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, listopad 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, October 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

Zahvaljujem svojoj mentorici Jasni i komentorici Ivani na stručnom vodstvu, dostupnosti, savjetima i podršci tijekom cijelog procesa izrade ovog doktorskog rada. Hvala vam na vremenu, strpljenju i povjerenju, kao i na svim sugestijama koje su mi pomogle da ovaj rad privedem kraju.

Veliko hvala kolegicama (Tini, Ani, Maji, Balnki i Dori) iz ureda na svakodnevnoj podršci, pomoći i razumijevanju. Hvala vam na razgovorima, savjetima i zajedničkim radnim danima. Bilo je puno lakše prolaziti kroz sve faze ovog puta uz ljude s kojima se moglo podijeliti i izazove i lijepe trenutke.

Posebno zahvaljujem svojim kolegicama i kolegama iz Laboratorija za akvakulturu (Ivani L., Ivani B., Ivani R., Ivi, Luki i Jeri) koji su uz mene od samih početaka. Hvala vam na podršci, pomoći, razumijevanju i svemu što smo tijekom ovih godina zajedno prošli.

Hvala mojoj obitelji (Pavelinima, Svilanima i Tomaševićima) što je uvijek bila uz mene, na strpljenju, razumijevanju i podršci kroz sve faze ovog dugog puta.

Na kraju, najveće hvala mojoj maloj obitelji – mom Josipu i mojoj Mili. Hvala vam što ste moja sigurnost, moja radost i moje najvažnije mjesto. A tebi, moja Mila, zbog koje sve radim – neka jednoga dana znaš da si bila moja najveća motivacija za svaki korak do ovoga cilja.

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 amnezijsko 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 analizirana su 54 izolata u kojima je određeno osam vrsta, 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. multiseries*. 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. multiseries* najveća proizvodnja DK zabilježena pri 18 °C, u kombiniranom nutritivnom stresu.

(122 stranice, 39 slika, 47 tablica, 176 literaturnih navoda, 14 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 dijatomeje, 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: 30.9.2026.

University of Split

Faculty of Science

Ph.D. thesis

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, 54 isolates were analysed, representing eight species, 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. multiseries*. 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. multiseries*, the highest DA production was recorded at 18 °C under combined nutrient limitation.

(122 pages, 39 figures, 47 tables, 176 references, 14 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. Associate Professor Sanja Puljas, PhD

Thesis accepted: 30.9.2026.

Za moju Milu

Sadržaj

Popis slika
Popis tablica
Popis kratica
1 Uvod 1
1.1 Fitoplankton 1
1.2 Morfološka obilježja dijatomeja 3
1.3 Značajke roda *Pseudo-nitszchia* 6
1.3.1 Životni ciklus roda *Pseudo-nitzschia* 8
1.4 Domoična kiselina 10
1.5 Čimbenici proizvodnje domoične kiseline 11
1.6 Toksičnost i ekološki rizici 13
1.7 Dosadašnja istraživanja roda *Pseudo-nitzschia* u Jadranskom moru 14
1.8 Ciljevi i hipoteze istraživanja 16
2 Materijali i metode 17
2.1 Područje istraživanja 17
2.2 Prikupljanje uzoraka, uspostava i održavanje staničnih kultura 19
2.3 Praćenje rasta stanične kulture *in vivo* fluorescencijom 20
2.4 Određivanje brojnosti stanične kulture 21
2.5 Priprema uzoraka za analizu tekućinskom kromatografijom - tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) 22
2.6 Analiza tekućinskom kromatografijom - tandemskom spektrometrijom masa 23
2.7 Ustroj eksperimenata 24
2.8 Eksperimentalni pristup I: analiza staničnih kultura u standardnim uzgojnim uvjetima 25
2.9 Eksperimentalni pristup II: analiza odabranih staničnih kultura u izmijenjenim uvjetima rasta 27
2.9.1 *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps 29
2.9.2 *Pseudo-nitzschia delicatissima* K465de 29
2.9.3 *Pseudo-nitzschia multistriata* S442mu 29
2.9.4 *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms 30
2.10 Analiza podataka 31
3 Rezultati 33
3.1 Analiza staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* pri standradnim uzgojnim uvjetima 33
3.2 Analiza staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* pri izmijenjenim uvjetima uzgoja 49
3.2.1 *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*-izolat K357ps 49
3.2.1.1 Analiza rasta staničnih kultura 49
3.2.1.2 Usporedba rasta izolata K357ps između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela 53
3.2.1.3 Analiza toksičnosti staničnih kultura *P. pseudodelicatissima* 56
3.2.1.4 Rezultati analize vrijednosti domoične kiseline (DK) linearnim mješovitim modelom (LMM) 59
3.2.2 *Pseudo-nitzschia delicatissima*-izolat K465de 62
3.2.2.1 Analiza rasta stanične kulture 62
3.2.2.2 Usporedba rasta izolata K465de između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela 65
3.2.2.3 Analiza toksičnosti staničnih kultura 67

3.2.3 *Pseudo-nitzschia multistriata*-izolat S442mu 67
3.2.3.1 Analiza rasta staničnih kultura 67
3.2.3.2 Usporedba rasta izolata S442mu između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela 71
3.2.3.3 Analiza toksičnosti staničnih kultura 74
3.2.4 *Pseudo-nitzschia multiseries*-izolat T001ms 74
3.2.4.1 Analiza rasta staničnih kultura 74
3.2.4.2 Usporedba rasta izolata T001ms između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela 78
3.2.4.3 Analiza toksičnosti staničnih kultura 79
3.2.4.4 Rezultati analize vrijednosti domoične kiseline (DK) linearnim mješovitim modelom (LMM) 82
4 Diskusija 85
4.1 Dinamika rasta staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* pri standardnim i izmijenjenim uvjetima 85
4.1.1 Brojnost stanica, stope rasta i utjecaj temperature 85
4.1.2 Utjecaj smanjene dostupnosti hranjivih tvari na rast 87
4.2 Toksičnost staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* pri standardnim i izmijenjenim uvjetima 88
4.2.1 Proizvodnja domoične kiseline u istraživanim vrstama 88
4.2.2 Odnos faze rasta i proizvodnje domoične kiseline 90
4.2.3 Utjecaj temperature na proizvodnju domoične kiseline 90
4.2.4 Utjecaj smanjene dostupnosti hranjivih tvari na proizvodnju domoične kiseline 91
5 Zaključci 94
6 Literatura 97
7 Prilozi 110
8 Sažetak na hrvatskom jeziku 118
9 Sažetak na engleskom jeziku 119
10 Znanstveni radovi i sudjelovanja na znanstvenim skupovima 120
11 Kratki životopis 122

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 Morfologija stanice iz roda *Pseudo-nitzscha* (a) stanica u bočnom položaju (presjek kroz apikalnu ravninu -AA i (b) stanica u valvalnom položaju. AA, apikalna os. Preuzeto iz Marić Pfannkuchen, 2013.
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).
Slika 1.4 Shematski prikaz životnog ciklusa roda *Pseudo-nitzschia*. Prilagođeno iz Marić Pfannkuchen, 2013.
Slika 1.5 Molekularna struktura DK i njenih izomera. Prilagođeno iz Lelong i sur., 2012.
Slika 1.6 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 *Pseudo*-nitzschia ili o pojedinom izolatu unutar iste vrste. Sive isprekidane strelice označavaju čimbenike za koje postoje oprečni podatci u literaturi. Preuređeno iz Lelong i sur. (2012).
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 – tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS).
Slika 2.3 Pojednosatvljeni shematski prikaz uzgoja staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* u stanardnim uvjetima.
Slika 2.4 Shematski prikaz uzgoja četiri stanične kulture *Pseudo-nitzschia* pri izmijenjenim uvjetima-kontroliranim promjenama temperature i smanjene dostupnosti hranjivih tvari.
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 allochrona*. 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 kontrolnom tretmanu (T1) te tretmanima sa smanjenom dostupnošću fosfata (T2, -50 % fosfata), silikata (T3, -50 % silikata) i kombiniranim smanjenjem fosfata i silikata (T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) 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 kontrolnom tretmanu (T1) te tretmanima sa smanjenom dostupnošću fosfata (T2, -50 % fosfata), silikata (T3, -50 % silikata) i kombiniranim smanjenjem fosfata i silikata (T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) 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 različitim nutritivnim tretmanima 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 eksponencijalna faza, 2 - kasna eksponencijalna 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.

Slika 3.16 Vrijednosti *in vivo* fluorescencije stanične kulture *P. delicatissima* K465de praćen fluorescencijom (RFU) kroz vrijeme (dan) u tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%) 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 – kontrolni tretman; T2 –smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%) 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-nitszchia multistriata* S442mu praćen fluorescencijom (RFU) u tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) 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 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 %) smanjena dostupnost fosfata i silikata. 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 multiseries* T001ms u tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) 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 multiseries* T001ms u tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) 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 multiseries* (T001ms) uzgajane pri temperaturama od 14 i 18 °C u različitim nutritivnim uvjetima. 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 multiseries* (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 (R^2). 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. multiseries* 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 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.
Tablica 2.3 Popis analiziranih staničnih kultura pri izmijenjenim eksperimentalnim uvjetima (kontroliranim promjenama temperature i smanjene dostupnosti hranjivih tvari) s područjem izolacije i datumima uzorkovanja.
Tablica 2.4 Opis tretmana sa smanjenom dostupnošću hranjivih tvari primijenjenih u eksperimentima sa staničnim kulturama roda *Pseudo-nitzschia*.
Tablica 2.5 Proširenje eksperimentalnog dizajna za vrstu *Pseudo-nitzschia multistriata*.
Tablica 3.1 Popis analiziranih izolata vrste *P. allochrona* 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}).
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 ($\times 10^3$ 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 ($\times 10^3$ 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 ($\times 10^3$ 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 ($\times 10^3$ 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 ($\times 10^3$ 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 ($\times 10^3$ 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 ($\times 10^3$ 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 stanici.
Tablica 3.10 Sažetak izmijerenih vrijednosti prosječne fluorescencije (RFU) po tretmanu i temperaturi *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*-K357ps.
Tablica 3.11 Učinci tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 –smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%), temperature (14°C i 18°C) i dana mjerenja na log-transformirani fluorescencijski signal stanične kulture *P. pseduodelicatissima* prema linearnom mješovitom modelu. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti.
Tablica 3.12 Post-hoc usporedbe tretmana (promjenjene vrijednosti hranjivih soli, T1 – kontrolni tretman; T2 –smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%) 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 – kontrolni tretman; T2 –smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%), 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 (promjenjene vrijednosti hranjivih soli, kontrolni tretman-T1, T2, -50 % fosfata, silikata, T3, -50 % silikata i T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) 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 (promjenjene vrijednosti hranjivih soli, kontrolni tretman-T1, T2, -50 % fosfata, silikata, T3, -50 % silikata i T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) 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 (promjenjene vrijednosti hranjivih soli, T1-kontrolni tretman, T2, -50 % fosfata, silikata, T3, -50 % silikata i T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) 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 izmijerenih vrijednosti fluorescencije (RFU) po tretmanu i temperaturi *Pseudo-nitzschia multistriata*-S442mu.
Tablica 3.24 Učinci tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 %) temperature i dana mjerenja na fluorescencijski signal stanične kulture *Pseudo-nitzschia multistriata* S442mu prema linearnom mješovitom modelu.
Tablica 3.25 Post-hoc usporedbe tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) 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 (T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) 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 izmijerenih vrijednosti fluorescencije (RFU) po tretmanu i temperaturi *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms.
Tablica 3.29 Učinci tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) temperature i vremenske točke mjerenja na log-transformirani fluorescencijski signal za vrstu *P. multiseries* prema linearnom mješovitom modelu.
Tablica 3.30 Post-hoc usporedba temperaturnih uvjeta na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P. multiseries*. Statistički značajna p-vrijednost i odgovarajući smjer razlike označeni su podebljanim slovima.
Tablica 3.31 Prosječne vrijednosti domoične kiseline (DK; pg stanica^{-1}) i pripadajuće standardne devijacije za vrstu *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms uzgajane pri različitim temperaturama (14 i 18 °C), tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) i fazama rasta (1–4).

Tablica 3.32 Učinci tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) temperature i faze uzorkovanja na log-transformiranu koncentraciju domoične kiseline *P. multiseries* prema linearnom mješovitom modelu. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti.

Tablica 3.33 Značajne post-hoc razlike u vrijednosti domoične kiseline (DK; pg stanica^{-1}) među tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata)tijekom faza uzorkovanja kod vrste *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

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

Tablica 7.1 Brojnost stanica (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multiseries* 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 (×10³ stanica mL^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multiseries* 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 CO_2, 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 raširenije 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 – 5 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), salintetom, temperaturom, stabilnošću vodenog stupca te hidrodinamičkim procesima poput miješanja,stratifikacije i gibanja vodenih masa (Margalef, 1978.; Reynolds, 2006; Vilibić i Šantić, 2008).

Fitoplankton karakterizira prisutnost raznolikih fotosintetskih pigmenata koji omogućuju apsorpciju svjetlosne energije u širokom rasponu valnih duljina (između 400 i 700nm). Klorofil *a*, čiji se glavni apsorpcijski maksimumi nalaze u plavom (430–440 nm) i crvenom dijelu spektra (660–680 nm), središnji je fotosintetski pigment prisutan u svim glavnim skupinama fitoplanktona. Zbog toga se njegova koncentracija često koristi kao pokazatelj biomase fitoplanktona i pri procjeni primarne produkcije (Falkowski i Raven, 2007.). Dio apsorbirane energije klorofila a emitira se u obliku fluorescencije, pretežno u crvenom dijelu spektra, što omogućuje njezinu primjenu u praćenju rasta fitoplanktonskih kultura. Uz klorofil *a* prisutni su i dodatni pigmenti koji proširuju raspon valnih duljina dostupnih za fotosintezu. Među njima su klorofil *b* (450–470 i 640–650 nm), klorofil *c* (440–460 i 625–635 nm), karotenoidi te fikobiliproteini. Pripadnici skupine Stramenopila, uključujući dijatomeje, sadrže klorofil *c* i fukoksantin (450–540 nm), mnoge fotosintetske dinoflagelate obilježava peridinin (470–550 nm), dok su klorofite prepoznatljive po klorofilu *b*. Cijanobakterije sadrže fikobiliproteine, među kojima su najčešći fikocijanin (oko 620 nm) i fikoeritrin (približno 495–570 nm). Osim prijenosa svjetlosne energije, pojedini karotenoidi imaju i fotoprotektivnu ulogu jer omogućuju raspršivanje viška energije i smanjuju oštećenje fotosintetskog aparata (Jeffrey i sur., 2011.). Budući da se sastav i relativni udjeli pigmenata razlikuju među taksonomskim skupinama, analiza pigmenata primjenjuje se u istraživanjima sastava fitoplanktonske zajednice. Tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) pojedinačni se pigmenti razdvajaju, identificiraju i kvantificiraju, čime se može procijeniti relativni doprinos glavnih skupina fitoplanktona te pratiti njihove sezonske i prostorno-vremenske promjene (Mackey i sur., 1996.; Jeffrey i sur., 2011.; Dursun i sur., 2021.).

