseudo-nitzschia pungens* Clade I (Bacillariophyceae) in the Northwestern Adriatic Sea. *Plants*. 2020; 9(11): 1420. doi: 10.3390/PLANTS9111420.
- Álvarez E., Nogueira E., López-Urrutia Á. In vivo single-cell fluorescence and size scaling of phytoplankton chlorophyll content. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017; 83(7). doi: 10.1128/AEM.03317.16.
- Amato A., Kooistra W. H. C. F., Levialdi Ghiron J. H., Mann D. G., Pröschold T., Montresor M. Reproductive Isolation among Sympatric Cryptic Species in Marine Diatoms. *Protist*. 2007; 158(2): 193–207. doi: 10.1016/j.protis.2006.10.001.
- Amato A., Lüdeking A., Kooistra W. H. C. F. Intracellular domoic acid production in *Pseudo-nitzschia multistriata* isolated from the Gulf of Naples (Tyrrhenian Sea, Italy). *Toxicon*. 2010; 55(1): 157–161. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.07.005.
- Amato A., Montresor M. Morphology, phylogeny, and sexual cycle of *Pseudo-nitzschia mannii* sp. nov. (Bacillariophyceae): A pseudo-cryptic species within the *P. pseudodelicatissima* complex. *Phycologia*. 2008; 47(5): 487–497. doi: 10.2216/07-92.1.
- Amato A., Orsini L., D'Alelio D., Montresor M. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 2005; 41(3): 542–556. doi: 10.1111/j.1529-8817.2005.00080.x.
- Anderson D. M., Reguera B., Pitcher G. C., Enevoldsen H. O. The IOC international harmful algal bloom program: History and science impacts. *Oceanography*. 2010; 23(3): 72–85. doi: 10.5670/oceanog.2010.25.
- Arapov J., Bužančić M., Penna A., Casabianca S., Capellacci S., Andreoni F., Skejić S., Bakrač A., Straka M., Mandić J., i sur. High proliferation of *Pseudo-nitzschia* cf. *arenysensis* in the Adriatic Sea: ecological and morphological characterisation. *Mediterranean Marine Science*. 2020; 21(3): 759–774. doi: 10.12681/mms.22932.
- Arapov J., Bužančić M., Skejić S., Mandić J., Bonačić T., Tomašević T., Ninčević Gladan In situ diversity of the marine diatom genus *Pseudo-nitzschia* based on morphological characterisation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2025; 323. doi: 10.1016/j.ecss.2025.109433.
- Arapov J., Skejić S., Bužančić M., Bakrač A., Vidjak O., Bojanić N., Ujević I., Gladan Ž. N. Taxonomical diversity of *Pseudo-nitzschia* from the Central Adriatic Sea. *Psychological Research*. 2017; 65(4): 280–290. doi: 10.1111/PRE.12184.
- Arapov J., Ujević I., Pfannkuchen D. M., Godrijan J., Bakrač A., Gladan Z. N., Marasović I. Domoic acid in phytoplankton net samples and shellfish from the Krka river estuary in the central Adriatic Sea. *Mediterranean Marine Science*. 2016; 17(2): 340–350. doi: 10.12681/MMS.1471.
- Arapov J., Ujević I., Straka M., Skejić S., Bužančić M., Bakrač A., Ninčević Gladan Ž. First evidence of domoic acid production in *Pseudo-nitzschia calliantha* cultures from the central Adriatic Sea. *Acta Adriatica*. 2020; 61(2): 135–144. doi: 10.32582/AA.61.2.2.
- Armbrust E. V. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature*. 2009; 459(7244): 185–192. doi: 10.1038/nature08057.

- Aubry F. B., Cossarini G., Aciri F., Bastianini M., Bianchi F., Camatti E., De Lazzari A., Pugnetti A., Solidoro C., Socal G. Plankton communities in the northern Adriatic Sea: Patterns and changes over the last 30 years. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2012; 115: 125–137. doi: 10.1016/J.ECSS.2012.03.011.
- Bargu S., Goldstein T., Roberts K., Li C., Gulland F. *Pseudo-nitzschia* blooms, domoic acid, and related California sea lion strandings in Monterey Bay, California. *Marine Mammal Science*. 2012; 28(2): 237–253. doi: 10.1111/J.1748-7692.2011.00480.X.
- Bargu S., Silver M. W., Ohman M. D., Benitez-Nelson C. R., Garrison D. L. Mystery behind Hitchcock's birds. *Nature Geoscience*. 2012; 5(1): 2–3. doi: 10.1038/ngeo1360.
- Bates S. S. Domoic-acid-producing diatoms: another genus added. *Journal of Phycology*. 2000; 36(6): 978–983. doi: 10.1046/j.1529-8817.2000.03661.x.
- Bates S. S., Bird C. J., de Freitas A. S. W., Foxall R., Gilgan M., Hanic L. A., Johnson G. R., McCulloch A. W., Odense P., Pocklington R., i sur. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1989; 46(7): 1203–1215. doi: 10.1139/f89-156.
- Bates S. S., Hubbard K. A., Lundholm N., Montresor M., Leaw C. P. *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: New research since 2011. *Harmful Algae*. 2018; 79: 3–43. doi: 10.1016/J.HAL.2018.06.001.
- Behrenfeld M. J., Falkowski P. G. Photosynthetic rates derived from satellite-based chlorophyll concentration. *Limnology and Oceanography*. 1997; 42(1): 1–20. doi: 10.4319/lo.1997.42.1.0001.
- Beltrán A. S., Palafox-Urbe M., Grajales-Montiel J., Cruz-Villacorta A., Ochoa J. L. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon*. 1997; 35(3): 447–453. doi: 10.1016/S0041-0101(96)00140-7.
- Bissinger J. E., Montagnes D. J. S., Sharples J., Atkinson D. Predicting marine phytoplankton maximum growth rates from temperature: Improving on the Eppley curve using quantile regression. *Limnology and Oceanography*. 2008; 53(2): 487–493. doi: 10.4319/LO.2008.53.2.0487;SUBPAGE:STRING:ABSTRACT;ISSUE:ISSUE:DOI.
- Bonacci, O. Analysis of the maximum discharge of karst springs. *Hydrogeology Journal*. 2001; 9(4): 328–338. doi: 10.1007/s100400100142.
- Bonačić T., Arapov J., Bušelić I., Lepen Pleić I., Milić Roje B., Tomašević T., Bužančić M., Mladinić M., Casabianca S., Penna A., i sur. Advancing the Taxonomy of the Diatom *Pseudo-nitzschia* Through an Integrative Study Conducted in the Central and Southeastern Adriatic Sea. *Plants*. 2025; 14(2). doi: 10.3390/plants14020245.
- Boyd P. W., Rynearson T. A., Armstrong E. A., Fu F., Hayashi K., Hu Z., Hutchins D. A., Kudela R. M., Litchman E., Mulholland M. R., i sur. Marine Phytoplankton Temperature versus Growth Responses from Polar to Tropical Waters – Outcome of a Scientific Community-Wide Study. *PLOS ONE*. 2013; 8(5): e63091. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0063091.
- Bravo I., Fraga S., Isabel Figueroa R., Pazos Y., Massanet A., Ramilo I. The distribution and impacts of harmful algal bloom species in eastern boundary upwelling systems. *Progress in Oceanography*. 2010; 85(1-2): 33–52. doi: 10.1016/j.dsr2.2009.09.004.
- Brzezinski M. A. The si:c:n ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. *Journal of Phycology*. 1985; 21(3): 347–357. doi: 10.1111/J.0022-3646.1985.00347.

- Brzezinski M. A. Cell-cycle effects on the kinetics of silicic acid uptake and resource competition among diatoms. *Journal of Plankton Research*. 1992; 14(11): 1511–1539. doi: 10.1093/PLANKT/14.11.1511.
- Burić Z., Viličić D., Mihalić K. C., Carić M., Kralj K., Ljubešić N. *Pseudo-nitzschia* blooms in the Zrmanja River estuary (eastern Adriatic Sea). *Diatom Research*. 2008; 23(1): 51–63. doi: 10.1080/0269249X.2008.9705736.
- Bužančić M., Ninčević Gladan Ž., Marasović I., Kušpilić G., Grbec B. Eutrophication influence on phytoplankton community composition in three bays on the eastern Adriatic coast. *Oceanologia*. 2016; 58(4): 302–316. doi: 10.1016/J.OCEANO.2016.05.003.
- Bužančić M., Ninčević Gladan Ž., Marasović I., Kušpilić G., Grbec B., Matijević S. Population structure and abundance of phytoplankton in three bays on the eastern Adriatic coast: Šibenik Bay, Kaštela Bay and Mali Ston Bay. *Acta Adriatica*. 2012; 53(3): 413–435.
- Čalić M., Carić M., Kršinić F., Jasprica N., Pećarević M. Controlling factors of phytoplankton seasonal succession in oligotrophic Mali Ston Bay (south-eastern Adriatic). *Environmental Monitoring and Assessment*. 2013; 185(9): 7543–7563. doi: 10.1007/s10661-013-3118-2.
- Cerino F., Orsini L., Sarno D., Dell'Aversano C., Tartaglione L., Zingone A. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae*. 2005; 4(1): 33–48. doi: 10.1016/j.hal.2003.10.005.
- Cetinić I., Viličić D., Burić Z., Olujić G. Phytoplankton seasonality in a highly stratified karstic estuary (Krka, Adriatic Sea). *Hydrobiologia*. 2006; 555(1): 31–40. doi: 10.1007/s10750-005-1103-7.
- Chepurnov V. A., Mann D. G., Sabbe K., Vannerum K., Casteleyn G., Verleyen E., Peperzak L., Vyverman W. Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology*. 2005; 40(4): 379–395. doi: 10.1080/09670260500254735.
- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno G. S., Tartaglione L., Quilliam M. A., Tubaro A., Poletti R. Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005; 19(14): 2030–2038. doi: 10.1002/RCM.2021.
- Clark S., Hubbard K. A., Ralston D. K., McGillicuddy D. J., Stock C., Alexander M. A., Curchitser E. Projected effects of climate change on *Pseudo-nitzschia* bloom dynamics in the Gulf of Maine. *Journal of Marine Systems*. 2022; 230: 103737. doi: 10.1016/j.jmarsys.2022.103737.
- D'Alelio D., Amato A., Luedeking A., Montresor M. Sexual and vegetative phases in the planktonic diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *Harmful Algae*. 2009; 8(2): 225–232. doi: 10.1016/j.hal.2008.05.004.
- D'Alelio D., D'Alcalà M. R., Dubroca L., Sarno D., Zingone A., Montresor M. The time for sex: A biennial life cycle in a marine planktonic diatom. *Limnology and Oceanography*. 2010; 55(1): 106–114. doi: 10.4319/LO.2010.55.1.0106.
- de Vargas C., Audic S., Henry N., Decelle J., Mahé F., Logares R., Lara E., Berney C., Le Bescot N., Probert I., et al. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*. 2015; 348(6237). doi: 10.1126/science.1261605.