U istraživanjima sastava i taksonomske raznolikosti fitoplanktonskih zajednica uz tradicionalne pristupe, koji uključuju svjetlosnu i elektronsku mikroskopiju te HPLC analizu pigmenata, sve se više primjenjuju molekularne metode, poput analize okolišne DNA (eDNA) i visokoprotočnog sekvencioniranja temeljenog na različitim molekularnim

markerima. Molekularne metode omogućuju prepoznavanje kriptičnih vrsta, odnosno morfološki vrlo sličnih vrsta koje se ne mogu pouzdano razlikovati na temelju mikroskopski vidljivih 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, što potvrđuje i brzi odgovor fitoplanktonske zajednice na unos čestica nastalih požarima (Vrdoljak Tomaš i sur., 2023). Zbog toga se promjene u njegovoj brojnosti, taksonomskom sastavu i fotosintetskoj aktivnosti često koriste kao pokazatelji ekološkog stanja vodenih sustava. Takvi obrasci mogu biti posljedica prirodne varijabilnosti okolišnih uvjeta, ali i antropogenih pritisaka te klimatskih utjecaja, uključujući porast temperature mora, jačanje stratifikacije, izmijenjenu dostupnost hranjivih tvari i 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 amorfni i netopljivi opal ($SiO_2 \cdot \times nH_2O$), 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 ovojnicu (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

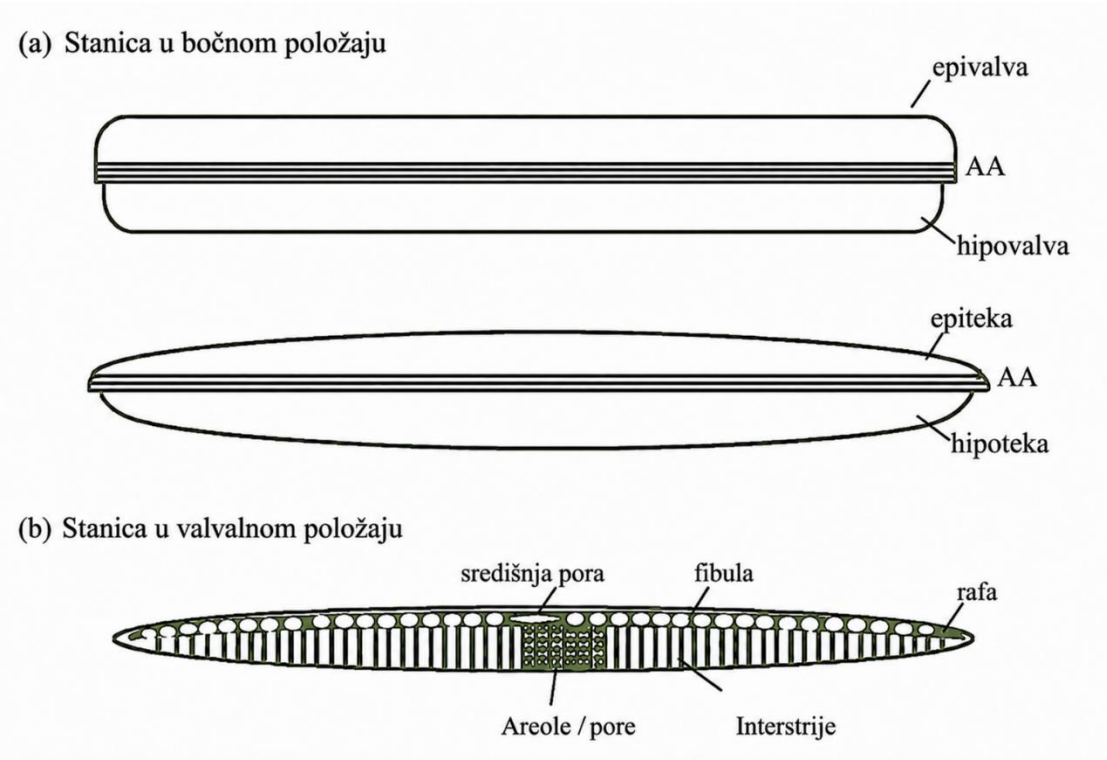
odražava i visoku taksonomsku raznolikost skupine. Unutrašnjost stanice ispunjena je velikom centralnom vakuolom, koja može zauzimati oko 90 % ukupnog volumena stanice (Armbrust 2009; Marić Pfannkuchen, 2013).

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 *Pseudo-nitzschia* 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. multiseries*) (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).



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

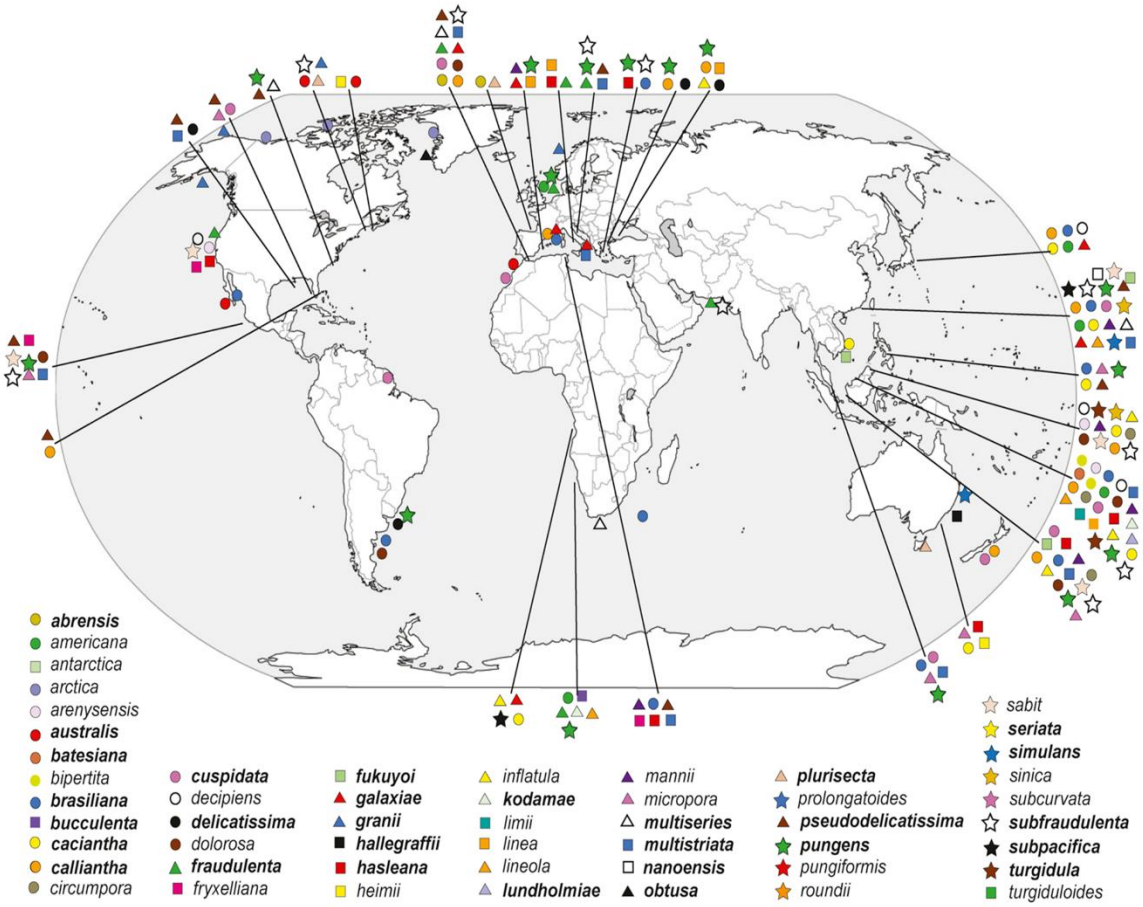
Za precizno određivanje vrsta unutar roda *Pseudo-nitzschia* neophodno je analizirati niz mikromorfoloških obilježja, uključujući broj i raspored strija i fibula, dimenzije valve, oblik završetaka i prisutnost središnje pore. U tu svrhu elektronska mikroskopija je nezaobilazna

(Lundholm i sur., 2003; Trainer i sur., 2012). Tradicionalna taksonomija roda temeljila se na morfologiji i ultrastrukturi 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-nitszchia*

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).

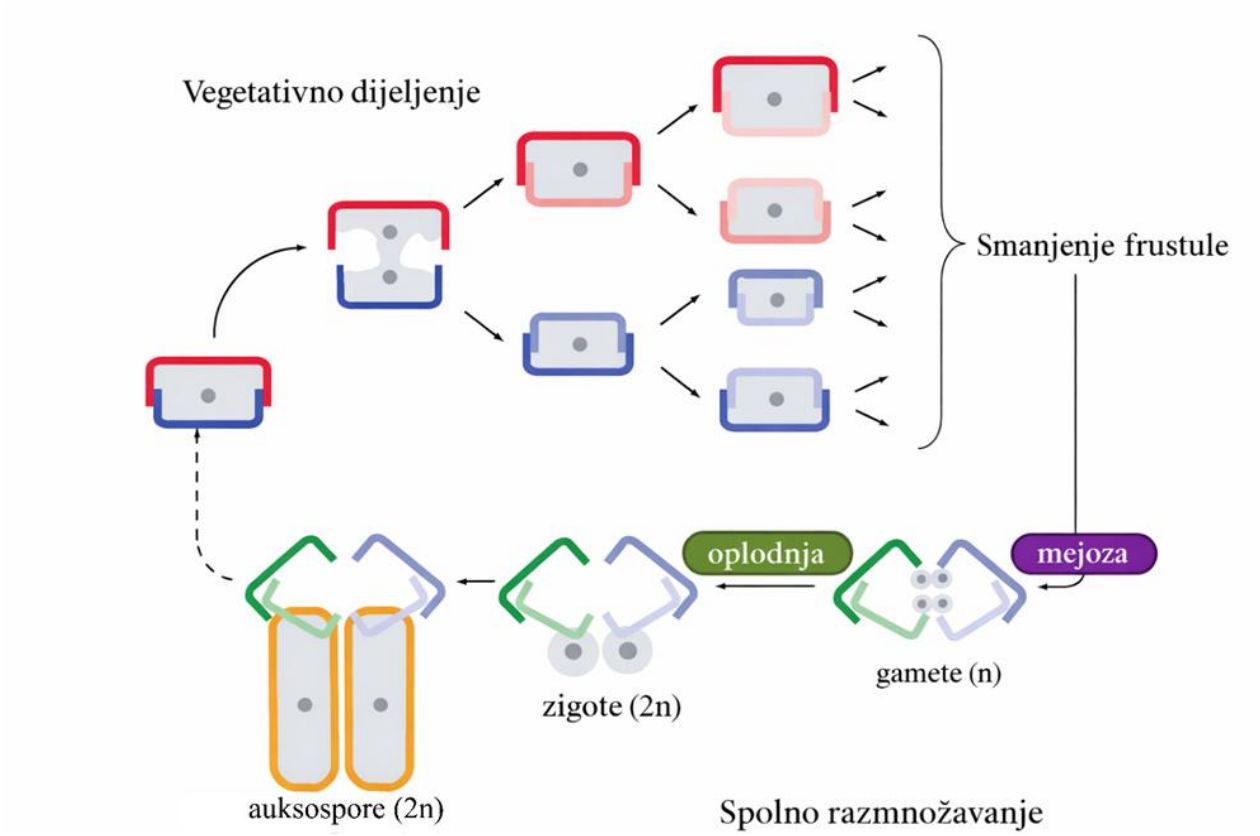
Do danas su unutar roda *Pseudo-nitzschia* opisane 63 vrste, od kojih 28 mogu proizvesti neurotoksin domoiču kiselinu (DK) (Dong i sur., 2020; Lundholm i sur., 2024; von Dassow i sur., 2023; Guiry i Guiry, 2025.). Domoična kiselina se prenosi kroz hranidbeni lanac akumulacijom toksina u školjkašima i 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 gastroeneterološke prirode (proljev, povraćanje i mučnina), no mogu biti i neurološki (gubitak pamćenja i dezorijentacija) zbog čega se trovanje DK naziva i amnezijsko 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 inćuna (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 multiseries* određena kao vrsta odgovorna za pojavu toksina, a u dagnjama (*Mytilus edulis*)

izmjereni su maseni udjeli DK do 790 μg 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 (Quilliami 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 nespolno i spolno. Tijekom nespolnog, 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 1.4).

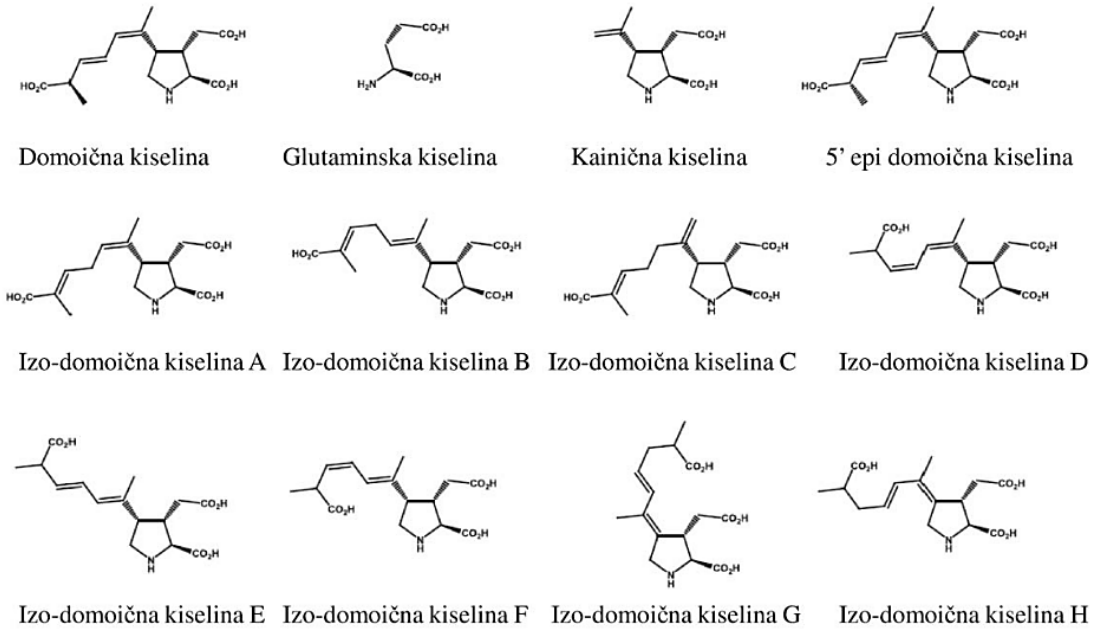


Slika 1.4 Shematski prikaz životnog ciklusa roda *Pseudo-nitzschia*. Prilagođeno iz Marić Pfannkuchen, 2013.

Većina vrsta roda *Pseudo-nitzschia* je heterotalična (iznimka je *P. brasiliana*), 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 kisline. Do sada je opisano više strukturalnih izomera (izo-domoična 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 1.5).



Slika 1.5 Molekularna struktura DK i njenih izomera. Prilagođeno iz Lelong i sur., 2012.

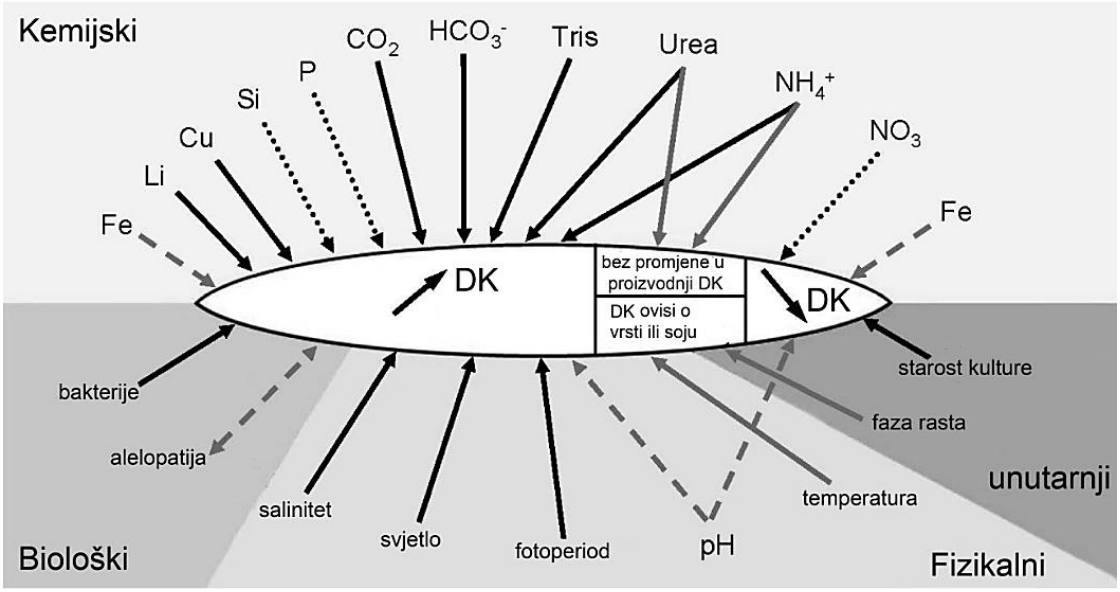
Nakon ulaska u organizam, DK se veže na glutamatne receptore u centralnom živčanom sustavu pri čemu pokazuje afinitet tri puta veći od kainične kiseline i čak stotinu puta veći od glutaminske kiseline. S obzirom na to da DK nije otpuštena iz neurona, uzrokuje produljenju depolarizaciju neurona i povećanu koncentraciju kalcija unutar neurona te posljedično smrt neurona (Lelong i sur., 2012). Neuroni koji se nalaze u hipokampusu (imaju ključnu ulogu u pamćenju, učenju i prostornoj orijentaciji) podložni su oštećenjima, što rezultira anteretogradnom amnezijom ili gubitkom kratoročnog pamćenja pa se zbog toga trovanje DK naziva i amnezijsko 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). Za trovanje domoičnom kiselinom ne postoji specifičan protuotrov, pa se liječenje temelji na simptomatskoj i potpornoj terapiji (Gajski i sur., 2024).