- Dokulil M. T., Qian K. Photosynthesis, carbon acquisition and primary productivity of phytoplankton: a review dedicated to Colin Reynolds. *Hydrobiologia*. 2020; 848(1): 77–94. doi: 10.1007/S10750-020-04321-Y.
- Dong H. C., Lundholm N., Teng S. T., Li A., Wang C., Hu Y., Li Y. Occurrence of *Pseudo-nitzschia* species and associated domoic acid production along the Guangdong coast, South China Sea. *Harmful Algae*. 2020; 98: 101899. doi: 10.1016/j.hal.2020.101899.
- Dursun F., Tas S., Ediger D. Assessment of phytoplankton group composition in the Golden Horn Estuary (Sea of Marmara, Turkey) determined with pigments measured by HPLC-CHEMTAX analyses and microscopy. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2021; 101(4): 649–665. doi: 10.1017/S0025315421000631.
- European Parliament and Council Regulation (EC) No 853/2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union*. 2004; L 139: 55–205.
- Edwards K. F., Thomas M. K., Klausmeier C. A., Litchman E. Phytoplankton growth and the interaction of light and temperature: A synthesis at the species and community level. *Limnology and Oceanography*. 2016; 61(4): 1232–1244. doi: 10.1002/lno.10282.
- Falkowski P. G., Barber R. T., Smetacek V. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*. 1998; 281(5374): 200–206. doi: 10.1126/science.281.5374.200.
- Falkowski P. G., Raven J. A. *Aquatic Photosynthesis*. 2nd ed. Princeton University Press, Princeton. 2007; 484 p.
- Fehling J., Davidson K., Bates S. S. Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. *Harmful Algae*. 2005; 4(4): 763–769. doi: 10.1016/j.hal.2004.11.002.
- Fehling J., Davidson K., Bolch C., Tett P. Seasonality of *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) in western Scottish waters. *Marine Ecology Progress Series*. 2006; 323: 91–105. doi: 10.3354/meps323091.
- Fernandes L. F., Hubbard K. A., Richlen M. L., Smith J., Bates S. S., Ehrman J., Léger C., Mafra L. L., Kulis D., Quilliam M., i sur. Diversity and toxicity of the diatom *Pseudo-nitzschia* Peragallo in the Gulf of Maine, Northwestern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 2014; 103: 139–162. doi: 10.1016/j.dsr2.2013.06.022.
- Fire S. E., Wang Z., Berman M., Langlois G. W., Morton S. L., Sekula-Wood E., Benitez-Nelson C. R. Trophic transfer of the harmful algal toxin domoic acid as a cause of death in a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) stranding in southern California. *Aquatic Mammals*. 2010; 36(4): 342–350. doi: 10.1578/AM.36.4.2010.342.
- Fire S. E., Wang Z., Leighfield T. A., Morton S. L., McFee W. E., McLellan W. A., Litaker R. W., Tester P. A., Hohn A. A., Lovewell G., i sur. Domoic acid exposure in pygmy and dwarf sperm whales (*Kogia spp.*) from southeastern and mid-Atlantic U.S. waters. *Harmful Algae*. 2009; 8(5): 658–664. doi: 10.1016/J.HAL.2008.12.002.
- Fuks D., Devescovi M., Precali R., Krstulović N., Šolić M. Bacterial abundance and activity in the highly stratified estuary of the Krka River. *Marine Chemistry*. 1991; 32(2–4): 333–346. doi: 10.1016/0304-4203(91)90047-Z.
- Gilpin L. C., Davidson K., Roberts E. The influence of changes in nitrogen: silicon ratios on diatom growth dynamics. *Journal of Sea Research*. 2004; 51(1): 21–35. doi: 10.1016/J.SEARES.2003.05.005.

- Giulietti S., Romagnoli T., Campanelli A., Totti C., Accoroni S. Ecology and seasonality of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in the northwestern Adriatic Sea over a 30-year period (1988–2020). *Mediterranean Marine Science*. 2021; 22(3): 505–520. doi: 10.12681/mms.26021.
- Gobler C. J. Climate Change and Harmful Algal Blooms: Insights and perspective. *Harmful Algae*. 2020; 91: 101731. doi: 10.1016/J.HAL.2019.101731.
- Guillard R. R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*. 1975: 29–60. doi: 10.1007/978-1-4615-8714-9_3.
- Guillard R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press. 1975: 56–60.
- Guillard R. R. L., Sieracki M. S. Counting cells in cultures with the light microscope. U: Andersen R. A. (ur.) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. 2005: 239–252. doi: 10.1016/B978-012088426-1/50017-2.
- Guiry M. D., Guiry G. M. AlgaeBase. Worldwide electronic publication. National University of Ireland, Galway. 2026.
- Hallegraeff G. M. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge1. *Journal of Phycology*. 2010; 46(2): 220–235. doi: 10.1111/J.1529-8817.2010.00815.X.
- Hansen L. R., Soyulu S. Í., Kotaki Y., Moestrup Ø., Lundholm N. Toxin production and temperature-induced morphological variation of the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* from the Arctic. *Harmful Algae*. 2011; 10(6): 689–696. doi: 10.1016/j.hal.2011.05.004.
- Hasle G. R. *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *nitzschia* (bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 1994; 30(6): 1036–1039. doi: 10.1111/J.0022-3646.1994.01036.X.
- Hasle G. R. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae*. 2002; 1(2): 137–146. doi: 10.1016/S1568-9883(02)00014-8.
- Hildebrand M., Lerch S. J. L. Diatom silica biomineralisation: Parallel development of approaches and understanding. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2015; 46: 27–35. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.06.007.
- Hlaili A. S., Khalifa I. S., Bouchouicha-Smida D., Garali S. M., Ksouri J., Chalghaf M., Bates S. S., Lundholm N., Kooistra W. H. C. F., de la Iglesia P. Toxic and potentially toxic diatom blooms in Tunisian (SW Mediterranean) waters: review of ten years of investigations. *Advances in Environmental Research*. 2016; 48: 51–69.
- Holtermann K. E., Bates S. S., Trainer V. L., Odell A., Armbrust E. V. Mass sexual reproduction in the toxigenic diatoms *pseudo-nitzschia australis* and *P. pungens* (bacillariophyceae) on the Washington coast, USA. *Journal of Phycology*. 2010; 46(1): 41–52. doi: 10.1111/j.1529-8817.2009.00792.x.
- Jasprica N., Carić M., Kršinić F., Kapetanović T., Batistić M., Njire J. Planktonic diatoms and their environment in the lower Neretva River estuary (eastern Adriatic Sea, NE Mediterranean). *Nova Hedwigia, Beiheft*. 2012; 141: 405–430.
- Jeffrey S. W., Wright S. W., Zapata M. Microalgal classes and their signature pigments. *Phytoplankton Pigments*. 2011: 3–77. doi: 10.1017/cbo9780511732263.004.
- Jones T. O., Whyte J. N. C., Ginther N. G., Townsend L. D., Iwama G. K. Haemocyte changes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, caused by exposure to domoic acid in the diatom *Pseudo-nitzschia pungens* f. multiseriis. *Toxicon*. 1995; 33(3): 347–353. doi: 10.1016/0041-0101(94)00170-D.

- Jones T. O., Whyte J. N. C., Townsend L. D., Ginther N. G., Iwama G. K. Effects of domoic acid on haemolymph pH, PCO₂ and PO₂ in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and the California mussel, *Mytilus californianus*. *Aquatic Toxicology*. 1995; 31(1): 43–55. doi: 10.1016/0166-445X(94)00057-W.
- Keller M. D., Selvin R. C., Claus W., Guillard R. R. L. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *Journal of Phycology*. 1987; 23(4): 633–638. doi: 10.1111/J.1529-8817.1987.TB04217.
- Kotaki Y., Lundholm N., Onodera H., Kobayashi K., Bajarias F. F. A., Furio E. F., Iwataki M., Fukuyo Y., Kodama M. Wide distribution of *Nitzschia navis-varingica*, a new domoic acid-producing benthic diatom found in Vietnam. *Fisheries Science*. 2004; 70(1): 28–32. doi: 10.1111/J.1444-2906.2003.00766.X.
- Kröger N., Poulsen N. Diatoms - From cell wall biogenesis to nanotechnology. *Annual Review of Genetics*. 2008; 42: 83–107. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130109.
- Krvavica N., Ružić I. Assessment of sea-level rise impacts on salt-wedge intrusion in idealized and Neretva River Estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2020; 234: 106638. doi: 10.1016/J.ECSS.2020.106638.
- Kvitek R. G., Goldberg J. D., Smith G. J., Doucette G. J., Silver M. W. Domoic acid contamination within eight representative species from the benthic food web of Monterey Bay, California, USA. *Marine Ecology Progress Series*. 2008; 367: 35–47. doi: 10.3354/meps07569.
- Kvrgić K., Lešić T., Džafić N., Pleadin J. Occurrence and Seasonal Monitoring of Domoic Acid in Three Shellfish Species from the Northern Adriatic Sea. *Toxins*. 2022; 14(1). doi: 10.3390/toxins14010033.
- Lakeman M. B., von Dassow P., Cattolico R. A. The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae*. 2009; 8(5): 746–758. doi: 10.1016/J.HAL.2008.11.011.
- Lapworth C., Hallegraeff G. M. J., Ajani P. A. Identification of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species in Australian waters. *Harmful Algal Blooms 2000 Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms*. 2001: 38–41.
- Lefebvre K. A., Dovel S. L., Silver M. W. Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Marine Biology*. 2001; 138(4): 693–700. doi: 10.1007/s002270000509.
- Legović T., Žutić V., Gržetić Z., Cauwet G., Precali R., Viličić D. Eutrophication in the Krka estuary. *Marine Chemistry*. 1994; 46(1): 203–215. doi: 10.1016/0304-4203(94)90056-6.
- Lelong A., Hégaret H., Soudant P., Bates S. S. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: Revisiting previous paradigms. *Phycologia*. 2012; 51(2): 168–216. doi: 10.2216/11-37.1.
- Lelong A., Bucciarelli E., Hégaret H., Soudant P. Iron and copper limitations differently affect growth rates and photosynthetic and physiological parameters of the marine diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima*. *Limnology and Oceanography*. 2013; 58(2): 613–623. doi: 10.4319/lo.2013.58.2.0613.
- Lelong A., Hégaret H., Soudant P. Link between domoic acid production and cell physiology after exchange of bacterial communities between toxic *Pseudo-nitzschia multiseries* and non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima*. *Marine Drugs*. 2014; 12(6): 3587–3607. doi: 10.3390/md12063587.
- Lema K. A., Latimier M., Nézan É., Fauchot J., Le Gac M. Inter and intra-specific growth and domoic acid production in relation to nutrient ratios and concentrations in *Pseudo-*

- nitzschia*: phosphate an important factor. *Harmful Algae*. 2017; 64: 11–19. doi: 10.1016/j.hal.2017.03.001.
- Lewis N. I., Bates S. S., McLachlan J. L., Smith J. C. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens* f. multiseries. U: Smayda T. J., Shimizu Y. (ur.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1993: 601–606.
- Liu X., Bian Z., Hu S., Dickinson C. F., Benjamin M. M., Jia J., Tian Y., Place A., Hanna G. S., Luesch H., i sur. The Chemistry of Phytoplankton. *Chemical Reviews*. 2024; 124(23): 13099–13177. doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.4C00177.
- Ljubešić Z., Bosak S., Viličić D., Borojević K. K., Marić D., Godrijan J., Ujević I., Peharec P., Dakovac T. Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). *Harmful Algae*. 2011; 10(6): 713–722. doi: 10.1016/j.hal.2011.06.002.
- Lovrenčić Mikelić I., Oreščanin V., Škaro K. Variation of sedimentation rate in the semi-enclosed bay determined by ¹³⁷Cs distribution in sediment (Kaštela Bay, Croatia). *Journal of Environmental Radioactivity*. 2017; 166: 112–125. doi: 10.1016/j.jenvrad.2016.03.027.
- Lundholm N. Bacillariophyta. IOC-UNESCO. 2026.
- Lundholm N., Christensen A. L., Olesen A. K. J., Beszteri B., Eggers S. L., Krock B., Altenburger A. Diversity, toxicity, and distribution of potentially toxic diatoms in Antarctic waters—With description of *Pseudo-nitzschia meridionalis* sp. nov. and *P. glacialis* sp. nov. *Harmful Algae*. 2024; 139. doi: 10.1016/j.hal.2024.102724.
- Lundholm N., Daugbjerg N., Moestrup Ø. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology*. 2002; 37(1): 115–134. doi: 10.1017/S096702620100347X.
- Lundholm N., Hansen P. J., Kotaki Y. Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Marine Ecology Progress Series*. 2004; 273: 1–15. doi: 10.3354/meps273001.
- Lundholm N., Krock B., John U., Skov J., Cheng J., Pančić M., Wohlrab S., Rigby K., Nielsen T. G., Selander E., i sur. Induction of domoic acid production in diatoms—Types of grazers and diatoms are important. *Harmful Algae*. 2018; 79: 64–73. doi: 10.1016/j.hal.2018.06.005.
- Lundholm N., Moestrup Ø., Hasle G. R., Hoef-Emden K. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*/cuspidata complex (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*? *Journal of Phycology*. 2003; 39(4): 797–813. doi: 10.1046/j.1529-8817.2003.02031.x.
- Lundholm N., Skov J., Pocklington R., Moestrup Ø. Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters. *Phycologia*. 1997; 36(5): 381–388. doi: 10.2216/I0031-8884-36-5-381.1.
- Mackey M. D., Mackey D. J., Higgins H. W., Wright S. W. CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*. 1996; 144(1-3): 265–283. doi: 10.3354/meps144265.
- Mafra L. L., Bricelj V. M., Fennel K. Domoic acid uptake and elimination kinetics in oysters and mussels in relation to body size and anatomical distribution of toxin. *Aquatic Toxicology*. 2010; 100(1): 17–29. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.07.002.

- Malviya S., Scalco E., Audic S., Vincent F., Veluchamy A., Poulain J., Wincker P., Iudicone D., de Vargas C., Bittner L., i sur. Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113(11): E1516–E1525. doi: 10.1073/pnas.1509523113.
- Margalef R. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta*. 1978; 1(4): 493–509.
- Marić D., Kraus R., Godrijan J., Supić N., Djakovac T., Precali R. Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2012; 115: 98–112. doi: 10.1016/J.ECSS.2012.02.003.
- Marić D., Ljubešić Z., Godrijan J., Viličić D., Ujević I., Precali R. Blooms of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle in coastal waters of the northern Adriatic Sea (Croatia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2011; 92(3): 323–331. doi: 10.1016/j.ecss.2011.01.002.
- Marić Pfannkuchen D. Potencijalno toksične dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu: ekološke, taksonomske i molekularne značajke. Doktorski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. 2013.
- Martin-Jézéquel V., Calu G., Candela L., Amzil Z., Jauffrais T., Séchet V., Weigel P. Effects of organic and inorganic nitrogen on the growth and production of domoic acid by *pseudo-nitzschia multiseriis* and *P. australis* (bacillariophyceae) in culture. *Marine Drugs*. 2015; 13(12): 7067–7086. doi: 10.3390/md13127055.
- McCarron P., Emteborg H., Nulty C., Rundberget T., Loader J. I., Teipel K., Miles C. O., Quilliam M. A., Hess P. A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 1: Design and preparation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011; 400(3): 821–833. doi: 10.1007/S00216-011-4786-9.
- McKibben, S. M., Peterson, W., Wood, A. M., Trainer, V. L., Hunter, M., & White, A. E. (2017). Climatic regulation of the neurotoxin domoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2), 239–244. doi: 10.1073/pnas.1606798114
- Moschandreou K. K., Baxevanis A. D., Katikou P., Papaefthimiou D., Nikolaidis G., Abatzopoulos T. J. Inter- and intra-specific diversity of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in the northeastern Mediterranean. *European Journal of Phycology*. 2012; 47(3): 321–339. doi: 10.1080/09670262.2012.713998.
- Moschandreou K. K., Nikolaidis G. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Greek coastal waters. *Botanica Marina*. 2010; 53(2): 159–172. doi: 10.1515/BOT.2010.014.
- Moschandreou K. K., Papaefthimiou D., Katikou P., Kalopesa E., Panou A., Nikolaidis G. Morphology, phylogeny and toxin analysis of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) isolated from the Thermaikos Gulf, Greece. *Phycologia*. 2010; 49(3): 260–273. doi: 10.2216/PH09-42.1.
- Mozetič P., Cangini M., Francé J., Bastianini M., Bernardi Aubry F., Bužančić M., Cabrini M., Cerino F., Čalić M., D'Adamo R., i sur. Phytoplankton diversity in Adriatic ports: Lessons from the port baseline survey for the management of harmful algal species. *Marine Pollution Bulletin*. 2019; 147: 117–132. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.12.029.
- Ninčević Gladan Ž., Matić F., Arapov J., Skejić S., Bužančić M., Bakrač A., Straka M., Dekneudt Q., Grbec B., Garber R., i sur. The relationship between toxic phytoplankton species occurrence and environmental and meteorological factors along the Eastern Adriatic coast. *Harmful Algae*. 2020; 92: 101745. doi: 10.1016/j.hal.2020.101745.

- Nishimura T., Murray J. S., Boundy M. J., Balci M., Bowers H. A., Smith K. F., Harwood D. T., Rhodes L. L. Update of the planktonic diatom genus *pseudo-nitzschia* in aotearoa new zealand coastal waters: Genetic diversity and toxin production. *Toxins*. 2021; 13(9). doi: 10.3390/toxins13090637.
- Novosel M., Bakran-Petricioli T., Požar-Domac A., Kružić P., Radić I. The benthos of the northern part of the Velebit Channel (Adriatic Sea, Croatia). *Natura Croatica*. 2002; 11(4): 387–410.
- Orlova T. Y., Stonik I. V., Aizdaicher N. A., Bates S. S., Léger C., Fehling J. Toxicity, morphology and distribution of *Pseudo-nitzschia calliantha*, *P. multistriata* and *P. multiseriata* (Bacillariophyta) from the northwestern Sea of Japan. *Botanica Marina*. 2008; 51(4): 297–306. doi: 10.1515/BOT.2008.035.
- Orsini L., Sarno D., Procaccini G., Poletti R., Dahlmann J., Montresor M. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: Morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *European Journal of Phycology*. 2002; 37(2): 247–257. doi: 10.1017/S0967026202003608.
- Pan J. Marine phytoplankton diversity and ecology. *Marine Biology: A Functional Approach to the Oceans and their Organisms*. 2022: 43–71. doi: 10.1201/9780429399244-5.
- Pan Y., Bates S. S., Cembella A. D. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: A physiological perspective. *Natural Toxins*. 1998; 6(3-4): 127–135. doi: 10.1002/(sici)1522-7189.
- Pan Y., Subba Rao D. V., Mann K. H. Acclimation to low light intensity in photosynthesis and growth of *Pseudo-nitzschia multiseriata* Hasle, a neurotoxic diatom. *Journal of Plankton Research*. 1996; 18(8): 1427–1438. doi: 10.1093/plankt/18.8.1427.a
- Pan Y., Subba Rao D. V., Mann K. H. Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* under phosphate limitation. *Journal of Phycology*. 1996; 32(3): 371–381. doi: 10.1111/J.0022-3646.1996.00371.b
- Pan Y., Subba Rao D. V., Mann K. H., Brown R. G., Pocklington R. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata*. I. Batch culture studies. *Marine Ecology Progress Series*. 1996; 131(1-3): 225–233. doi: 10.3354/MEPS131225.c
- Penna A., Casabianca S., Perini F., Bastianini M., Riccardi E., Pigozzi S., Scardi M. Toxic *Pseudo-nitzschia* spp. in the northwestern Adriatic Sea: Characterization of species composition by genetic and molecular quantitative analyses. *Journal of Plankton Research*. 2013; 35(2): 352–366. doi: 10.1093/plankt/fbs093.
- Percopo I., Ruggiero M. V., Sarno D., Longobardi L., Rossi R., Piredda R., Zingone A. Phenological segregation suggests speciation by time in the planktonic diatom *Pseudo-nitzschia allochroa* sp. nov. *Ecology and Evolution*. 2022; 12(8): 1–16. doi: 10.1002/ece3.9155.
- Perl T. M., Bédard L., Kosatsky T., Hockin J. C., Todd E. C. D., Remis R. S. An Outbreak of Toxic Encephalopathy Caused by Eating Mussels Contaminated with Domoic Acid. *The New England Journal of Medicine*. 2010; 322(25): 1775–1780. doi: 10.1056/NEJM199006213222504.
- Pierella Karlusich J. J., Ibarbalz F. M., Bowler C. Exploration of marine phytoplankton: from their historical appreciation to the omics era. *Journal of Plankton Research*. 2020; 42(6): 595–612. doi: 10.1093/PLANKT/FBAA049.