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 kao i izolati iste vrste 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 1.6).



Slika 1.6 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 *Pseudo*-nitzschia ili o pojedinom izolatu unutar iste vrste. Sive isprekidane strelice označavaju čimbenike za koje postoje oprečni podatci 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., 2015). 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., 2018).

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 osvijetljenost, 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 inćunima 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 Cruza 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 inćuna 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 izmijenjuju 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, određen je granični maseni udio, od 20 µg 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 µg 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 µg 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 µg g^{-1} (Ljubešić i sur., 2011; Marić i sur., 2011; Kvrgić i sur., 2022), dok su u srednjem Jadranu zabilježene vrijednosti od 0,17 do 3,24 µg 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 istraživanim 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/jeseni (Marić i sur., 2012; Arapov i sur., 2020; Giulietti i sur., 2021). Tijekom zabilježenih cvatnji, vrste *Pseudo-nitzschia* mogu predvladavaju 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., 2020). 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 vrijednost 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 će se analizirati kroz različite faze rasta te pri standardnim i eksperimentalno izmijenjenim uzgojnim uvjetima;
- izolirati što većei broj staničnih kultura kako bi se omogućila detaljna analiza staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* u kontroliranim laboratorijskim uvjetima;
- u slučajevima pojave DK u tkivu školjkaša na istraživanim područjima provoditi dodatne i češće izolacija 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 izmijenjim 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;

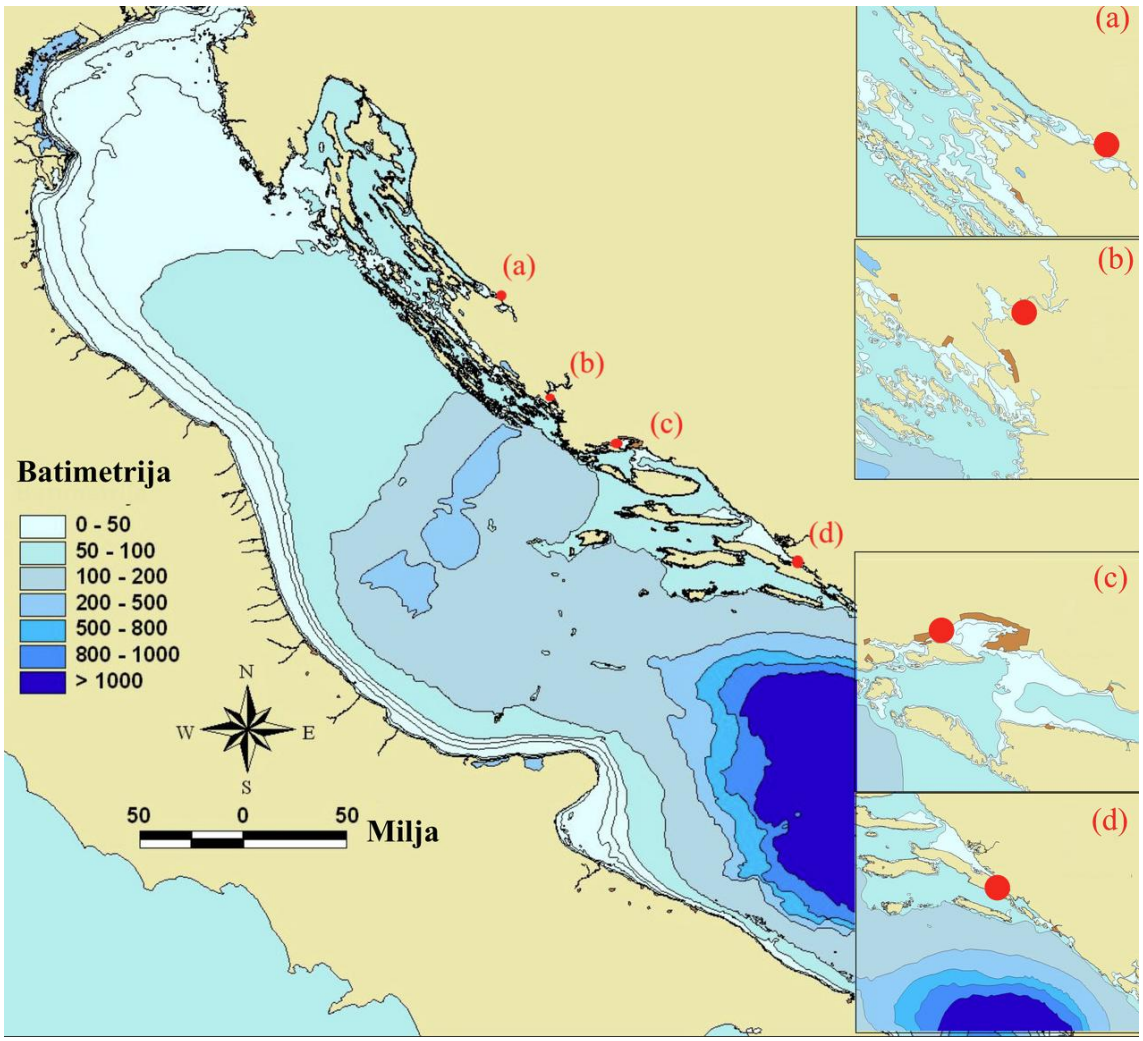
2.3. ne postoji razlika u utjecaju promjene temperature na stopu rasta ispitivanih vrsta;

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 bočatih 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), posbeno 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 rijeke Krke, zbog čega se u vodenom stupcu razvija 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 intezivne 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 ispustima 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 podmorskih 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-nitszchia*. 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, presadila bi se u veći volumen staničnog medija, od 25 do 35 mL. Stanične kulture održavane su u svjetlosnim 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 µmol fotona m^{-2} s^{-1}. Temperatura održavanja staničnih kultura kretala se u rasponu od 14 °C do 20 °C ± 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 ($NaH_2PO_4 \times H_2O$; 5 g/L) te 1 mL stock otopine silikata u obliku natrijeva metasilikata nonahidrata ($Na_2SiO_3 \times 9H_2O$; 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 predfiltracije 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. 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 populaciju bakterija koje ne utječu značajno na rast stanica te 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, stakleni materijal je autoklaviran (121 °C, 20 minuta) 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

Neizravni pokazatelj rasta staničnih kultura praćen je mjerenjem *in vivo* fluorescencije klorofila *a* fluorimetrom (Turner Designs fluorometar, model 7200-000, Turner Designs, San Jose, CA, SAD). 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 očitanje fluorescencije. Intenzitet *in vivo* fluorescencije klorofila a korišten je kao neizravni pokazatelj promjene biomase i rasta staničnih kultura, s obzirom na to da se tijekom uzgoja u pravilu povećava s porastom brojnosti stanica. Svaki poduzorak mjeren je tri puta te je za daljnje analize uzeta aritmetička sredina. Na temelju promjena fluorescencijskog signala tijekom eksperimentalnog razdoblja određene su faze rasta staničnih kultura. 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 razrjeđivanjem 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:

$$Nt\left(\frac{st}{mL}\right) = \left(\frac{n\ (broj\ stanica)}{broj\ izbrojanih\ polja}\right) x1000\ x\ DF$$

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 začepljenja 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, supernatanat 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 – tandemska 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 µm) kolonu povezanu s Poroshell 120 (EC-C18, 2.1 mm x 5 mm, 2,7 µm) 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 pripremljena 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) izračunatata 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:

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

2.7 Ustroj eksperimenata

U svrhu analize toksičnosti i dinamike rasta odabrane su stanične kulture roda *Pseudo-nitzschia* 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 opisanima za održavanje staničnih kultura, dok je drugi obuhvaćao analizu istih parametara pri izmijenjenoj temperaturi i različitim koncentracijama hranjivih tvari.

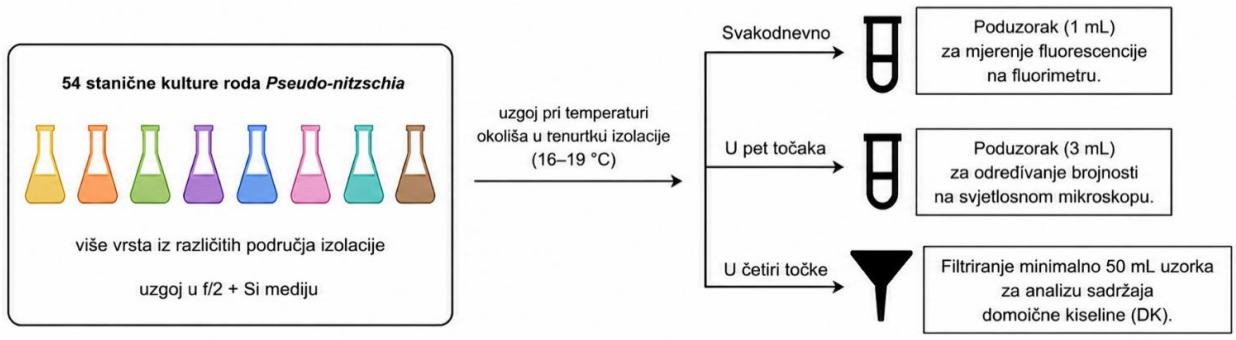
Analize toksičnosti u oba dijela istraživanja provedene su tijekom četiri ključne faze rasta stanične kulture. Faze su određene na temelju promjena gustoće stanica, praćenih fluorimetrijskom metodom mjerenja klorofila:

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 Pojednosatvljeni shematski prikaz uzgoja staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* u stanardnim 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.

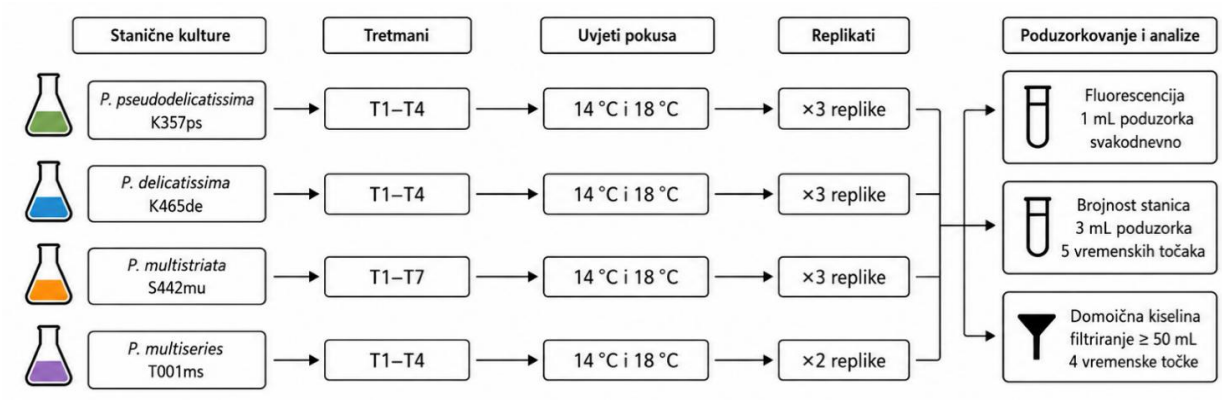
Vrsta	Oznaka vrste	Područje	Datum izolacije	Temperatura tijekom eksperimenta (°C)
P. allochrona	S222al	Šibenik	Sep 2022	19
P. allochrona	S223al	Šibenik	Sep 2022	19
P. allochrona	S280al	Šibenik	Oct 2022	19
P. calliantha	M074ca	Malostonski zaljev	Feb 2022	18
P. calliantha	V061ca	Velebitski Kanal	Feb 2022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

P. pseudodelicatissima	K336ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
P. pseudodelicatissima	K339ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
P. pseudodelicatissima	K340ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
P. pseudodelicatissima	K349ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
P. pseudodelicatissima	K350ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
P. pseudodelicatissima	K351ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
P. pseudodelicatissima	K352ps	Kaštelanski zaljev	Nov 2022	18
P. pseudodelicatissima	K356ps	Kaštelanski zaljev	Dec 2022	18
P. pseudodelicatissima	K357ps	Kaštelanski zaljev	Dec 2022	18
P. pseudodelicatissima	K358ps	Kaštelanski zaljev	Dec 2022	18
P. pseudodelicatissima	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 (kontroliranim promjenama temperature i smanjene dostupnosti hranjivih tvari) odabrane su stanične kulture *P. pseudodelicatissima* K357ps, *P. delicatissima* K465de, *P. multistriata* S442mu i *P. multiseries* 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-kontroliranim promjenama temperature i smanjene dostupnosti hranjivih tvari.

U istraživanje je uključen izolat vrste *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms, podrijetlom iz Mramornog mora, Turska. Usporedna analiza provedena je kako bi se procijenile moguće razlike u fiziološkim i toksikološkim svojstvima među staničnim 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 (kontroliranim promjenama temperature i smanjene dostupnosti hranjivih tvari) s područjem izolacije i datumima uzorkovanja.

Vrsta	Oznaka vrste	Područje	Datum izolacije
P. pseudodelicatissima	K357ps	Kaštelanski zaljev	Dec 2022.
P. delicatissima	K465de	Kaštelanski zaljev	Jan 2024.
P. multistriata	S442mu	Šibenik	Nov 2023.
P. multiseries*	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 (T1), 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 sa smanjenom dostupnošću hranjivih tvari primijenjenih u eksperimentima sa staničnim kulturama roda *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 $NaNO_3$ koncentracije 75 g/L, 1 mL stock otopine $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ koncentracije 5 g/L te 1 mL stock otopine $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ 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.

Stanične kulture *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima* i *P. multistriata* prije početka eksperimenata postupno su prilagođene na smanjenu dostupnost hranjivih tvari. Prilagodba je provedena tijekom najmanje 20 generacija kako bi se smanjio nagli fiziološki stres i omogućila stabilizacija rasta prije početka eksperimentalnih mjerenja (Thorel i sur., 2014; Wingert i Cochlan, 2021). Prilagodba na temperaturu od 14 °C nije provedena.

Broj generacija (k) određivao se mjerenjem *in vivo* fluorescencije (RFU) te se izračunao prema slijedećoj jednadžbi:

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

f_t označava fluorescenciju izmjerenu na kraju odabranog vremenskog intervala, u vremenskoj točki t, dok f_0 označava fluorescenciju izmjerenu na početku istog intervala, u vremenskoj točki t_0 (Lundholm i sur., 2004).

2.9.1 *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps

Stanična kultura *P. pseudodelicatissima* K357ps uzgajana je u f/2 mediju s dodatkom silikata pri temperaturama od 14 °C i 18 °C. Eksperimentalni dizajn uključivao je kontrolni tretman T1 i tri tretmana sa smanjenom dostupnošću hranjivih tvari, T2-T4, prikazana u Tablici 2.4. Svaka kombinacija temperature i tretmana provedena je u tri biološke replike.

2.9.2 *Pseudo-nitzschia delicatissima* K465de

Stanična kultura *P. delicatissima* K465de uzgajana je u f/2 mediju s dodatkom silikata pri temperaturama od 14 °C i 18 °C. Primijenjeni su tretmani T1-T4 opisani u Tablici 2.4, a svaka kombinacija temperature i tretmana provedena je u tri biološke replike.

2.9.3 *Pseudo-nitzschia multistriata* S442mu

Za staničnu kulturu *P. multistriata* S442mu primijenjen je prošireni eksperimentalni dizajn koji je, uz tretmane T1-T4, uključivao i tretmane s većim smanjenjem dostupnosti fosfata i/ili

silikata (Tablica 2.5). Eksperiment je proveden pri temperaturama od 14 °C i 18 °C, u tri biološke replike za svaku kombinaciju temperature i tretmana.

Tablica 2.5 Proširenje eksperimentalnog dizajna za vrstu *Pseudo-nitzschia multistriata*.

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 % fosfata	14 °C i 18 °C
T6	–75 % silikata	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.

2.9.4 *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms

Stanična kultura *P. multiseries* T001ms, podrijetlom iz Mramornog mora, održavana je u K mediju, koji se standardno koristi u laboratoriju iz kojeg stanična kultura potječe (Keller i sur., 1987). Stanična kultura *P. multiseries* nije prebačena u f/2 + Si medij kako bi se izbjegao dodatni fiziološki stres i mogući utjecaj nagle promjene medija na rast i metabolizam stanica. K medij razlikovao se od f/2 + Si medija prema sastavu i koncentracijama pojedinih hranjivih tvari. Sadržavao je dodatni izvor anorganskog dušika u obliku NH_4Cl, organski oblik fosfora u obliku Na_2 β-glicerofosfata, višu koncentraciju silikata, drukčiji sastav elemenata u tragovima i veći udio kelatora EDTA. Konačne koncentracije u K mediju iznosile su 882 µM nitrata, 50 µM amonijeva klorida, 10 µM β-glicerofosfata i 504 µM silikata.

Eksperimentalni tretmani temeljili su se na istim relativnim smanjenjima dostupnosti hranjivih tvari kao u f/2 + Si mediju. Primijenjeni su kontrolni tretman T1 i tretmani T2–T4, pri temperaturama od 14 °C i 18 °C.

Stanična kultura *P. multiseries* T001ms pokazivala je sporiji rast, niže stope rasta i nižu brojnost stanica u odnosu na ostale analizirane kulture. Zbog ograničene količine stanične

kulture i slabijeg namnažanja eksperiment je proveden u dvije biološke replike. Faza prethodne prilagodbe na smanjenu dostupnost hranjivih tvari nije provedena, nego je stanična kultura izravno izložena eksperimentalnim tretmanima. Unatoč navedenim ograničenjima, stanična kultura je uključena u istraživanje zbog izraženog toksičnog potencijala vrste *P. multiseries* i mogućnosti usporedbe njezina fiziološkog i toksikološkog odgovora s odgovorima autohtonih izolata.

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 s uzorkom 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 $\alpha = 0{,}05$.

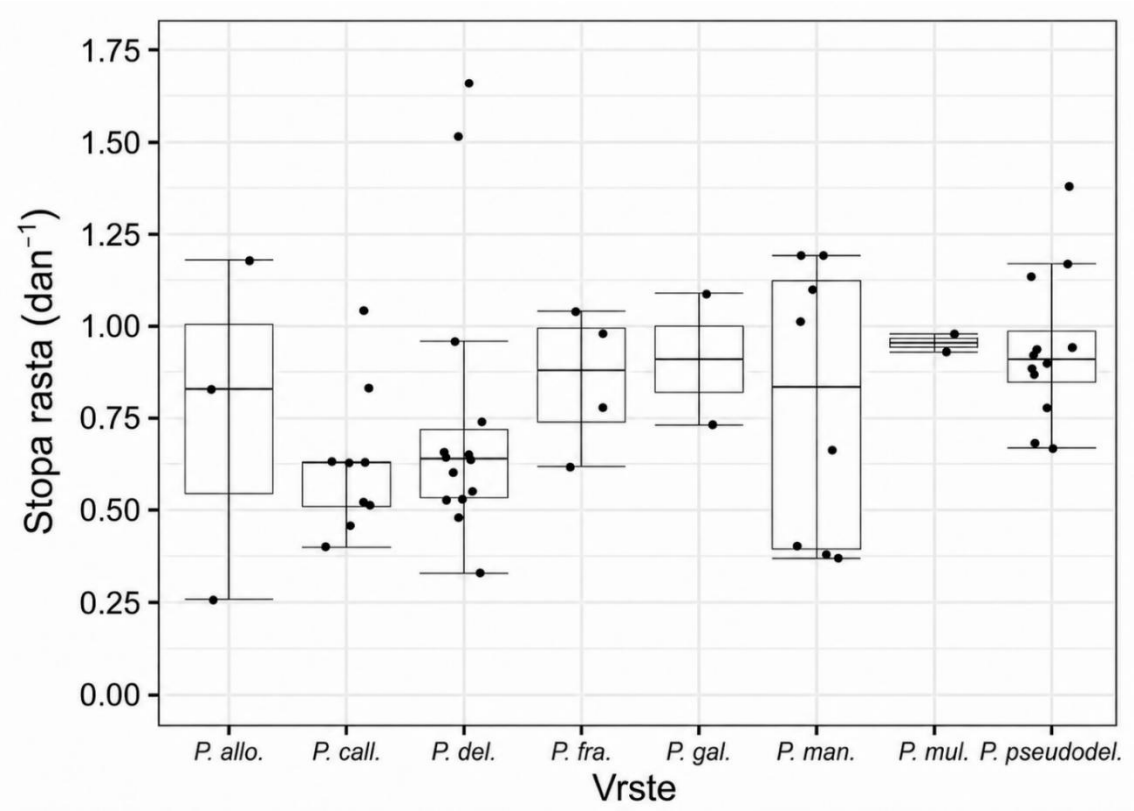
Pretpostavke modela provjerene su analizom reziduala, uključujući QQ-grafove i grafove reziduala u odnosu na predviđene vrijednosti. Stabilnost slučajnog učinka provjerena je funkcijom isSingular. U slučajevima kada je model pokazivao granično rješenje ili kada pojedine kombinacije faktora nisu bile 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 standradnim 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 allochrona, 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. allochrona* 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 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 dan^{-1}. Najniža pojedinačna vrijednost stope rasta zabilježena je kod izolata *P. allochrona* S222al, dok se raspon vrijednosti za ovu vrstu kretao od 0,26 do 1,18 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.

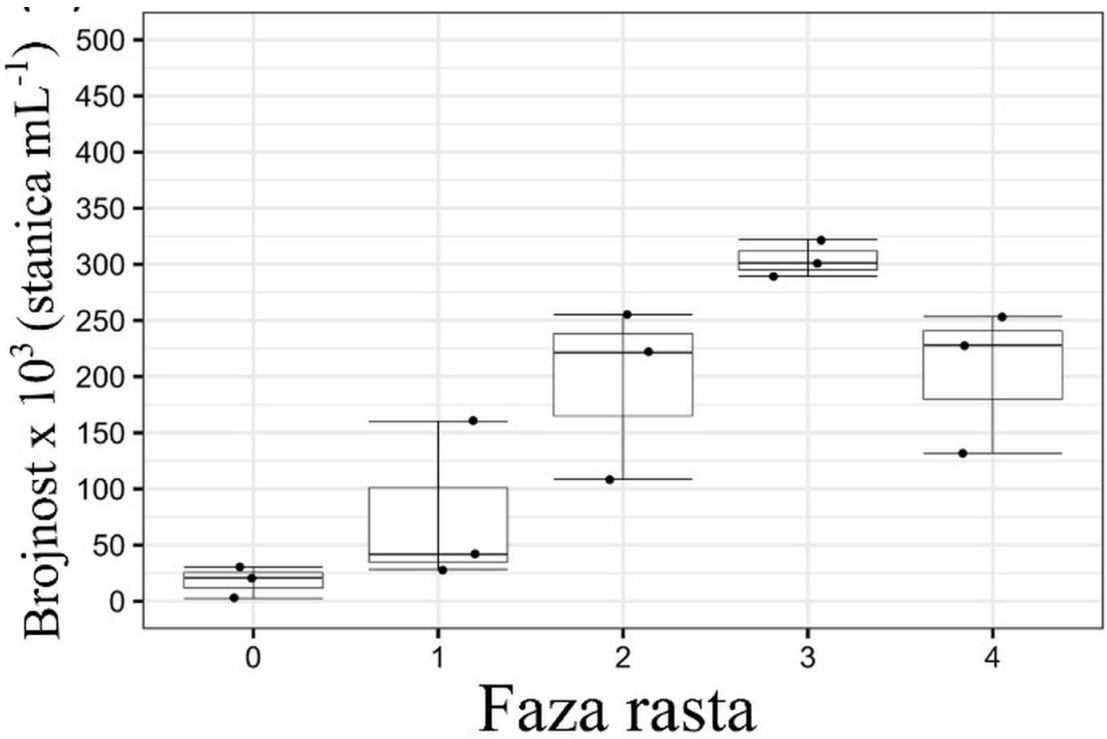
Pseudo-nitzschia allochrona

Analizirana su tri izolata vrste *Pseudo-nitzschia allochrona* (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. allochrona* 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 (×10^3 stanica mL^{-1}).

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

Analize su provedene pri temperaturi od 19 °C. Početna brojnost stanica zabilježena je u rasponu od 2,64 × 10^3 do 30,34 × 10^3 stanica mL^{-1}. Najviše brojnosti zabilježene su u stacionarnoj fazi rasta (faza 3) i iznosile su između 289,40 × 10^3 i 322,20 × 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 izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia allochrona*. 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.

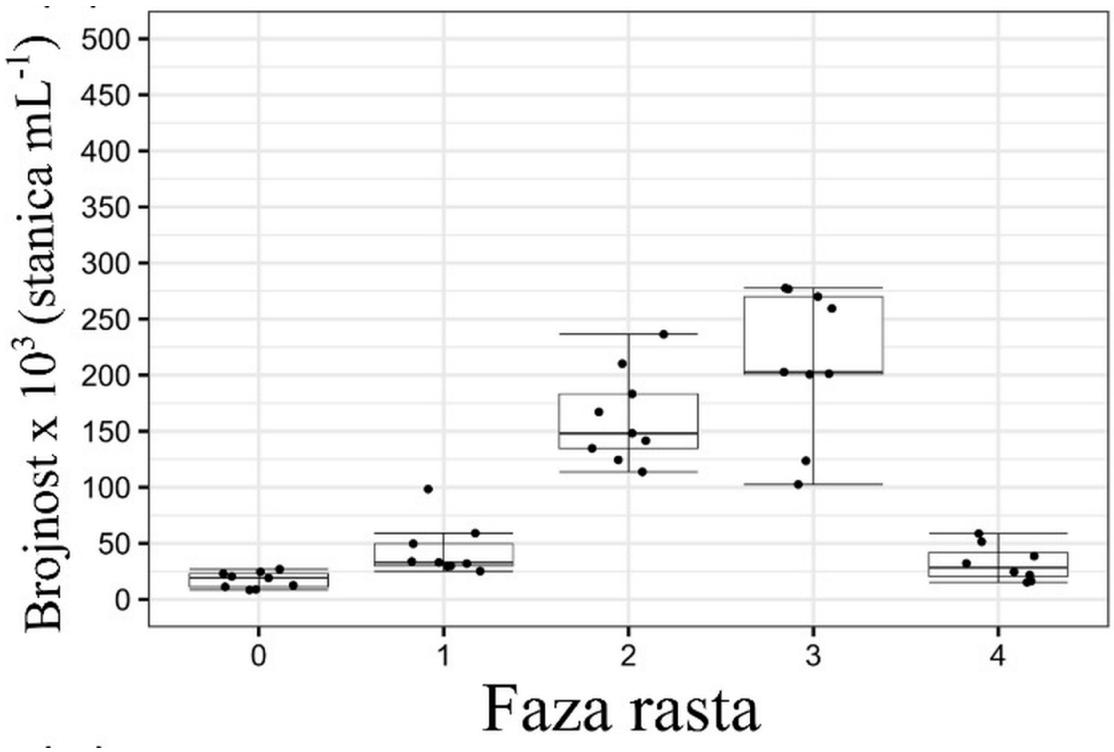
Pseudo-nitzschia calliantha

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 ($\times 10^3$ 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})
***P. calliantha* / M074ca**	< LOD	0,63	201,20
***P. calliantha* / V061ca**	< LOD	0,83	276,68
***P. calliantha* / V065ca**	< LOD	0,51	124,44
***P. calliantha* / V068ca**	< LOD	0,63	277,60
***P. calliantha* / V070ca**	< LOD	1,04	259,40
***P. calliantha* / V071ca**	< LOD	0,46	270,00
***P. calliantha* / V072ca**	< LOD	0,40	202,80
***P. calliantha* / V077ca**	< LOD	0,52	200,60
***P. calliantha* / 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 *Pseudo-nitzschia 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.

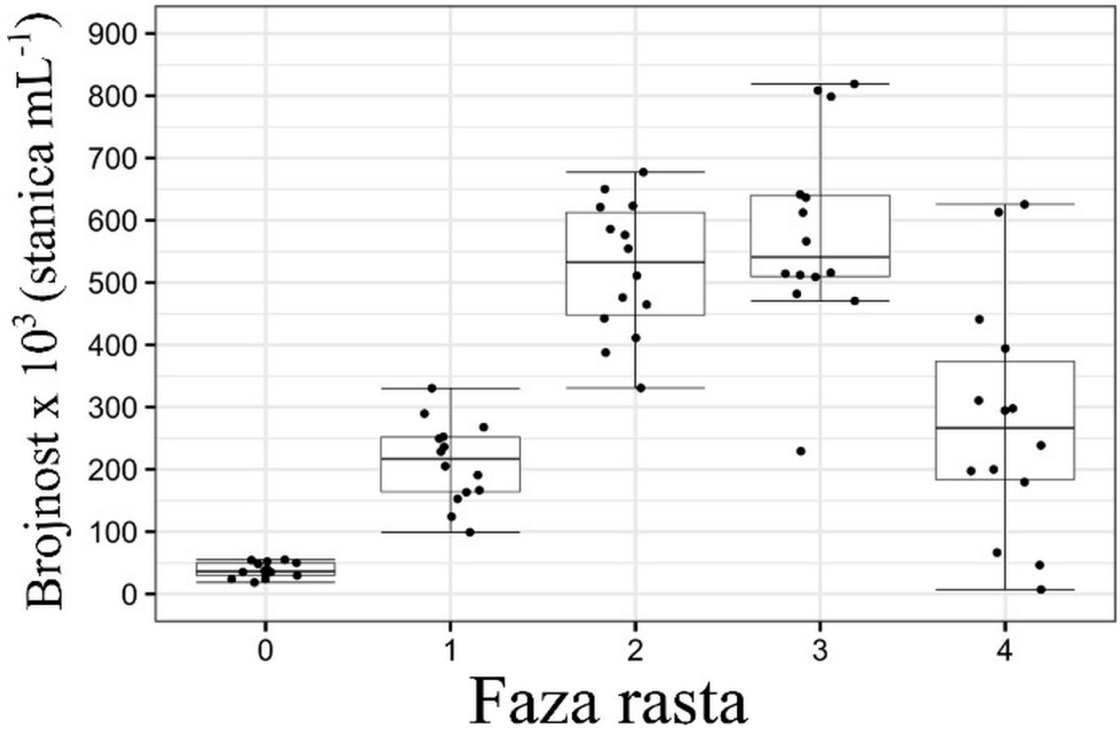
Pseudo-nitzschia delicatissima

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})
***P. delicatissima* / K057de**	< LOD	0,53	512,22
***P. delicatissima* / K058de**	< LOD	0,65	789,60
***P. delicatissima* / K129de**	< LOD	0,64	636,60
***P. delicatissima* / K134de**	< LOD	0,66	515,80
***P. delicatissima* / M075de**	< LOD	0,74	482,00
***P. delicatissima* / M085de**	< LOD	0,96	411,20
***P. delicatissima* / M088de**	< LOD	0,48	509,20
***P. delicatissima* / M144de**	< LOD	0,33	566,40
***P. delicatissima* / M461de**	< LOD	1,66	641,60
***P. delicatissima* / M462de**	< LOD	1,52	514,40
***P. delicatissima* / V040de**	< LOD	0,64	808,60
***P. delicatissima* / V041de**	< LOD	0,55	819,00
***P. delicatissima* / V042de**	< LOD	0,60	612,40
***P. delicatissima* / 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.