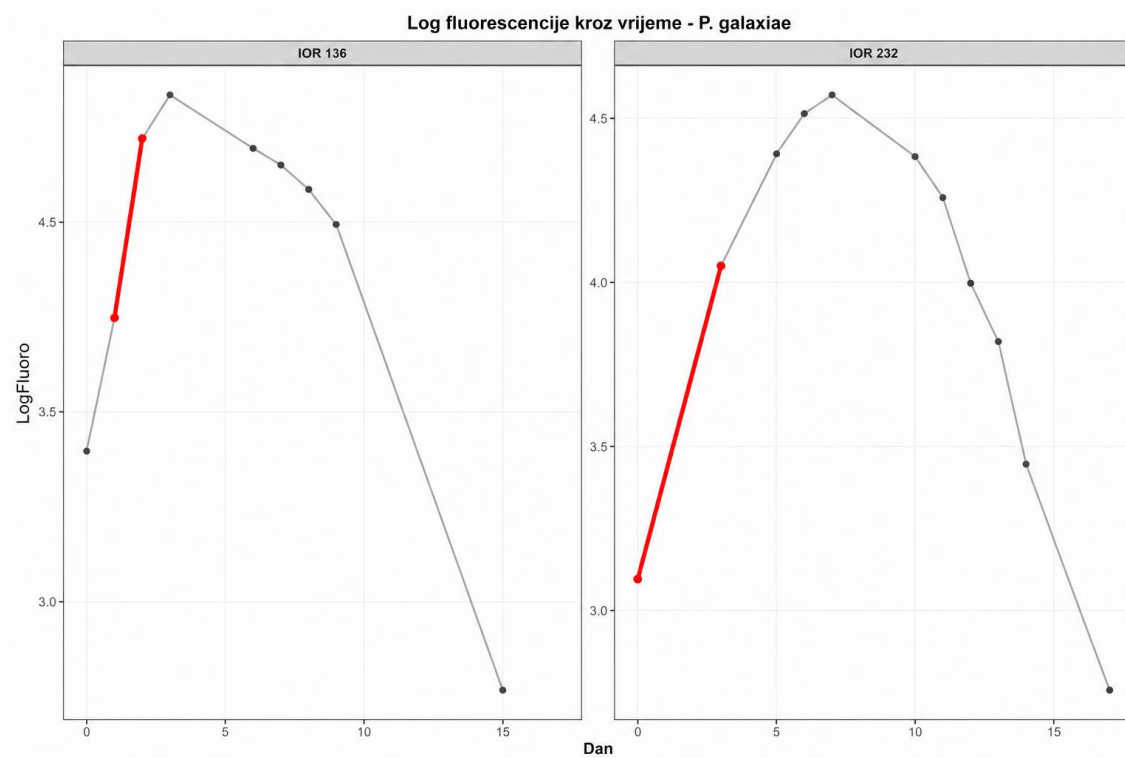
- Pistocchi R., Guerrini F., Pezzolesi L., Riccardi M., Vanucci S., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Forino M., Fattorusso E., Tartaglione L., i sur. Toxin Levels and Profiles in Microalgae from the North-Western Adriatic Sea—15 Years of Studies on Cultured Species. *Marine Drugs*. 2012; 10(1): 140–162. doi: 10.3390/MD10010140.
- Pulido O. M. Domoic Acid Toxicologic Pathology: A Review. *Marine Drugs*. 2008; 6(2): 180–219. doi: 10.3390/MD6020180.
- Quijano-Scheggia S., Garcés E., Andree K. B., De la Iglesia P., Diogène J., Fortuño J. M., Camp J. *Pseudo-nitzschia* species on the Catalan coast: characterization and contribution to the current knowledge of the distribution of this genus in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*. 2010; 74(2): 395–410. doi: 10.3989/scimar.2010.74n2395.
- Quilliam M. A., Xie M., Hardstaff W. R. Rapid Extraction and Cleanup for Liquid Chromatographic Determination of Domoic Acid in Unsalted Seafood. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 1995; 78(2): 543–554. doi: 10.1093/JAOAC/78.2.543.
- R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2019.
- Redfield A. C., Ketchum B. H., Richards F. A. The influence of organisms on the composition of seawater. *The sea*. 1963; 2: 26–77.
- Reynolds C. S. The ecology of phytoplankton. *The Ecology of Phytoplankton*. 2006: 1–535. doi: 10.1017/CBO9780511542145.
- Round F. E., Crawford R. M., Mann D. G. *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, Cambridge. 1990.
- Ruggiero M. V., D'Alelio D., Ferrante M. I., Santoro M., Vitale L., Procaccini G., Montresor M. Clonal expansion behind a marine diatom bloom. *The ISME Journal*. 2017; 12(2): 463. doi: 10.1038/ISMEJ.2017.181.
- Russo A., Carniel S., Sclavo M., Krzelj M. Climatology of the Northern-Central Adriatic Sea. *Modern Climatology*. 2012. doi: 10.5772/34693.
- Sahraoui I., Bates S. S., Bouchouicha D., Mabrouk H. H., Hlaili A. S., Steleyn G T. G. U. B. Toxicity of *pseudo-nitzschia* populations from bizerte lagoon, tunisia, southwest mediterranean, and first report of domoic acid production by *P. brasiliana*. *Diatom Research*. 2011; 26(3): 293–303. doi: 10.1080/0269249X.2011.597990.
- Santiago-Morales I. S., García-Mendoza E. Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si:NO₃ ratios. *Harmful Algae*. 2011; 12: 82–94. doi: 10.1016/J.HAL.2011.09.004.
- Scalco E., Stec K., Iudicone D., Ferrante M. I., Montresor M. The dynamics of sexual phase in the marine diatom *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 2014; 50(5): 817–828. doi: 10.1111/JPY.12225.
- Scholín C. A., Gulland F., Doucette G. J., Benson S., Busman M., Chavez F. P., Cordaro J., DeLong R., De Vogelaere A., Harvey J., i sur. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*. 2000; 403(6765): 80–84. doi: 10.1038/47481.
- Sezgin R., Durmus T., Balci M., Dursun F., Balkis-Ozdelice N., Krock B., Tas S. Morpho-phylogenetic and toxicological characterisation of *Pseudo-nitzschia multiseriata* from the Sea of Marmara (Türkiye). *Harmful Algae*. 2025; 146: 102867. doi: 10.1016/j.hal.2025.102867.
- Sieburth J. M. N., Smetacek V., Lenz J. Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions.

- Limnology and Oceanography*. 1978; 23(6): 1256–1263. doi: 10.4319/LO.1978.23.6.1256.
- Skejić S., Milić Roje B., Matić F., Arapov J., Francé J., Bužančić M., Bakrač A., Straka M., Ninčević Gladan Ž. Phytoplankton Assemblage over a 14-Year Period in the Adriatic Sea: Patterns and Trends. *Biology*. 2024; 13(7). doi: 10.3390/biology13070493.
- Skejić S., Vilibić I., Matijević S., Jozić S., Gladan Ž. N., Morović M., Marasović I., Prelesnik H. Long-term regulating mechanisms of phytoplankton biomass in a traditional shellfish aquaculture area. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2015; 24(9A): 3001–3013.
- Stonik I. V. Long-term variations in species composition of bloom-forming toxic *Pseudo-nitzschia* diatoms in the North-western Sea of Japan during 1992–2015. *Journal of Marine Science and Engineering*. 2021; 9(6): 568. doi: 10.3390/jmse9060568.
- Tammilehto A., Nielsen T. G., Krock B., Møller E. F., Lundholm N. Induction of domoic acid production in the toxic diatom *Pseudo-nitzschia seriata* by calanoid copepods. *Aquatic Toxicology*. 2015; 159: 52–61. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.11.026.
- Tanković M. S., Baričević A., Gerić M., Domijan A.-M., Pfannkuchen D. M., Kužat N., Ujević I., Kuralić M., Rožman M., Matković K., i sur. Characterisation and toxicological activity of three different *Pseudo-nitzschia* species from the northern Adriatic Sea (Croatia). *Environmental Research*. 2022: 114108. doi: 10.1016/J.ENVRES.2022.114108.
- Tas S., Lundholm N. Temporal and spatial variability of the potentially toxic *Pseudo-nitzschia* spp. in a eutrophic estuary (Sea of Marmara). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2017; 97(7): 1483–1494. doi: 10.1017/S0025315416000837.
- Tatters A. O., Fu F. X., Hutchins D. A. High CO₂ and silicate limitation synergistically increase the toxicity of *Pseudo-nitzschia fraudulenta*. *PLoS ONE*. 2012; 7(2). doi: 10.1371/journal.pone.0032116.
- Taucher J., Bach L. T., Prowe A. E. F., Boxhammer T., Kvale K., Riebesell U. Enhanced silica export in a future ocean triggers global diatom decline. *Nature*. 2022; 605(7911): 696–700. doi: 10.1038/s41586-022-04687-0.
- Teitelbaum J. S., Zatorre R. J., Carpenter S., Gendron D., Evans A. C., Gjedde A., Cashman N. R. Neurologic Sequelae of Domoic Acid Intoxication Due to the Ingestion of Contaminated Mussels. *The New England Journal of Medicine*. 2010; 322(25): 1781–1787. doi: 10.1056/NEJM199006213222505.
- Thessen A. E., Bowers H. A., Stoecker D. K. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae*. 2009; 8(5): 792–810. doi: 10.1016/j.hal.2009.01.003.
- Thoré E. S. J., Muylaert K., Bertram M. G., Brodin T. Microalgae. *Current Biology*. 2023; 33(3): R91–R95. doi: 10.1016/j.cub.2022.12.032.
- Thorel M., Fauchot J., Morelle J., Raimbault V., Le Roy B., Miossec C., Kientz-Bouchart V., Claquin P. Interactive effects of irradiance and temperature on growth and domoic acid production of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae*. 2014; 39: 232–241. doi: 10.1016/J.HAL.2014.07.010.
- Thorel M., Claquin P., Schapira M., Le Gendre R., Riou P., Goux D., Le Roy B., Raimbault V., Deton-Cabanillas A.-F., Bazin P. Nutrient ratios influence variability in *Pseudo-nitzschia* species diversity and particulate domoic acid production in the Bay of Seine (France). *Harmful Algae*. 2017; 68: 192–205. doi: 10.1016/j.hal.2017.07.005.