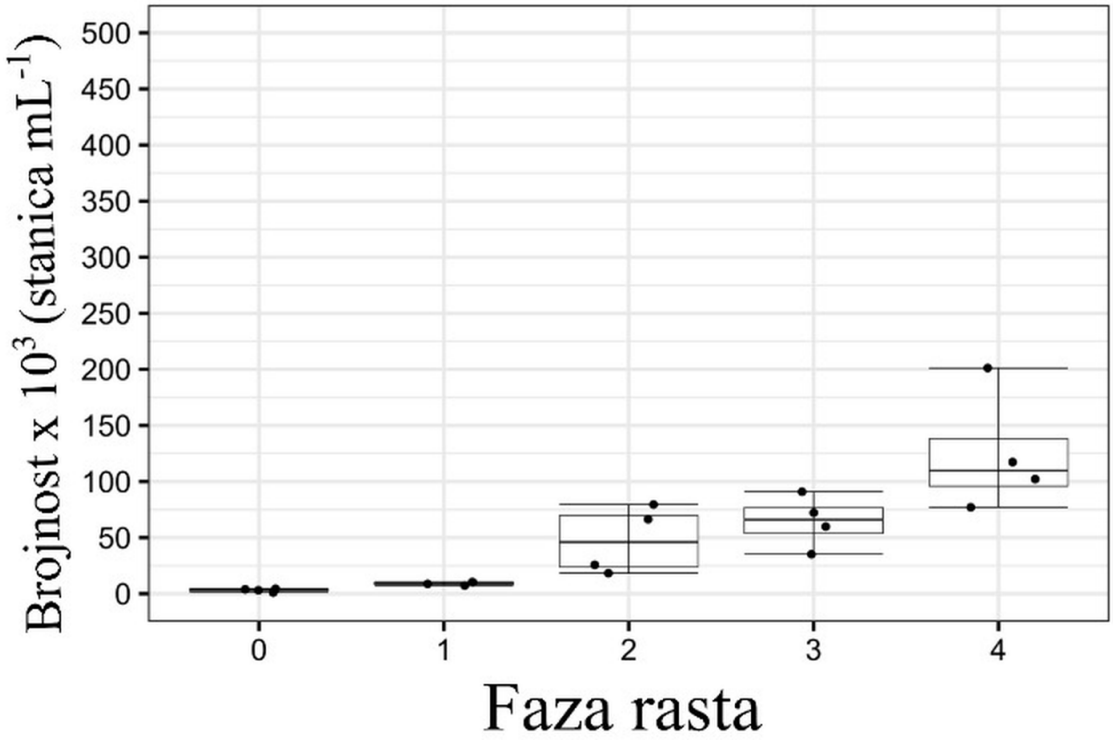
Pseudo-nitzschia fraudulenta

Analizirana su četiri izolata vrste *Pseudo-nitzschia fraudulenta*, 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. 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 (×10^3 stanica mL^{-1}).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL^{-1})	Stopa rasta μ (dan^{-1})	Maks. brojnost ×10^3 (stanica mL^{-1})
***P. fraudulenta* / K450fr**	< LOD	0,98	201,30
***P. fraudulenta* / K455fr**	< LOD	0,78	117,20
***P. fraudulenta* / K456fr**	< LOD	0,62	77,10
***P. fraudulenta* / 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 × 10^3 do 4,51 × 10^3 stanica mL^{-1} (Slika 3.5). Najviše brojnosti stanica zabilježene su u fazi rasta 4 te su iznosile između 77,10 × 10^3 i 201,30 × 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 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.

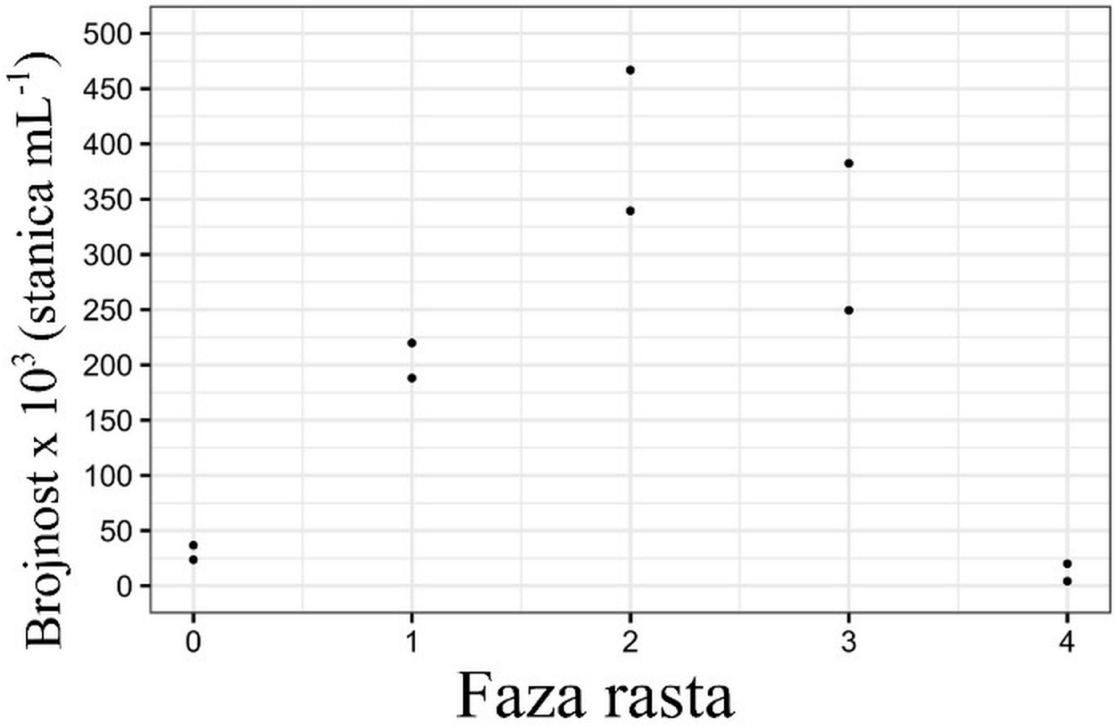
Pseudo-nitzschia galaxiae

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 ($\times 10^3$ 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})
***P. galaxiae* / M136ga**	< LOD	1,09	466,80
***P. galaxiae* / M232ga**	< LOD	0,73	382,40

Početne brojnosti stanica iznosile su 4,28 × 10^3 i 36,76 × 10^3 stanica mL^{-1}, dok su najviše brojnosti stanica iznosile 382,40 × 10^3 i 466,80 × 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 izolate vrsta roda *Pseudo-nitzschia galaxiae*.

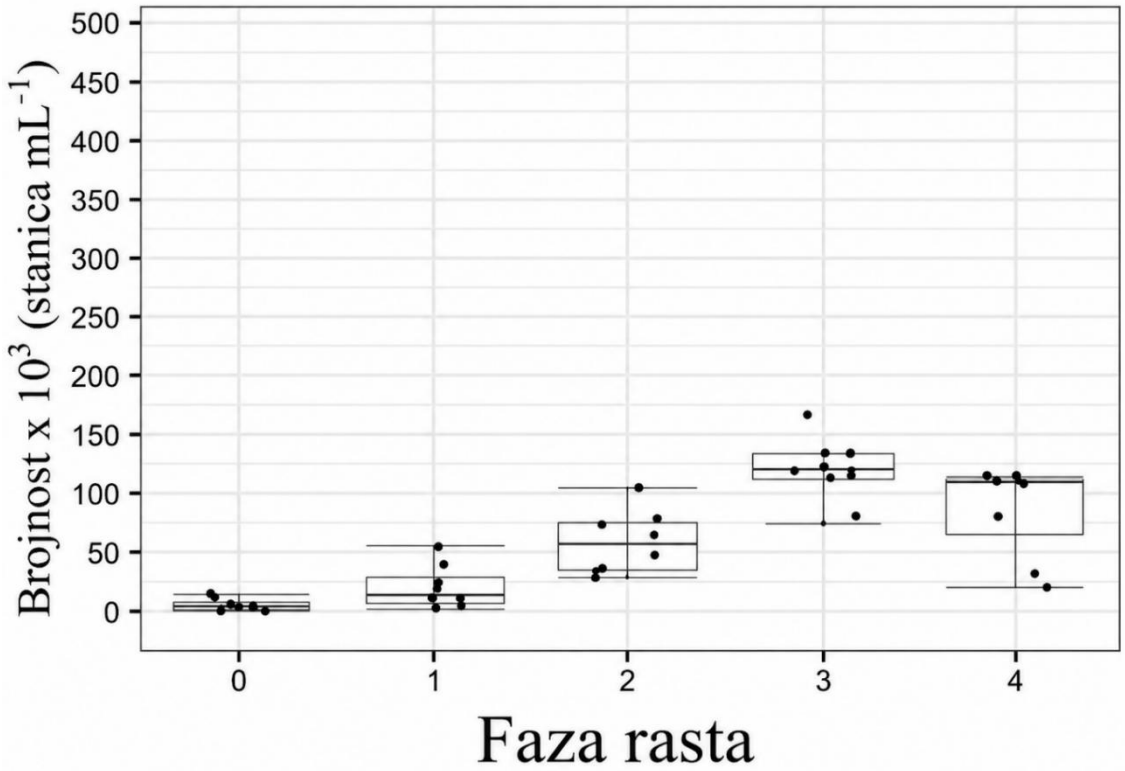
Pseudo-nitzschia mannii

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 ($\times 10^3$ 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})
***P. mannii* / K231ma**	< LOD	0,66	108,70
***P. mannii* / K237ma**	< LOD	0,37	130,80
***P. mannii* / M233ma**	< LOD	0,38	114,70
***P. mannii* / M236ma**	< LOD	1,01	105,30
***P. mannii* / M239ma**	< LOD	1,19	164,35
***P. mannii* / M240ma**	< LOD	1,19	130,80
***P. mannii* / M241ma**	< LOD	0,40	113,20
***P. mannii* / 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 $17{,}10 \times 10^3$ stanica mL^{-1} (Slika 3.7). Najviše brojnosti stanica zabilježene su u fazi rasta 3 (stacionarna faza) te su se kretale u rasponu od $108{,}70 \times 10^3$ do $164{,}35 \times 10^3$ 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

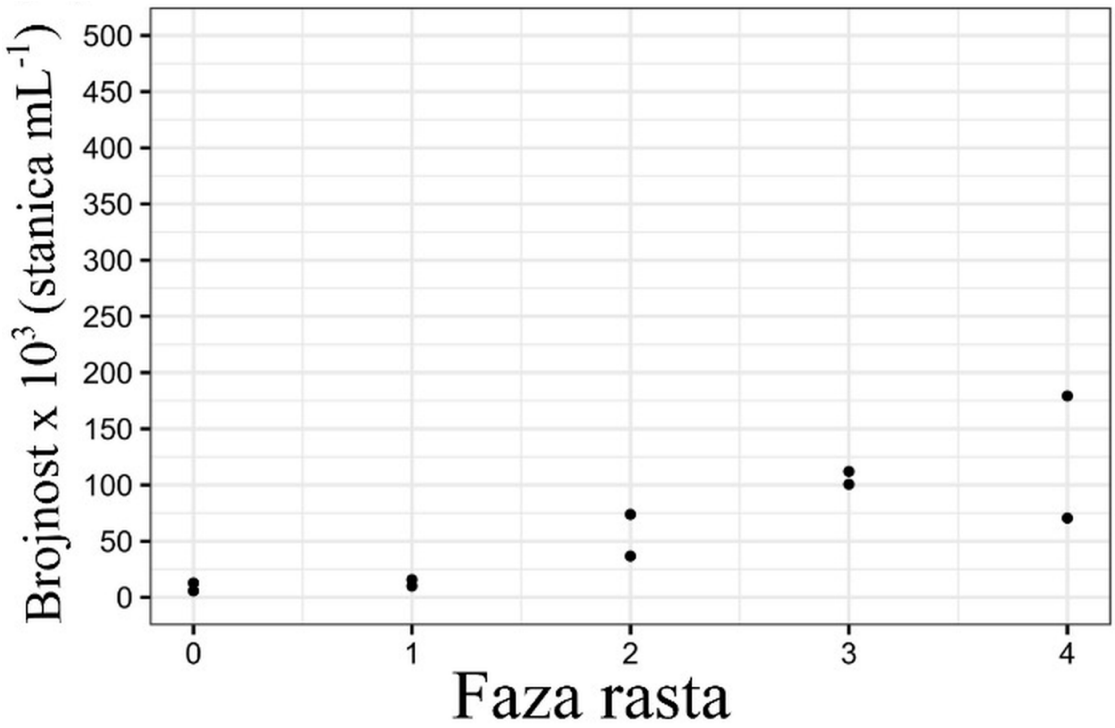
Analizirana su dva izolata vrste *Pseudo-nitzschia multistriata*, izolirana tijekom jeseni iz Šibenskog kanala (S290mu i S442mu) (Tablica 3.7). Izolat S290mu analiziran je pri temperaturi od 18 °C, dok je izolat S442mu analiziran pri temperaturi od 16 °C.

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 (×10³ stanica mL⁻¹).