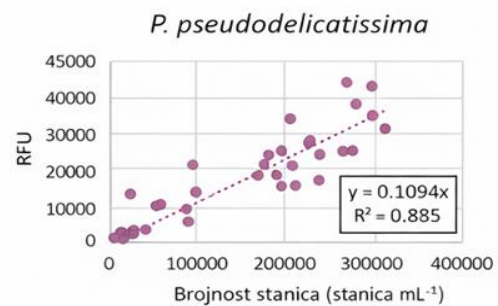
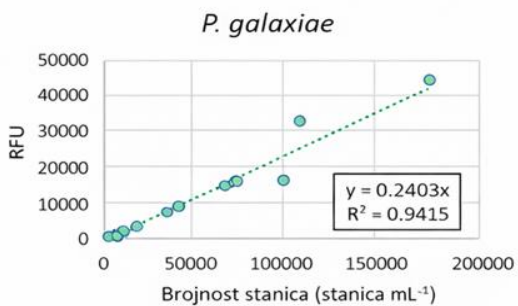
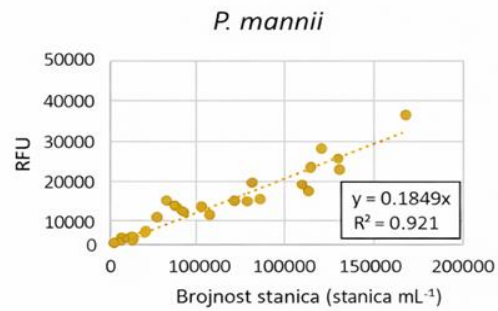
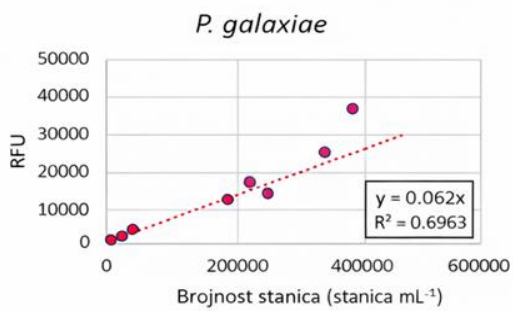
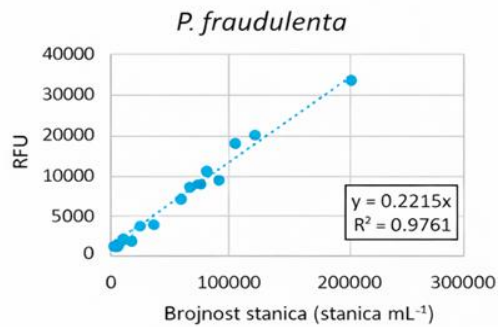
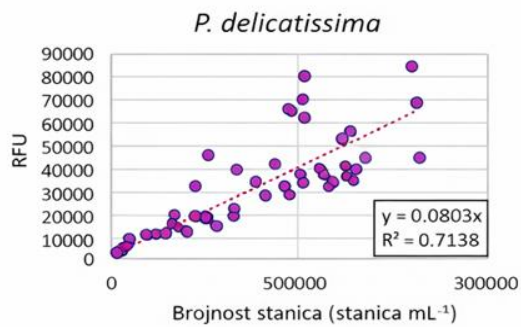
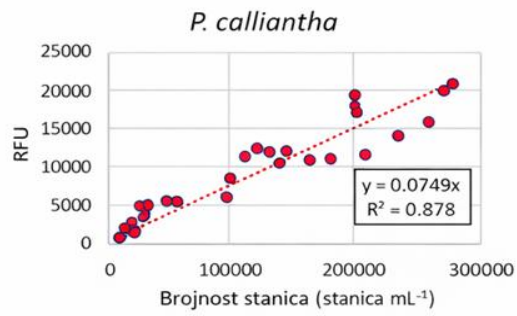
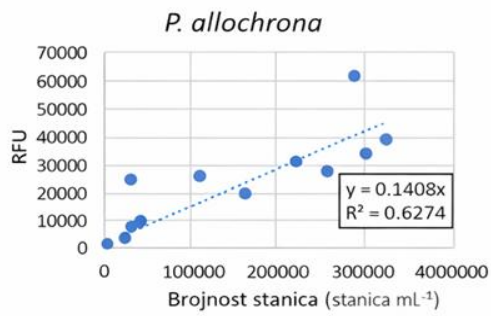
- Tomašević T., Arapov J., Ujević I. Growth dynamics and toxin production of *Pseudo-nitzschia* species isolated from the central Adriatic Sea. *Toxins*. 2025; 17(6): 307. doi: 10.3390/toxins17060307.
- Trainer V. L., Bates S. S., Lundholm N., Thessen A. E., Cochlan W. P., Adams N. G., Trick C. G. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*. 2012; 14: 271–300. doi: 10.1016/j.hal.2011.10.025.
- Trainer V. L., Bill B. D. Characterization of a domoic acid binding site from Pacific razor clam. *Aquatic Toxicology*. 2004; 69(2): 125–132. doi: 10.1016/J.AQUATOX.2004.04.012.
- Tréguer P. J., De La Rocha C. L. The world ocean silica cycle. *Annual Review of Marine Science*. 2013; 5: 477–501. doi: 10.1146/annurev-marine-121211-172346.
- Turk Dermastia T., Cerino F., Stanković D., Francé J., Ramšak A., Žnidarič Tušek M., Beran A., Natali V., Cabrini M., Mozetič P. Ecological time series and integrative taxonomy unveil seasonality and diversity of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo in the northern Adriatic Sea. *Harmful Algae*. 2020; 93. doi: 10.1016/j.hal.2020.101773.
- Turk Dermastia T., Dall’Ara S., Dolenc J., Mozetič P. Toxicity of the Diatom Genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae): Insights from Toxicity Tests and Genetic Screening in the Northern Adriatic Sea. *Toxins*. 2022; 14(1): 60. doi: 10.3390/toxins14010060.
- Turk Dermastia T., Francé J., Arapov J., Neri F., Accoroni S., Totti C., Cerino F., Ferrante M. I., Bernardi Aubry F., Finotto S., i sur. Comprehensive insights into *Pseudo-nitzschia* research in the Adriatic Sea: diverse perspectives and emerging discoveries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2025; 319: 109283. doi: 10.1016/j.ecss.2025.109283.
- Ujević I., Ninčević-Gladan Ž., Roje R., Skejić S., Arapov J., Marasović I. Domoic acid-A new toxin in the Croatian Adriatic shellfish toxin profile. *Molecules*. 2010; 15(10): 6835–6849. doi: 10.3390/molecules15106835.
- Ujević I., Odžak N., Barić A. Trace metal accumulation in different grain size fractions of the sediments from a semi-enclosed bay heavily contaminated by urban and industrial wastewaters. *Water Research*. 2000; 34(11): 3055–3061. doi: 10.1016/S0043-1354(99)00376-0.
- Ujević I., Roje-Busatto R., Ezgeta-Balić D. Comparison of amnesic, paralytic and lipophilic toxins profiles in cockle (*Acanthocardia tuberculata*) and smooth clam (*Callista chione*) from the central Adriatic Sea (Croatia). *Toxicon*. 2019; 159: 32–37. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.12.008.
- Vascotto I., Mozetič P., Francé J. Phytoplankton morphological traits and biomass outline community dynamics in a coastal ecosystem (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Community Ecology*. 2024; 25(3): 389–402. doi: 10.1007/S42974-024-00215-4.
- Viličić D. Phytoplankton population density and volume as indicators of eutrophication in the eastern part of the Adriatic Sea. *Hydrobiologia*. 1989; 174(2): 117–132. doi: 10.1007/BF00014060.
- Viličić D., Jasprica N., Carić M., Burić Z. Taxonomic composition and seasonal distribution of microphytoplankton in Mali Ston Bay (eastern Adriatic). *Acta Botanica Croatica*. 1998; 57(1): 29–48.
- Viličić D., Legović T., Žutić V. Vertical distribution of phytoplankton in a stratified estuary. *Aquatic Sciences*. 1989; 51(1): 31–46. doi: 10.1007/BF00877779.
- Viličić, D., Marasović, I., & Mioković, D. (2002). Checklist of phytoplankton in the eastern Adriatic Sea. *Acta Botanica Croatica*, 61(1), 57–91.

- Viličić, D. (2002). *Fitoplankton Jadranskoga mora*. Zagreb: Školska knjiga.
- von Dassow P., Mikhno M., Percopo I., Orellana V. R., Aguilera V., Álvarez G., Araya M., Cornejo-Guzmán S., Llona T., Mardones J. I., i sur. Diversity and toxicity of the planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* from coastal and offshore waters of the Southeast Pacific, including *Pseudo-nitzschia dampieri* sp. nov. *Harmful Algae*. 2023; 130: 102520. doi: 10.1016/J.HAL.2023.102520.
- Wassmann P., Arashkevich E., Ratkova T. Plankton distribution and vertical flux of biogenic matter during high summer stratification in the Krka estuary (eastern Adriatic). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2007; 71(3–4): 381–390. doi: 10.1016/j.ecss.2006.07.022.
- Weber C., Olesen A. J., Hatfield R. G., Krock B., Lundholm N. Extensive Variation in Thermal Responses and Toxin Content Among 40 Strains of the Cold-Water Diatom *Pseudo-nitzschia seriata*—In a Global Warming Context. *Toxins*. 2025; 17(5): 235. doi: 10.3390/TOXINS17050235/S1.
- Wingert C. J., Cochlan W. P. Effects of ocean acidification on the growth, photosynthetic performance, and domoic acid production of the diatom *Pseudo-nitzschia australis* from the California Current System. *Harmful Algae*. 2021; 107: 102030. doi: 10.1016/j.hal.2021.102030.
- Wood A. M., Everroad R. C., Wingard L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. U: Andersen R. A. (ur.) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. 2005: 269–285. doi: 10.1016/B978-012088426-1/50019-6.
- Wright J. L. C., Boyd R. K., de Freitas A. S. W., Falk M., Foxall R. A., Jamieson W. D., Laycock M. V., McCulloch A. W., McInnes A. G., Odense P., i sur. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Canadian Journal of Chemistry*. 1989; 67(3): 481–490. doi: 10.1139/v89-075.
- Zore-Armanda M. Some dynamic and hydrographic properties of the Kaštela Bay. *Acta Adriatica*. 1980; 21(2): 55–74.
- Zhu, Z., Qu, P., Gale, J., Fu, F., & Hutchins, D. A. (2017). Understanding the blob bloom: Warming increases toxicity and abundance of the harmful bloom diatom *Pseudo-nitzschia* in California coastal waters. *Harmful Algae*, 67, 36–43. doi: 10.1016/j.hal.2017.06.004.

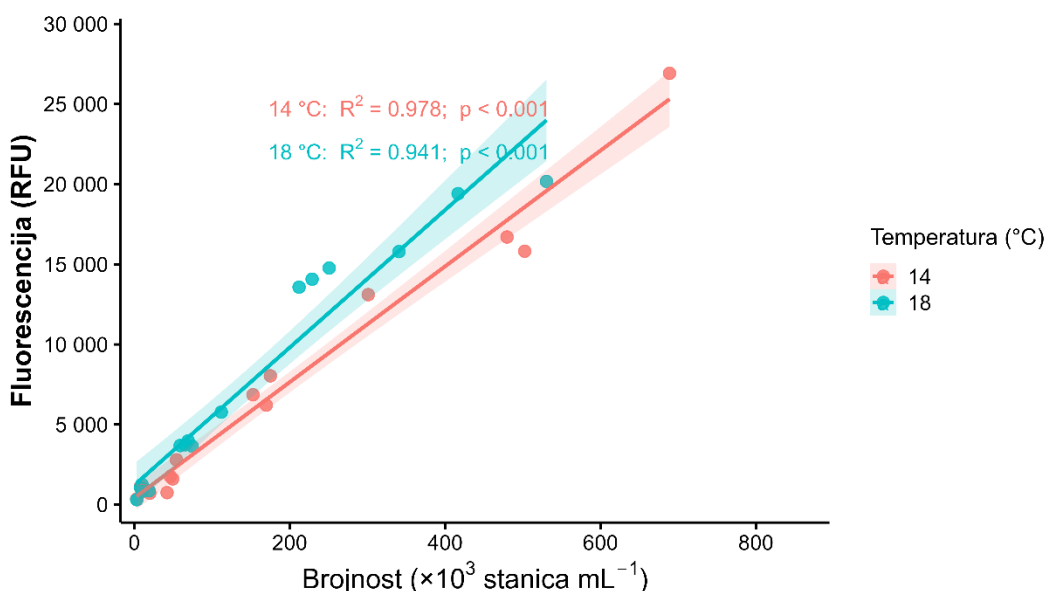
7 Prilozi



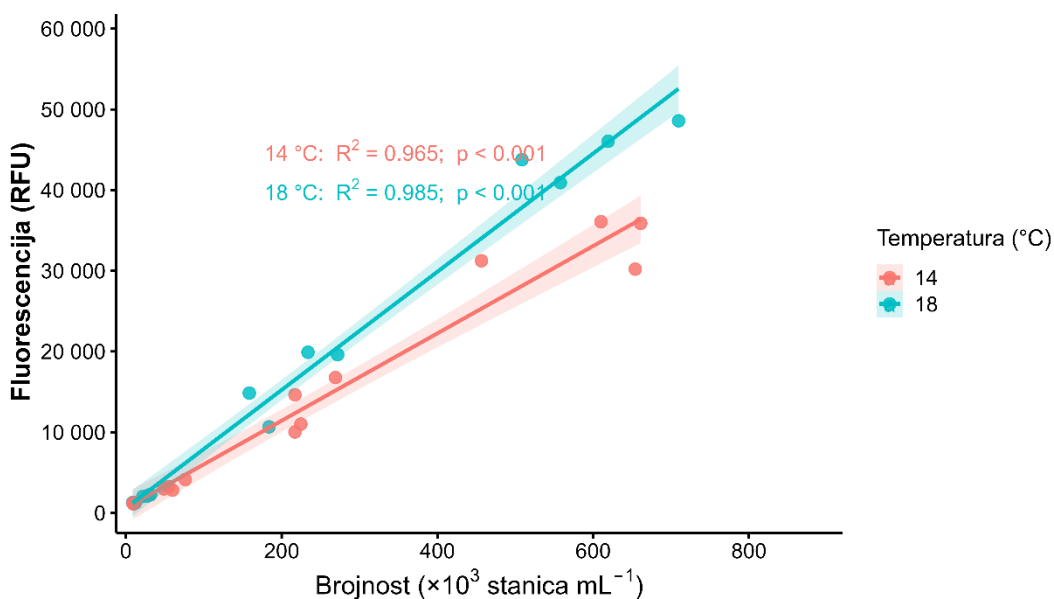
Slika 7.1 Promjena logaritamski transformirane fluorescencije kroz vrijeme za dva izolata vrste *Pseudo-nitzschia galaxiae*. Siva linija prikazuje promjenu vrijednosti log fluorescencije tijekom trajanja pokusa, dok crveni segment označava dio krivulje korišten za izračun stope rasta.



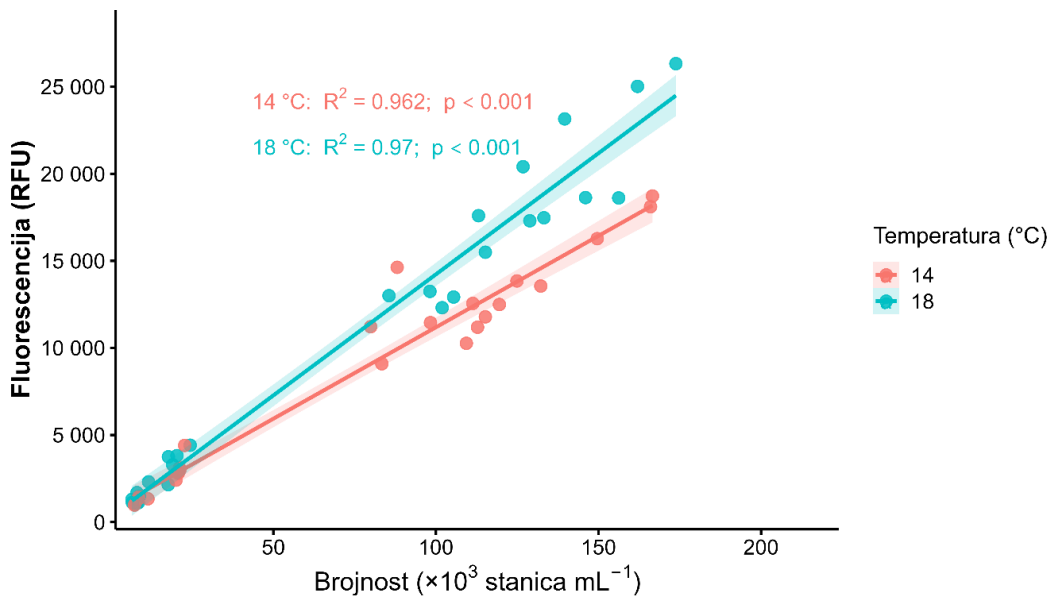
Slika 7.2 Odnos između relativne fluorescencije (RFU) i brojnosti stanica (stanica mL⁻¹) kod vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Isprekidane linije predstavljaju linearne regresijske odnose, a u panelima prikazane su regresijske jednadžbe i koeficijenti determinacije (R²). RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.



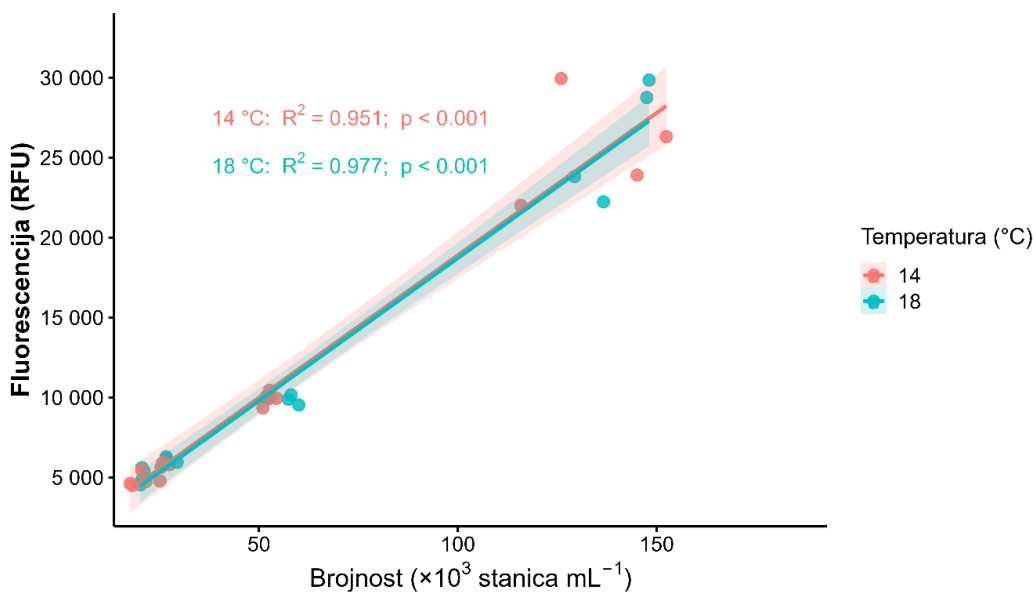
Slika 7.3 Odnos između fluorescencijskog signala (RFU) i brojnosti stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) kod vrste *P. pseudodelicatissima* pri 14 °C i 18 °C. Pune linije prikazuju linearne regresijske odnose, a zasjenjena područja 95 %-tni interval pouzdanosti. Na slici su prikazani koeficijenti determinacije (R^2) i pripadajuće p-vrijednosti za svaku temperaturu. RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.