Vrsta / izolat	pDK u kulturi stanica (ng mL⁻¹)	Stopa rasta μ (dan⁻¹)	Maks. brojnost ×10³ (stanica mL⁻¹)
***P. multistriata* / S290mu**	< LOD	0,93	179,20
***P. multistriata* / S442mu**	< LOD	0,98	100,60

Izolati su inokulirani s početnom brojnošću stanica od 5,67 × 10³ i 12,77 × 10³ stanica mL⁻¹ (Slika 3.8). Najviše brojnosti stanica u kulturi iznosile su 100,60 × 10³ stanica mL⁻¹ za izolat S290mu te 179,20 × 10³ 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

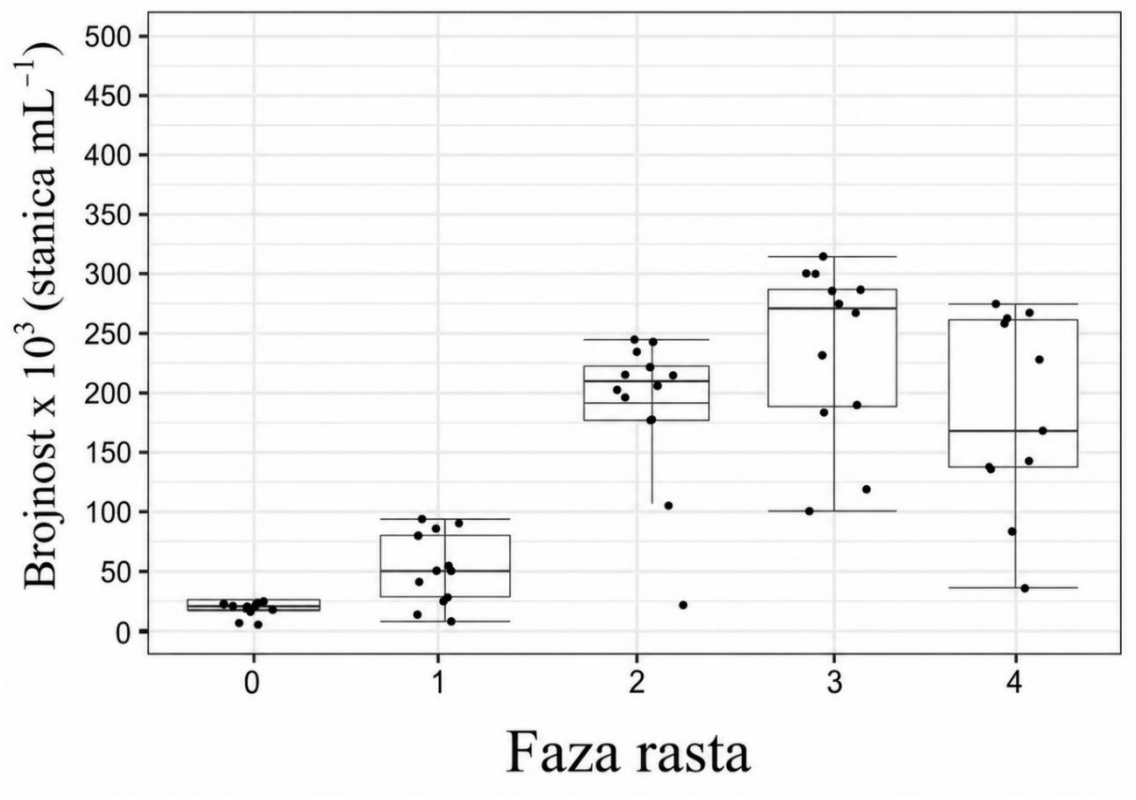
U ovom je istraživanju analizirano dvanaest izolata vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*, pri čemu su svi izolirani s istraživačkog područja Kaštelanski zaljev tijekom kasne jeseni (Tablica 3.8).

Tablica 3.8 Popis analiziranih izolata vrste *P. 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 ($\times 10^3$ 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})
***P. pseudodelicatissima* / K328ps**	1,78-2,10	1,38	113,10
***P. pseudodelicatissima* / K336ps**	5,42-6,32	1,17	309,20
***P. pseudodelicatissima* / K339ps**	0,96–5,66	0,87	259,80
***P. pseudodelicatissima* / K340ps**	4,72*	0,90	268,60
***P. pseudodelicatissima* / K349ps**	4,78*	0,94	294,40
***P. pseudodelicatissima* / K350ps**	< LOD	0,68	96,27
***P. pseudodelicatissima* / K351ps**	5,44*	0,92	278,00
***P. pseudodelicatissima* / K352ps**	0,96-6,26	0,67	293,40
***P. pseudodelicatissima* / K356ps**	0,22-0,93	0,78	236,40
***P. pseudodelicatissima* / K357ps**	1,00-4,01	0,88	187,96
***P. pseudodelicatissima* / K358ps**	0,68-3,93	0,94	277,80
***P. pseudodelicatissima* / K359ps**	0,28-0,68	1,13	237,60

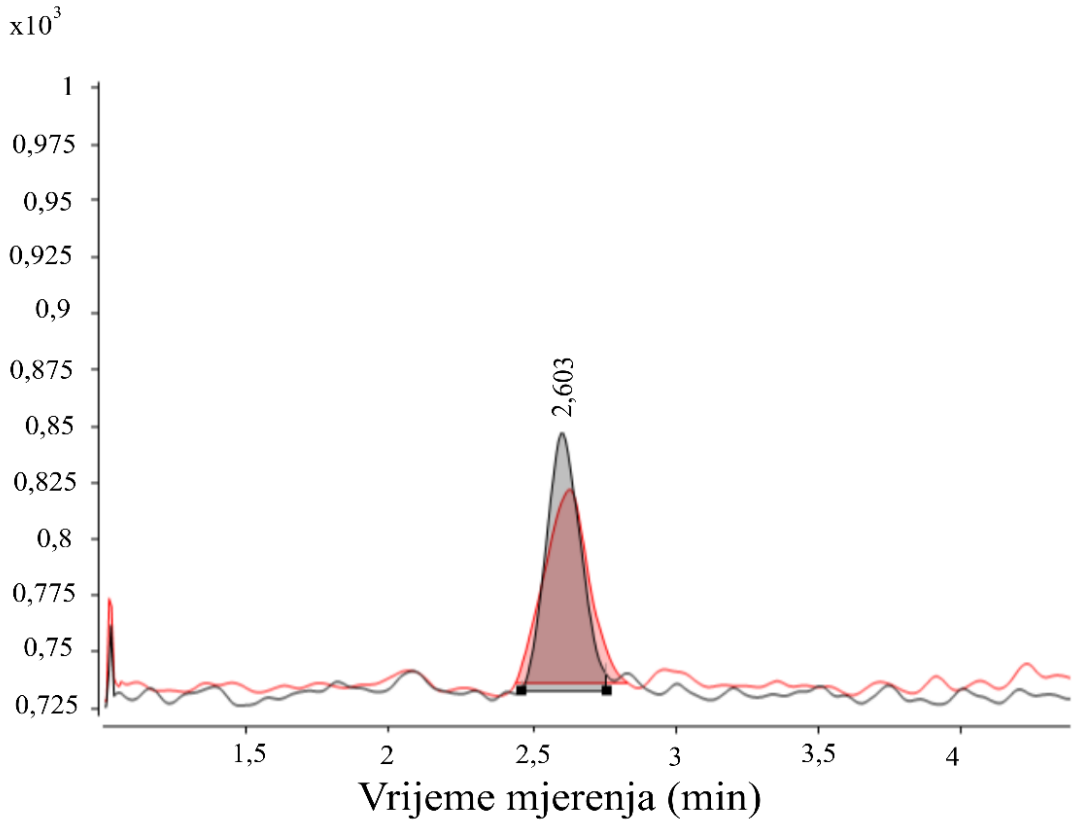
*pDK je određena samo u jednoj fazi rasta stanične kulture

Sve kulture stanica vrste *P. pseudodelicatissima* analizirane su pri temperaturi od 18 °C. Istraživani izolati inokulirani su s početnim brojnostima stanica u rasponu od $2,75 \times 10^3$ do $25,18 \times 10^3$ stanica mL^{-1} (Slika 3.9), dok su najviše zabilježene brojnosti stanica varirale između $96,27 \times 10^3$ i $309,20 \times 10^3$ 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.

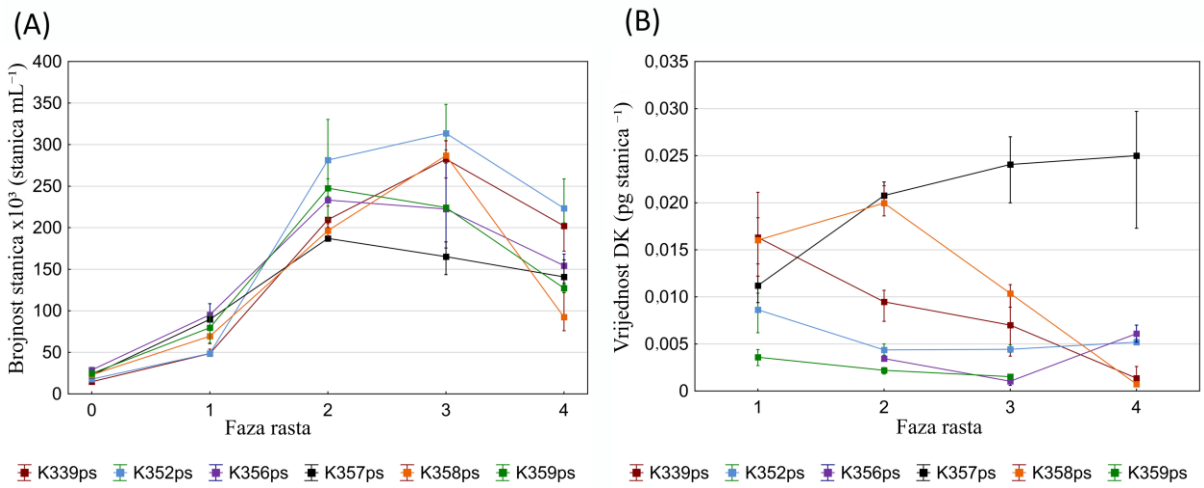
Kontinuirano visoka proizvodnja toksina zabilježena je kod izolata K357ps, koji je pokazao najvišu vrijednost toksina DK među svim toksičnim izolatima (0,0250 pg stanica^{-1}), izmjerenu tijekom faze propadanja kulture (faza rasta 4) (Tablica 3.9).

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 stanici.

Izolat	Faza rasta	Srednja brojnost ×10^3 (stanica mL^{-1})	DK u kulturi (ng mL^{-1})	DK po stanici (pg stanica^{-1})
K328ps	2	89,20	1,78	0,0128
	3	105,44	2,10	0,0097
K336ps	3	316,33	6,32	0,0014
	4	271,83	5,42	0,0027
K339ps	1	48,51	0,96	0,0163
	2	209,55	4,18	0,0095
	3	282,60	5,66	0,0070
	4	202,16	4,04	0,0026
K340ps	4	236,03	4,72	0,0034
K349ps	4	238,62	4,78	0,0116
K351ps	4	272,54	5,44	0,0021
K352ps	1	48,79	0,96	0,0086
	2	281,37	5,62	0,0044
	3	313,56	6,26	0,0044
	4	223,43	4,46	0,0052
K356ps	2	233,23	0,78	0,0035
	3	222,42	0,22	0,0010
	4	154,35	0,93	0,0061
K357ps	1	89,83	1,00	0,0112
	2	187,17	3,89	0,0208
	3	165,07	4,01	0,0241
	4	140,90	3,53	0,0250
K358ps	1	69,42	1,09	0,0160
	2	196,40	3,93	0,0200
	3	286,95	2,98	0,0104
	4	92,45	0,68	0,0007
K359ps	1	79,61	0,28	0,0036
	2	247,47	0,54	0,0022
	3	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 eksponencijalne 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 3.11). 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 *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.

3.2 Analiza staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* pri izmijenjenim uvjetima uzgoja

3.2.1 *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*-izolat K357ps

3.2.1.1 Analiza rasta staničnih kultura

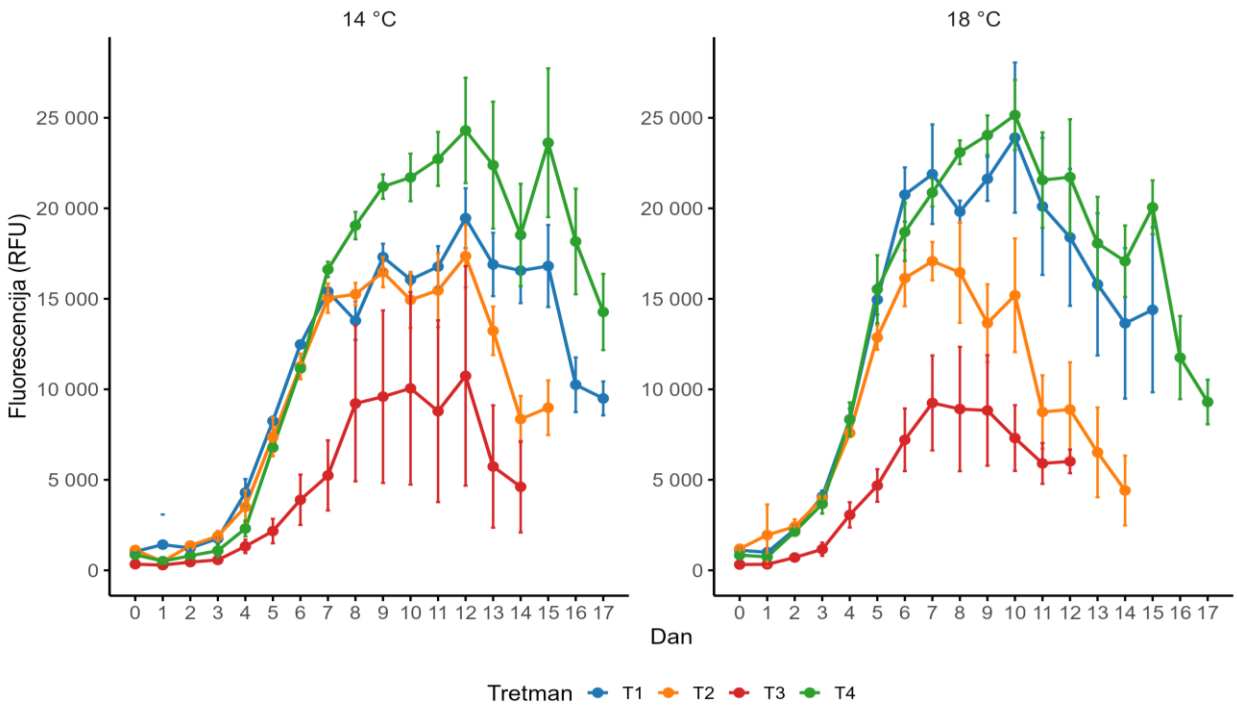
Rast vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* praćen je mjerenjem fluorescencije kroz vrijeme u faktorskom eksperimentalnom dizajnu 4 × 2. Eksperimentalni dizajn uključivao je kontrolni tretman (T1) i tri tretmana sa smanjenom dostupnošću hranjivih tvari (T2–T4), provedena pri dva temperaturna režima, 14 °C i 18 °C. Za svaku kombinaciju provedene su tri biološke replike.

Vrijednosti fluorescencije razlikovale su se među tretmanima i temperaturnim uvjetima te su se kretale u rasponu od 279 RFU do 28 575 RFU. Najviše vrijednosti RFU zabilježene su u kontrolnom tretmanu T1 pri 18 °C te u tretmanu T4 pri obje temperature, dok su najniže vrijednosti zabilježene u tretmanu T3 (Tablica 3.10).

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

Tretman	Uvjeti hranjivih tvari	Temperatura (°C)	Min RFU	Max RFU	Prosječna vrijednost fluorescencije (RFU, N=3)
T1	Kontrolni tretman	14	410,33	21284,33	11071,55
T1	Kontrolni tretman	18	732,33	28574,83	13878,58
T2	−50 % fosfata	14	373,67	19360,67	9507,77
T2	−50 % fosfata	18	975,00	19306,00	9138,49
T3	−50 % silikata	14	279,33	14878,67	4869,50
T3	−50 % silikata	18	306,67	12581,33	4900,79
T4	−50 % fosfata i −50 % silikata	14	383,67	26924,00	13671,35
T4	−50 % fosfata i −50 % silikata	18	654,67	27380,33	14592,04

Najviše maksimalne i prosječne vrijednosti fluorescencije zabilježene su u tretmanima T1 i T4, što upućuje na to da su stanice u tim uvjetima postizale najvišu brojnost. Ovi rezultati potvrđuju da se vremenska dinamika fluorescencijskog signala razlikovala među tretmanima, pri čemu se T3 izdvojio kao tretman s najnižim signalom kroz cijelo analizirano razdoblje (Slika 3.12).



Slika 3.12 Vrijednosti *in vivo* fluorescencije stanične kulture *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps u kontrolnom tretmanu (T1) te tretmanima sa smanjenom dostupnošću fosfata (T2, -50 % fosfata), silikata (T3, -50 % silikata) i kombiniranim smanjenjem fosfata i silikata (T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) pri 14 °C i 18 °C. Prikazane su aritmetičke sredine fluorescencije ± standardna devijacija (SD) na temelju tri biološke replike; paneli prikazuju temperaturne uvjete.

Brojnost stanica varirala je između tretmana, temperaturnih uvjeta tijekom eksperimenta. U tretmanima T1, T2 i T4 početne vrijednosti kretale su se od 7,56 × 10^3 do 11,03 × 10^3 stanica mL^{-1}, dok su u tretmanu T3 bile niže i iznosile 2,85–3,52 × 10^3 stanica mL^{-1}. Najniža početna vrijednost zabilježena je u tretmanu T3 pri 14 °C, a najviša u tretmanu T4 pri 18 °C (Prilozi-Tablica 7.1 i Tablica 7.2).

U kontrolnom tretmanu T1 brojnost stanica dosezala je visoke vrijednosti pri obje temperature, pri čemu je najviša vrijednost pri 14 °C iznosila 595,89 × 10^3 stanica mL^{-1}, a pri 18 °C 519,18 × 10^3 stanica mL^{-1}. U odnosu na kontrolni tretman, tretman T4 pokazao je jednake ili više vrijednosti brojnosti stanica. Najizraženije povećanje zabilježeno je pri 14 °C, gdje su sve tri replike u tretmanu T4 u fazi rasta 3 dosezale vrijednosti od 541,54 × 10^3 do 688,80 × 10^3 stanica mL^{-1}. Pri 18 °C najviša brojnost u tretmanu T4 iznosila je 646,74 × 10^3 stanica mL^{-1}, što je također više u odnosu na maksimalnu vrijednost zabilježenu u kontroli.

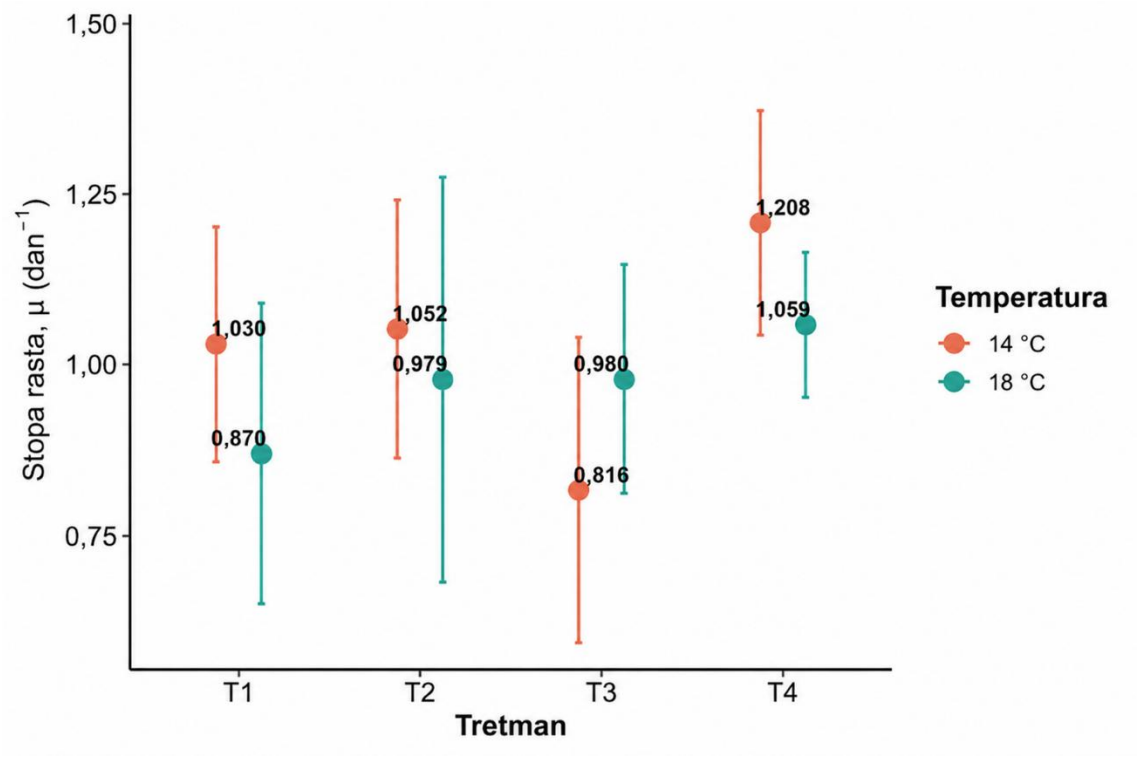
Najviše brojnosti zabilježene su u kontrolnom tretmanu (T1) i kombiniranom tretmanu (T4), dok su u tretmanu sa smanjenom dostupnošću fosfata (T2) bile niže. Najniže brojnosti pri obje temperature zabilježene su u tretmanu sa smanjenom dostupnošću silikata (T3). Takav obrazac upućuje na to da kombinirano smanjenje fosfata i silikata nije ograničilo postizanje

visokih brojnosti, dok je smanjena dostupnost silikata bila povezana s njihovim najnižim vrijednostima.

Usporedba s kontrolnim tretmanom T1 pokazala je da je najviša stopa rasta pri obje temperature zabilježena u kombiniranom tretmanu T4, sa smanjenom dostupnošću fosfata i silikata (μ = 1,208 dan^{-1} pri 14 °C; μ = 1,059 dan^{-1} pri 18 °C). To je bilo u skladu s najvišim vrijednostima brojnosti stanica i prosječne fluorescencije zabilježenima u istom tretmanu. Pri 14 °C stopa rasta u tretmanu T4 bila je viša nego u kontrolnom tretmanu T1 (μ = 1,030 dan^{-1}), dok je u tretmanu T2, sa smanjenom dostupnošću fosfata, bila slična kontroli (μ = 1,052 dan^{-1}). Najniža stopa rasta pri 14 °C zabilježena je u tretmanu T3, sa smanjenom dostupnošću silikata (μ = 0,816 dan^{-1}), što upućuje na ograničavajući učinak smanjene dostupnosti silikata.

Pri 18 °C kombinirani tretman (T4) također je imao višu stopu rasta od kontrole T1 (μ = 1,059 dan^{-1} u odnosu na μ = 0,870 dan^{-1}). U tretmanima sa smanjenom dostupnošću fosfata (T2) i silikata (T3) pri 18 °C zabilježene su gotovo jednake stope rasta (μ = 0,979 i 0,980 dan^{-1}), a obje su bile više nego u kontrolnom tretmanu T1.

Usporedba između temperatura pokazala je da su u kontrolnom tretmanu T1, tretmanu sa smanjenom dostupnošću fosfata T2 i kombiniranom tretmanu T4 stope rasta bile niže pri 18 °C nego pri 14 °C. Suprotno tomu, u tretmanu sa smanjenom dostupnošću silikata T3 stopa rasta bila je viša pri 18 °C nego pri 14 °C (Slika 3.13).



Slika 3.13 Prosječna maksimalna stopa rasta (μ, dan^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps u kontrolnom tretmanu (T1) te tretmanima sa smanjenom dostupnošću fosfata (T2, -50 % fosfata), silikata (T3, -50 % silikata) i kombiniranim smanjenjem fosfata i silikata (T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) pri 14 °C i 18 °C. Točke prikazuju srednje vrijednosti, a vertikalne linije standardnu devijaciju.

3.2.1.2 Usporedba rasta izolata K357ps između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela

Analiza linearnim mješovitim modelom pokazala je da se log-transformirani fluorescencijski signal značajno razlikovao među tretmanima, temperaturama i danima mjerenja (Tablica 3.11).

Tablica 3.11 Učinci tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 –smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%), temperature (14°C i 18°C) i dana mjerenja na log-transformirani fluorescencijski signal stanične kulture *P. pseduodelicatissima* prema linearnom mješovitom modelu. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti.

Učinak	F	df	p-vrijednost
Tretman	46,32	3, 16,09	**< 0,001**
Temperatura	9,39	1, 16,09	**0,007**
Tretman × temperatura	0,66	3, 16,09	0,588
Tretman × dan	5,18	42, 259,99	**< 0,001**
Temperatura × dan	21,24	14, 259,99	**< 0,001**

Utvrđen je značajan učinak tretmana, temperature i dana mjerenja. Značajna interakcija tretmana i dana mjerenja pokazuje da učinak tretmana nije bio jednak tijekom cijelog eksperimenta, nego je ovisio o vremenskoj točki mjerenja. Odnosno, razlike među tretmanima mijenjale su se tijekom eksperimenta. Značajna interakcija temperature i dana mjerenja pokazuje da se i učinak temperature mijenjao tijekom vremena, odnosno da razlike između temperaturnih uvjeta nisu bile jednake u svim danima mjerenja.

Interakcija tretmana i temperature nije bila statistički značajna, što pokazuje da ukupne razlike među tretmanima nisu značajno ovisile o temperaturi. Budući da je dan mjerenja u model uključen kao kategorijska varijabla, rezultati ne pretpostavljaju linearan rast kroz vrijeme, već opisuju promjene fluorescencijskog signala kroz pojedine dane mjerenja.

Kako bi se dodatno protumačili značajni učinci utvrđeni linearnim mješovitim modelom, provedene su post-hoc usporedbe procijenjenih marginalnih sredina pomoću paketa emmeans u R-u. Budući da je cilj analize bio utvrditi ukupne razlike između tretmana i temperaturnih uvjeta, post-hoc usporedbe provedene su za glavne učinke tretmana i temperature, pri čemu su procijenjene marginalne sredine izračunate prosječenjem preko uključenih vremenskih točaka.

Post-hoc usporedbe tretmana pokazale su da se tretman T3 značajno razlikovao od kontrolnog tretmana T1 ($p < 0,001$), dok tretmani T2 i T4 nisu pokazali statistički značajno odstupanje od kontrole. Tretman T3 također se značajno razlikovao od tretmana T2 i T4, što upućuje na to da je smanjena dostupnost silikata bila povezana s najizraženijim smanjenjem rasta. Razlike između T1 i T2, T1 i T4 te T2 i T4 nisu bile statistički značajne. (Tablica 3.12).

Tablica 3.12 Post-hoc usporedbe tretmana (promjenjene vrijednosti hranjivih soli, T1 – kontrolni tretman; T2 –smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%) na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P.pseudodelicatissima*. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Usporedba	Procjena razlike	SE	df	p-vrijednost	Smjer razlike
T1 – T2	0,232	0,106	15,9	0,171	nije značajno
T1 – T3	1,093	0,107	16,3	**< 0,001**	**T3 niži od T1**
T1 – T4	0,024	0,106	15,9	0,996	nije značajno
T2 – T3	0,861	0,107	16,3	**< 0,001**	**T3 niži od T2**
T2 – T4	-0,208	0,106	15,9	0,244	nije značajno
T3 – T4	-1,069	0,107	16,3	**< 0,001**	**T3 niži od T4**

Post-hoc usporedba temperaturnih uvjeta pokazala je značajnu razliku između 14 °C i 18 °C. Negativna procjena razlike za usporedbu 14 °C – 18 °C pokazuje da su prosječne vrijednosti fluorescencijskog signala bile više pri 18 °C nego pri 14 °C. (Tablica 3.13).

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.

Usporedba	Procjena razlike	SE	df	p-vrijednost	Smjer razlike
14 °C – 18 °C	-0,231	0,075	16,1	**0,007**	**viši signal pri 18 °C**

Skupno, rezultati praćenja rasta izolata *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* K357ps pokazali su da je odgovor ispitivane stanične kulture bio izraženije povezan s dostupnošću hranjivih tvari nego s temperaturom. Najizraženije negativno odstupanje zabilježeno je u tretmanu T3, odnosno pri smanjenoj dostupnosti silikata. T3 je imao niže vrijednosti fluorescencijskog signala i brojnosti stanica, a post-hoc usporedbe LMM-a pokazale su da se jedini značajno razlikovao od kontrolnog tretmana. Smanjena dostupnost silikata stoga se izdvaja kao glavni ograničavajući čimbenik rasta izolata K357ps.

Tretman smanjene dostupnosti fosfata (T2) nije se značajno razlikovao od kontrolnog tretmana (T1), dok kombinirani tretman T4 nije ograničio rast kulture. Naprotiv, u T4 su zabilježene najviše brojnosti stanica i stope rasta pri obje temperature, što upućuje na to da je odgovor stanične kulture vjerojatno bio povezan s promijenjenim omjerom dostupnih hranjivih tvari, a ne samo s ukupnim smanjenjem fosfata i silikata.

Temperatura je imala statistički značajan, ali manje dosljedan učinak. Prosječni fluorescencijski signal bio je viši pri 18 °C, dok su više stope rasta i najveće brojnosti stanica u pojedinim tretmanima, osobito T4, zabilježene pri 14 °C. Stoga se učinak temperature ne može tumačiti jednoznačno, nego ovisi o tretmanu i promatranom pokazatelju rasta.

3.2.1.3 Analiza toksičnosti staničnih kultura *P. pseudodelicatissima*

Vrijednost domoične kiseline (DK) pokazivala je izraženu varijabilnost ovisno o fazi rasta, uvjetima tretmana i temperaturi. Vrijednosti koncentracije DK su se kretale od najnižih prosječnih vrijednosti 0,001071 pg stanica^{-1} (T4, 14 °C, faza rasta 2) do najviših 0,005823 pg stanica^{-1} (T3, 14 °C, faza rasta 4) (Tablica 3.14).

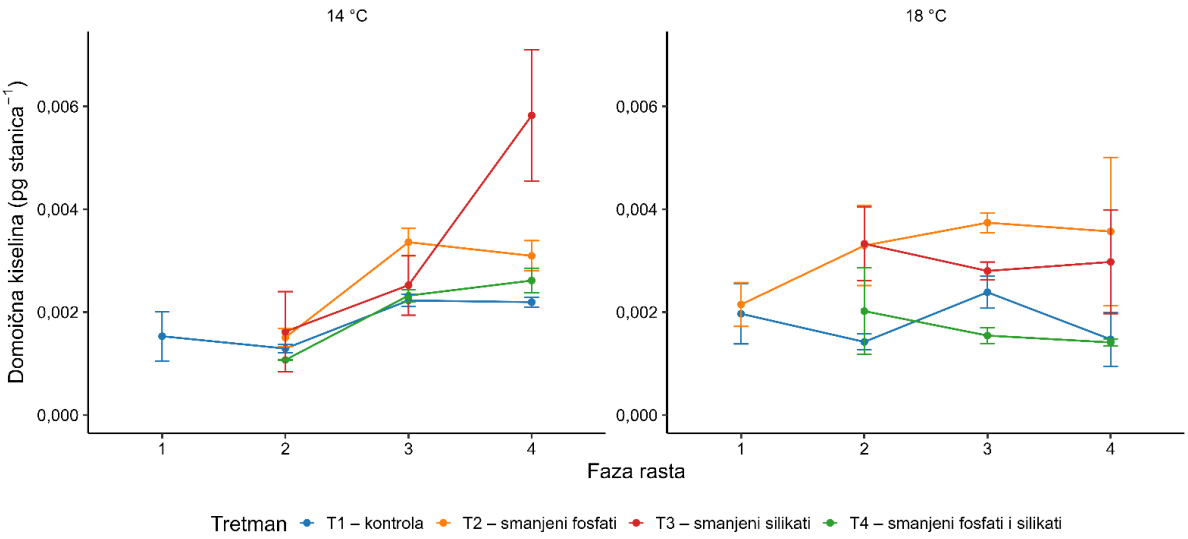
Tablica 3.14 Prosječne vrijednosti domoične kiseline (pg stanica^{-1}) za pojedine tretmane (T1 – kontrolni tretman; T2 –smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%), temperaturne uvjete (14 °C, 18 °C) i faze rasta (1–4) vrste *P. pseudodelicatissima*. Prikazane su aritmetička sredina DK te standardna devijacija kao mjera varijabilnosti između bioloških replikata (n = 3 po kombinaciji).