Slika 7.4 Odnos između fluorescencijskog signala (RFU) i brojnosti stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) kod vrste *P. delicatissima* pri 14 °C i 18 °C. Pune linije prikazuju linearne regresijske odnose, a zasjenjena područja 95 %-tni interval pouzdanosti. Na slici su prikazani koeficijenti determinacije (R^2) i pripadajuće p-vrijednosti za svaku temperaturu. RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.



Slika 7.5 Odnos između fluorescencijskog signala (RFU) i brojnosti stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) kod vrste *P. multistriata* pri 14 °C i 18 °C. Pune linije prikazuju linearne regresijske odnose, a zasjenjena područja 95 %-tni interval pouzdanosti. Na slici su prikazani koeficijenti determinacije (R^2) i pripadajuće p-vrijednosti za svaku temperaturu. RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.



Slika 7.6 Odnos između fluorescencijskog signala (RFU) i brojnosti stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) kod vrste *P. multiseriis* pri 14 °C i 18 °C. Pune linije prikazuju linearne regresijske odnose, a zasjenjena područja 95 %-tni interval pouzdanosti. Na slici su prikazani koeficijenti determinacije (R^2) i pripadajuće p-vrijednosti za svaku temperaturu. RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.

Tablica 7.1 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* u tretmanima T1–T4 pri 18 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tretman	Temperatura (°C)	Replika	Dan 0	Faza 1	Faza 2	Faza 3	Faza 4
T1	18	a	9,88	58,98	228,80	416,64	228,80
T1	18	b	8,34	68,10	245,18	358,81	221,61
T1	18	c	7,96	68,39	255,35	519,18	369,30
T2	18	a	7,88	69,30	212,00	340,60	310,94
T2	18	b	10,67	67,99	200,37	295,05	233,49
T2	18	c	7,98	70,03	190,93	247,90	138,14
T3	18	a	3,20	19,02	65,60	111,90	80,50
T3	18	b	3,28	23,24	84,28	162,41	106,80
T3	18	c	3,52	34,55	96,91	243,85	118,46
T4	18	a	9,79	74,46	250,72	530,40	404,60
T4	18	b	8,87	64,22	240,34	523,26	345,17
T4	18	c	11,03	86,07	300,02	646,74	506,97

Tablica 7.2 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* u tretmanima T1–T4 pri 14 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tretman	Temperatura (°C)	Replika	Dan 0	Faza 1	Faza 2	Faza 3	Faza 4
T1	14	a	9,07	46,34	175,10	502,40	459,20
T1	14	b	8,94	47,98	185,28	520,31	595,89
T1	14	c	8,58	44,74	178,78	507,81	473,57
T2	14	a	7,71	49,32	169,80	479,60	373,60
T2	14	b	8,05	58,35	207,32	396,41	327,81
T2	14	c	7,56	66,77	227,42	411,27	273,86
T3	14	a	2,90	19,86	54,16	301,00	172,40
T3	14	b	2,98	14,04	43,57	301,83	219,19
T3	14	c	2,85	14,24	28,14	89,90	50,83
T4	14	a	10,34	42,14	152,70	688,80	623,28
T4	14	b	10,55	59,16	146,47	634,89	606,92
T4	14	c	9,88	81,77	153,87	541,54	470,99

Tablica 7.3 Tablica 5.2a. Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima* u tretmanima T1–T4 pri 18 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tretman	Temperatura (°C)	Replika	Dan 0	Faza 1	Faza 2	Faza 3	Faza 4
T1	18	a	9,27	31,67	158,40	709,62	412,80

T1	18	b	8,49	28,40	160,41	660,58	236,51
T1	18	c	9,24	28,50	180,80	699,04	1117,72
T2	18	a	11,89	28,93	183,71	619,20	641,00
T2	18	b	11,38	24,22	113,73	572,38	369,35
T2	18	c	12,64	26,34	154,69	632,19	871,44
T3	18	a	9,16	27,57	271,80	557,78	350,61
T3	18	b	10,22	27,30	290,36	585,29	91,19
T3	18	c	8,63	28,04	260,82	594,34	99,75
T4	18	a	8,41	21,67	233,70	508,47	367,65
T4	18	b	7,25	22,96	228,84	464,12	265,97
T4	18	c	8,33	22,41	93,91	513,17	992,29

Tablica 7.4 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima* u tretmanima T1–T4 pri 14 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tretman	Temperatura (°C)	Replika	Dan 0	Faza 1	Faza 2	Faza 3	Faza 4
T1	14	a	9,88	76,13	224,67	661,00	566,00
T1	14	b	9,49	85,34	215,78	665,03	75,58
T1	14	c	9,37	75,73	219,19	658,44	728,89
T2	14	a	12,18	54,93	217,00	610,00	467,00
T2	14	b	13,65	52,48	198,62	661,47	595,89
T2	14	c	12,00	56,86	203,31	625,57	516,87
T3	14	a	9,55	60,00	217,00	654,00	698,40
T3	14	b	10,81	52,08	193,06	581,16	373,44
T3	14	c	9,91	50,93	213,74	585,53	279,34
T4	14	a	8,93	48,73	269,00	456,50	542,40
T4	14	b	8,56	51,78	119,87	442,37	562,10
T4	14	c	9,34	46,21	116,22	476,99	605,18

Tablica 7.5 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multistriata* u tretmanima T1–T7 pri 14 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tretman	Temperatura (°C)	Replika	Dan 0	Faza 1	Faza 2	Faza 3	Faza 4
T1	14	a	7,92	21,24	119,52	166,00	165,90
T1	14	b	7,54	24,19	129,97	157,39	151,25
T1	14	c	7,18	24,64	121,59	161,50	192,59
T2	14	a	7,16	11,44	79,92	149,60	158,70

T2	14	b	8,34	14,70	81,32	138,77	115,36
T2	14	c	7,46	24,22	89,24	158,30	127,38
T3	14	a	8,06	21,12	88,08	166,60	169,20
T3	14	b	7,90	21,31	87,65	158,79	144,40
T3	14	c	7,70	22,61	83,24	160,67	144,45
T4	14	a	8,11	20,78	109,36	112,80	129,00
T4	14	b	6,71	18,99	92,12	108,54	163,97
T4	14	c	7,30	32,98	115,98	114,98	116,20
T5	14	a	8,07	4,06	115,20	124,92	150,60
T5	14	b	6,77	5,48	114,43	119,94	190,34
T5	14	c	7,17	3,99	132,86	134,34	185,52
T6	14	a	6,59	5,86	83,36	111,36	148,82
T6	14	b	5,68	5,28	79,44	112,97	143,11
T6	14	c	5,96	4,94	91,46	111,45	154,50
T7	14	a	6,07	2,46	98,32	132,24	152,70
T7	14	b	5,83	2,43	101,12	139,18	184,56
T7	14	c	5,49	2,47	91,36	123,13	203,19

Tablica 7.6 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia multistriata* u tretmanima T1–T7 pri 18 °C. Replike (a, b, c) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tretman	Temperatura (°C)	Replika	Dan 0	Faza 1	Faza 2	Faza 3	Faza 4
T1	18	a	8,47	17,66	98,16	156,20	145,75
T1	18	b	8,44	19,43	100,64	171,84	157,25
T1	18	c	8,58	22,25	104,46	181,39	191,57
T2	18	a	7,41	11,62	85,56	139,60	102,40
T2	18	b	6,84	11,85	84,30	129,57	89,46
T2	18	c	7,93	9,98	84,65	132,37	114,00
T3	18	a	6,53	8,06	113,10	162,00	156,86
T3	18	b	6,38	9,65	107,79	151,33	139,19
T3	18	c	6,22	9,00	106,35	159,25	147,67
T4	18	a	7,35	3,40	101,92	146,00	132,20
T4	18	b	7,25	14,03	115,85	148,88	164,71
T4	18	c	7,30	13,69	115,49	129,88	120,72
T5	18	a	8,47	4,39	115,20	126,80	141,94
T5	18	b	8,08	4,28	120,74	121,75	161,62
T5	18	c	8,98	4,21	124,93	133,36	143,54
T6	18	a	7,73	5,31	105,44	133,20	135,00
T6	18	b	7,57	5,12	109,93	142,24	147,06
T6	18	c	6,79	5,41	106,68	154,85	127,99
T7	18	a	6,17	3,22	128,88	173,80	205,33

T7	18	b	5,86	3,14	98,46	141,47	164,66
T7	18	c	5,64	2,67	91,39	153,51	150,49

Tablica 7.7 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* u tretmanima T1–T4 pri 18 °C. Replike (a, b) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tretman	Temperatura (°C)	Replika	Dan 0	Faza 1	Faza 2	Faza 3	Faza 4
T1	18	a	20,20	26,66	60,00	148,09	162,42
T1	18	b	21,18	27,07	61,36	158,14	159,17
T2	18	a	20,62	26,80	58,08	147,50	139,03
T2	18	b	20,13	23,56	58,13	127,22	126,07
T3	18	a	21,12	27,36	51,83	136,62	116,59
T3	18	b	18,46	25,95	52,91	150,71	138,66
T4	18	a	20,58	29,44	57,40	129,36	140,51
T4	18	b	20,04	29,62	55,98	110,55	114,22

Tablica 7.8 Brojnost stanica ($\times 10^3$ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multiseriis* u tretmanima T1–T4 pri 14 °C. Replike (a, b) predstavljaju paralelne uzorke. Dan 0 odnosi se na početnu točku, odnosno inokulaciju.

Tretman	Temperatura (°C)	Replika	Dan 0	Faza 1	Faza 2	Faza 3	Faza 4
T1	14	a	17,60	25,10	54,38	125,97	115,39
T1	14	b	16,80	27,04	52,94	104,68	92,30
T2	14	a	18,18	25,38	51,00	115,86	103,25
T2	14	b	19,19	25,14	57,32	108,23	102,66
T3	14	a	21,58	27,50	52,63	152,42	117,28
T3	14	b	23,96	28,09	52,51	166,66	117,89
T4	14	a	20,54	25,80	52,63	145,07	102,57
T4	14	b	21,22	28,42	54,61	153,90	119,63

9 Sažetak na engleskom jeziku

This study represents the first comprehensive analysis of the toxicity of *Pseudo-nitzschia* species from shellfish farming areas of the central Adriatic Sea, with an emphasis on the growth dynamics of the analysed cultures and their potential threat to the marine ecosystem. Species of this genus are common members of the Adriatic phytoplankton community and are of particular interest due to their ability to synthesise the neurotoxin domoic acid (DA), which causes amnesic shellfish poisoning (ASP). Established cell cultures were analysed under standard laboratory conditions and under modified conditions of temperature and nutrient availability. Growth was monitored by determining cell abundance, growth rate and fluorescence signal, while DA production was determined using LC–MS/MS. Under standard conditions, eight species and 54 isolates of the genus *Pseudo-nitzschia* were analysed, with measurable DA production confirmed in *P. pseudodelicatissima*. The toxin was detected in 11 of the 12 isolates of this species, with values ranging from 0.0007 to 0.0250 pg cell⁻¹. Under modified growth conditions, four species were analysed: *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima*, *P. multistriata* and *P. multiseriis*. Temperature and nutrient availability significantly affected the growth of individual species, but the response was not equally reflected in all growth indicators. Under modified conditions, DA production was confirmed in *P. pseudodelicatissima* and *P. multiseriis*. In *P. pseudodelicatissima*, DA values were lower, ranging from 0.001071 to 0.005823 pg cell⁻¹, whereas *P. multiseriis* showed a substantially higher toxic potential, with values ranging from 0.420 to 10.146 pg cell⁻¹. The highest DA value in *P. multiseriis* was recorded at 18 °C in the combined nutrient-reduction treatment during the late growth phase. The results confirm that species of the genus *Pseudo-nitzschia* differ in growth dynamics and toxic potential, and that DA production depends on the species, isolate, growth phase, temperature and nutrient availability. This study contributes to a better understanding of the growth and toxicity of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in the central Adriatic Sea and provides a basis for a more reliable assessment of the risk of DA occurrence in shellfish farming areas.

10 Znanstveni radovi i sudjelovanja na znanstvenim skupovima

Znanstveni radovi:

Tomašević, T.; Arapov, J.; Ujević, I.; Bonačić, T.; Bužančić, M.; Bulić, A.; Skejić, S.; Roje-Busatto, R.; Ninčević Gladan, Ž. Growth Dynamics and Toxin Production of *Pseudo-nitzschia* Species Isolated from the Central Adriatic Sea. *Toxins*, 2025.

Arapov, J.; Bužančić, M.; Skejić, S.; Mandić, J.; Bonačić, T.; Tomašević, T.; Ninčević Gladan, Ž. In situ diversity of the marine diatom genus *Pseudo-nitzschia* based on morphological characterisation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2025.

Hrabar, J.; Babić, I.; Jozić, S.; Trumbić, Ž.; Pioppi, A.; Nielsen, L. J. D.; Maravić, A.; **Tomašević, T.**; Kovacs, Á. T.; Mladineo, I. Prospecting microbiota of Adriatic fish: *Bacillus velezensis* as a potential probiotic candidate. *Animal Microbiome*, 2025.

Bonačić, T.; Arapov, J.; Bušelić, I.; Lepen Pleić, I.; Milić Roje, B.; **Tomašević, T.**; Bužančić, M.; Mladinić, M.; Casabianca, S.; Penna, A.; Skejić, S.; Ninčević Gladan, Ž. Advancing the Taxonomy of the Diatom *Pseudo-nitzschia* Through an Integrative Study Conducted in the Central and Southeastern Adriatic Sea. *Plants*, 2025.

Arapov, J.; **Tomašević, T.**; Bonačić, T.; Pejković, M.; Bužančić, M.; Bušelić, I.; Lepen Pleić, I.; Casabianca, S.; Penna, A.; Skejić, S.; et al. A New Insight into the Taxonomy of *Pseudo-nitzschia* Genus from the Adriatic Sea: Description of *P. brasiliiana*, *P. galaxiae*, *P. hasleana*, and *P. linea*. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2023.

Lepen Pleić, I.; Bušelić, I.; Messina, M.; Hrabar, J.; Žuvić, L.; Talijančić, I.; Žužul, I.; **Pavelin, T.**; Anđelić, I.; Pleadin, J.; Puizina, J.; Grubišić, L.; Tibaldi, E.; Šegvić-Bubić, T. A plant-based diet supplemented with *Hermetia illucens* alone or in combination with poultry by-product meal: one step closer to sustainable aquafeeds for European seabass. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13, 77, 2022. DOI: 10.1186/s40104-022-00725-z.

Hrabar, J.; Smoldaka, H.; Rasouli-Dogaheh, S.; Petrić, M.; Trumbić, Ž.; Palmer, L.; Sakamaki, K.; **Pavelin, T.**; Mladineo, I. Phylogeny and Pathology of Anisakids Parasitizing Stranded California Sea Lions (*Zalophus californianus*) in Southern California. *Frontiers in Marine Science*, 2021.

Sudjelovanje na stručnim i znanstvenim skupovima:

Tomašević, T., Arapov, J., Bonačić, T., Ujević, I., Skejić, S., Bužančić, M., Bulić, A., Roje-Busatto, R., and Ninčević Gladan, Ž. 2025. Toksičnost i dinamika rasta vrsta roda *Pseudo-nitzschia* s područja uzgoja školjkaša u srednjem Jadranskom moru. In *Zbornik sažetaka*, 15.

Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, ed. Bosak, S., Gračan, R., and Korać, P., 284–285. Zagreb: Hrvatsko biološko društvo.

Bonačić, T., Arapov, J., Milić Roje, B., Bušelić, I., Lepen Pleić, I., **Tomašević, T.**, and Ninčević Gladan, Ž. 2024. Molecular and morphological characteristics of *Pseudo-nitzschia* species in the East Adriatic Sea. In *Book of Abstracts of the 15th European Diatom Meeting*, ed. Levkov, Z., Mitic Kopanja, D., and Zaova, D. Ohrid, North Macedonia, May 7–9.

Arapov, J., **Tomašević, T.**, Bonačić, T., Pejković, M., Bužančić, M., Mandić, J., and Bušelić, I. 2024. The occurrence of new *Pseudo-nitzschia* species: *P. brasiliiana*, *P. hasleana* and *P. linea* in the Adriatic Sea. In *Book of Abstracts of the 15th European Diatom Meeting*, ed. Levkov, Z., Mitic Kopanja, D., and Zaova, D. Ohrid, North Macedonia, May 7–9.

Bonačić, T., **Tomašević, T.**, Pejković, M., Bušelić Garber, I., Lepen Pleić, I., Ujević, I., Bulić, A., Roje-Busatto, R., Penna, A., and Casabianca, S. 2023. Diversity and toxigenic characteristics of cultured *Pseudo-nitzschia* species from the East Adriatic Sea. In *Scientific Opportunities for a Global Algal Revolution: Program and Book of Abstracts of 8th European Phycological Congress*, ed. Connan, S., Creis, E., and Jacquemin, B., 212. Brest: Federation of European Phycological Societies.

Bužančić, M., Arapov, J., Skejić, S., Bonačić, T., **Tomašević, T.**, Bakrač, A., Straka, M., and Ninčević Gladan, Ž. 2023. A combination of electron microscopy methods for a better view. In *Book of Abstracts of the 2nd Croatian Microscopy Symposium*. Split, November 24–25.

Hrabar, J., **Pavelin, T.**, Šegvić Bubić, T., Jozić, S., Caldach Giner, J., Holhorea, P. G., Pérez-Sánchez, J., and Mladineo, I. 2021. The effect of black soldier fly *Hermetia illucens* crude protein and *Bacillus* spp. supplementation on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) intestinal health status. In *Abstract Book of the 20th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish*, 86.

11 Kratki životopis

Rođena sam 17.10.1994. godine u Splitu. Godine 2013. završila sam Drugu jezičnu gimnaziju u Splitu. Godine 2016. završila sam preddiplomski sveučilišni studij Biologija i kemija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Splitu, a 2018. godine diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija na istom fakultetu.

Od 2019. godine zaposlena sam na Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. U razdoblju od 2019. do 2021. godine radila sam u Laboratoriju za akvakulturu, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Anisakis kao kancerogen: Izazov rušenja Lancetovog mita ili otkrivanje prave istine“, a od 2021. godine radim u Laboratoriju za plankton i toksičnost školjkaša. U sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Ekologija i toksičnost vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u obalnim vodama srednjeg i južnog Jadrana“ razvila sam istraživački fokus na toksične dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia*, domoičnu kiselinu i štetna cvjetanja algi. Doktorski sveučilišni studij Biofizike upisala sam 2021. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Doktorsku disertaciju izradila sam pod mentorstvom dr. sc. Jasne Arapov, više znanstvene suradnice i komentorstvom dr. sc. Ivane Ujević, znanstvene savjetnice u trajnom zvanju.

Tijekom dokorskog studija usavršavala sam se u području rada sa staničnim kulturama na stručnom usavršavanju u Urbino te sam sudjelovala na radionici za statističku obradu podataka u programu R. Moje znanstveno područje interesa obuhvaća ekologiju i toksičnost potencijalno toksičnih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*, dinamiku rasta staničnih kultura i čimbenike koji utječu na proizvodnju domoične kiseline u obalnim ekosustavima Jadranskog mora.