Tretman	Temperatura	Faza rasta	Prosječna vrijednost DK (pg stanica^{-1})	Standardna devijacija
T1	14	1	0,001531	0,000481
		2	0,001293	0,000080
		3	0,002226	0,000116
		4	0,002195	0,000096
T1	18	1	0,001968	0,000587
		2	0,001422	0,000154
		3	0,002387	0,000311
		4	0,001471	0,000524
T2	14	2	0,001507	0,000176
		3	0,003360	0,000267
		4	0,003095	0,000295
T2	18	1	0,002148	0,000427
		2	0,003294	0,000776
		3	0,003739	0,000192
		4	0,003568	0,001441
T3	14	2	0,001621	0,000778
		3	0,002523	0,000582
		4	0,005823	0,001279
T3	18	2	0,003329	0,000712
		3	0,002801	0,000174
		4	0,002976	0,001005
T4	14	2	0,001071	0,000009
		3	0,002321	0,000117
		4	0,002614	0,000241
T4	18	2	0,002020	0,000843
		3	0,001544	0,000151
		4	0,001412	0,00006

Općenito, najniže vrijednosti DK zabilježene su u ranoj i kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta (1 i 2), dok su najviše vrijednosti uočene u stacionarnoj (3) i osobito u fazi odumiranja (4). Taj obrazac bio je dosljedan u većini tretmana.

Tretman sa smanjenom dostupnosti silikata (T3) pokazivao je najizraženiji porast vrijednosti DK u kasnijim fazama rasta. U četvrtoj fazi rasta, pri 14 °C, u tretmanu T3 zabilježena je najviša prosječna vrijednost u cijelom eksperimentu (0,005823 pg stanica^{-1}). Slično tome, pri 18 °C u istoj fazi rasta, tretman T3 je imao povišene vrijednosti (0,002976 pg stanica^{-1}) u odnosu na većinu ostalih tretmana.

Tretman T2 (smanjena dostupnost fosfata) također je pokazivao relativno visoke vrijednosti DK, osobito pri 18 °C u fazama rasta 2 i 3 (prosječno 0,003294 i 0,003739 pg stanica^{-1}). Nasuprot tome, kombinirani tretman T4 imao je najniže vrijednosti DK u većini faza, osobito pri 14 °C u fazi 2 (0,001071 pg stanica^{-1}) te pri 18 °C u fazi 4 (0,001412 pg stanica^{-1}) (Slika 3.14).



Slika 3.14 Promjene vrijednosti domoične kiseline (pg stanica^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* kroz faze rasta (1–4) u različitim nutritivnim tretmanima 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 eksponencijalna faza, 2 - kasna eksponencijalna faza, 3 -stacionarna faza i 4 - faza odumiranja.

3.2.1.4 Rezultati analize vrijednosti domoične kiseline (DK) linearnim mješovitim modelom (LMM)

Rezultati su pokazali značajan učinak tretmana na proizvodnju DK, što pokazuje da su se koncentracije DK razlikovale među tretmanima. Također je utvrđen značajan učinak faze rasta, što upućuje na promjene koncentracije DK kroz faze rasta. Temperatura kao glavni učinak nije bila statistički značajna, kao ni interakcija tretmana i temperature. Međutim, značajna interakcija temperature i faze rasta pokazuje da se razlike između temperaturnih uvjeta mijenjaju ovisno o fazi rasta (Tablica 3.15).

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

Učinak	F	df	p-vrijednost
Tretman	18,14	3, 67	**< 0,001**
Temperatura	0,0006	1, 67	0,980
Faza rasta	7,20	3, 67	**< 0,001**
Tretman × temperatura	1,75	3, 67	0,166
Temperatura × faza rasta	8,52	3, 67	**< 0,001**

Post-hoc usporedbe pokazale su da su tretmani T2 i T3 imali značajno više vrijednosti DK u odnosu na kontrolni tretman T1 i kombinirani tretman T4. Razlika između T2 i T3 nije bila statistički značajna, kao ni razlika između T1 i T4 (Tablica 3.16).

Tablica 3.16 Značajne post-hoc usporedbe tretmana (promjenjene vrijednosti hranjivih soli, kontrolni tretman-T1, T2, -50 % fosfata, silikata, T3, -50 % silikata i T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) za vrijednosti domoične kiseline *P. pseudodelicatissima*. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Usporedba	Razlika	SE	p-vrijednost	Smjer razlike
T1 – T2	-0,00106	0,000237	**0,0002**	**T2 viši**
T1 – T3	-0,00124	0,000249	**< 0,001**	**T3 viši**
T2 – T4	0,00116	0,000249	**0,0001**	**T2 viši**
T3 – T4	0,00134	0,000253	**< 0,001**	**T3 viši**

Prikazani ili dobiveni rezultati pokazuju da su tretmani sa smanjenom dostupnošću pojedinačnih hranjivih tvari, odnosno fosfata u T2 i silikata u T3, bili povezani s višim vrijednostima DK. Nasuprot tome, kombinirani tretman T4 nije pokazao povišene vrijednosti DK u odnosu na kontrolu.

Vrijednosti toksina DK razlikovale su se i među fazama rasta. Procijenjene marginalne sredine bile su najniže u fazi 2, a najviše u fazi 4. Post-hoc usporedbe pokazale su da je u faza 4 proizvedeno značajno više DK u odnosu na fazu 1 (p = 0,0478) i fazu 2 (p = 0,0003). U faza 3 također je zabilježeno značajno više DK od faze 2 (p = 0,0173), dok razlika između faza 3 i 4 nije bila statistički značajna (Tablica 3.17).

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.

Usporedba faza rasta	Razlika	SE	p-vrijednost	Smjer razlike
Faza 1 – faza 4	-0,000889	0,000335	**0,0478**	**Faza 4 viša**
Faza 2 – faza 3	-0,000667	0,000219	**0,0173**	**Faza 3 viša**
Faza 2 – faza 4	-0,000947	0,000219	**0,0003**	**Faza 4 viša**

Ovaj obrazac pokazuje da se vrijednost DK mijenjala tijekom rasta stanične kulture vrste *P. pseudodelicatissima* te da su više vrijednosti DK uglavnom bile povezane s kasnijim fazama rasta. Ovakvi rezultati upućuju na to da faza rasta za vrstu *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissimaima* ima važnu ulogu u proizvodnji DK.

Temperatura kao glavni učinak nije bila značajna, što znači da nije utvrđena ukupna razlika u vrijednosti DK između 14 °C i 18 °C. Međutim, značajna interakcija temperature i faze rasta pokazala je da učinak temperature na toksičnost nije bio jednoznačan, nego se razlikovao ovisno o fazi rasta kulture..

Usporedbe temperatura unutar faza rasta pokazale su da je u fazi rasta 2 (kasna eksponencijalna faza) vrijednost DK bila značajno viša pri 18 °C nego pri 14 °C. Suprotan obrazac zabilježen je u fazi 4 (faza raspadanja stanica), gdje je proizvodnja DK bila značajno viša pri 14 °C nego pri 18 °C. U fazama 1 i 3 nisu utvrđene značajne temperaturne razlike (Tablica 3.18).

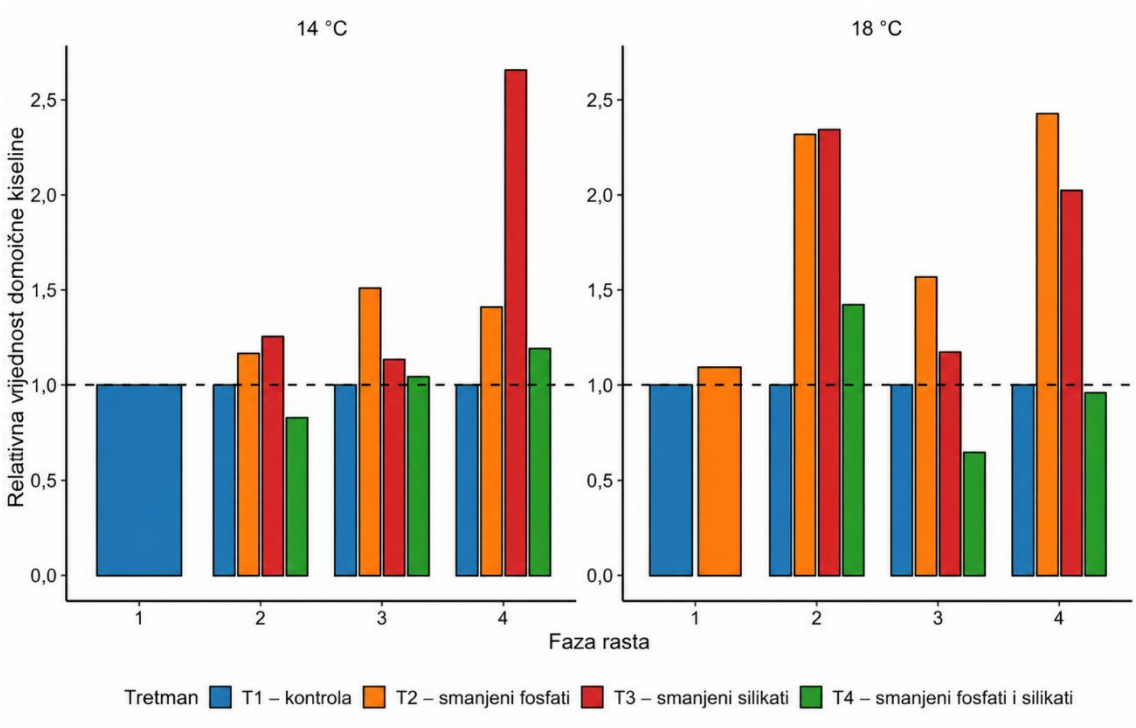
Tablica 3.18 Statistički značajne post-hoc usporedbe temperaturnih uvjeta unutar faza rasta za vrstu *P. pseudodelicatissima*. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Faza rasta	Usporedba	Razlika	SE	Prilagođena p- vrijednost	Smjer razlike
Faza 2	14 °C – 18 °C	-0,00114	0,000310	**0,0019**	**18 °C viši DK**
Faza 4	14 °C – 18 °C	0,00107	0,000310	**0,0029**	**14 °C viši DK**

Ovi rezultati pokazuju da temperaturni obrazac proizvodnje DK nije bio konstantan kroz faze rasta. Viša temperatura bila je povezana s višim vrijednostima DK u fazi 2, dok je u fazi 4

viša vrijednost DK zabilježena pri 14 °C. Budući da je temperatura djelovala različito ovisno o fazi rasta, rezultate nije prikladno tumačiti kao jednostavan pozitivan ili negativan učinak temperature na proizvodnju DK.

Sveukupno, rezultati pokazuju da su vrijednosti DK ovisile prvenstveno o tretmanu i fazi rasta. Najviše vrijednosti DK bile su povezane s tretmanima T2 i T3, odnosno sa smanjenom dostupnošću fosfata ili silikata pojedinačno. Kombinirani tretman T4 nije pokazao isti obrazac povišene DK kao T2 i T3 te se nije značajno razlikovao od kontrolnog tretmana T1. Faza rasta također je bila važna, pri čemu su više koncentracije DK zabilježene u kasnijim fazama, osobito u fazi 4. Temperatura nije imala jedinstven ukupni učinak, nego se njezin odnos s koncentracijom DK mijenjao ovisno o fazi rasta. Relativni prikaz vrijednosti domoične kiseline u odnosu na kontrolni tretman dodatno pokazuje da su najveća odstupanja od kontrole zabilježena u tretmanima T2 i T3 (Slika 3.15).



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.

3.2.2 *Pseudo-nitzschia delicatissima*-izolat K465de

3.2.2.1 Analiza rasta stanične kulture

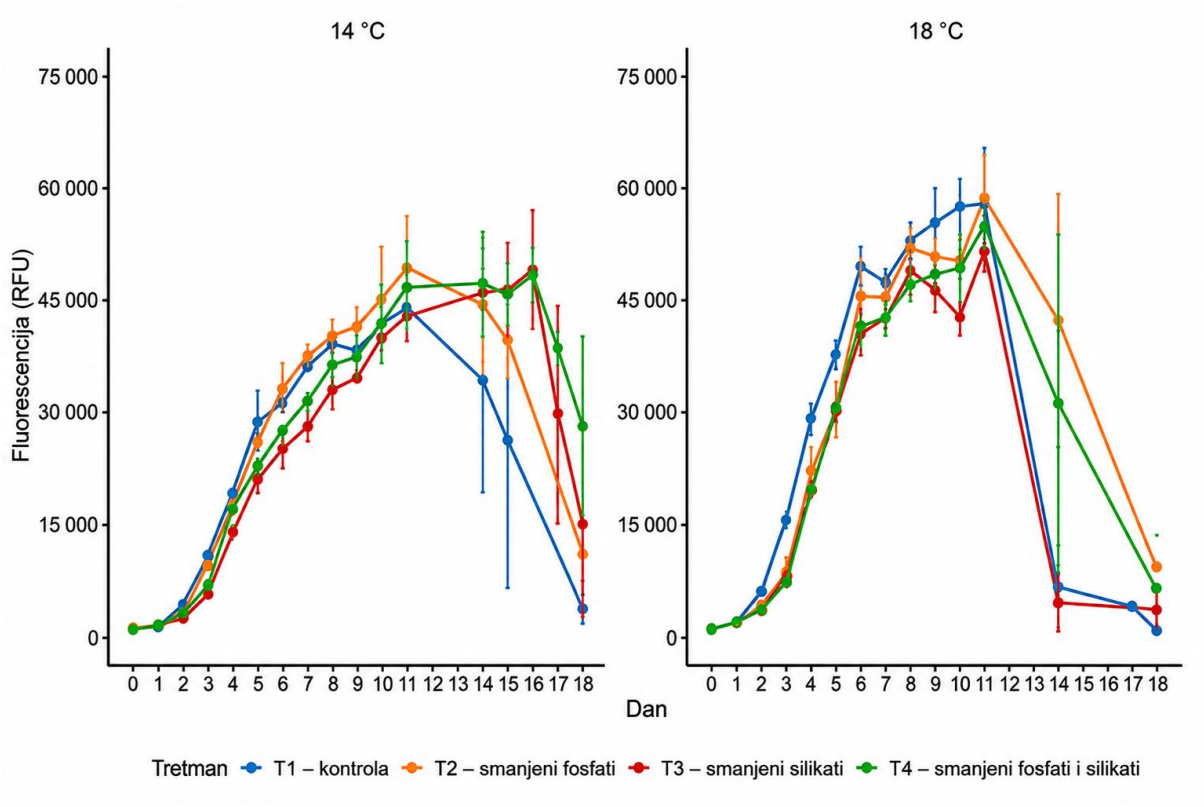
Promjene u rastu vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima* analizirane su putem fluorescencije mjerene kroz vrijeme u eksperimentalnom sustavu s dva čimbenika: različitim nutritivnim tretmanima (T1–T4) i temperaturama (14 °C i 18 °C).

Vrijednosti fluorescencije razlikovale su se među tretmanima i temperaturnim uvjetima te su se kretale u rasponu od 995 RFU do 63 559 RFU. Najviše vrijednosti RFU zabilježene su u tretmanima T1 i T2 pri 18 °C. (Tablica 3.19).

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

Tretman	Uvjeti hranjivih tvari	Temperatura (°C)	Min RFU	Max RFU	Prosječna vrijednost RFU (N=3)
T1	Kontrolni tretman	14	1179,33	47679,67	23965,95
T1	Kontrolni tretman	18	994,67	63160,00	30042,13
T2	−50 % fosfata	14	1295,00	57153,67	26685,10
T2	−50 % fosfata	18	1165,67	63559,33	30169,63
T3	−50 % silikata	14	1096,33	57347,00	25602,60
T3	−50 % silikata	18	1121,67	53498,33	24700,05
T4	−50 % fosfata i −50 % silikata	14	1164,00	54967,00	28283,78
T4	−50 % fosfata i −50 % silikata	18	1097,67	57541,75	27574,72

Najviše maksimalne i prosječne vrijednosti fluorescencije zabilježene su uglavnom u tretmanima T1, T2 i T4, što upućuje na to da su stanice u tim uvjetima postizale višu brojnost. Za razliku od izolata *P. pseuodelicatissima* K357ps, tretman sa smanjenom dostupnosti silikata (T3) se kod izolata *P. delicatissima* K465de nije izdvojio kao tretman s najnižim fluorescencijskim signalom kroz cijeli eksperiment, nego su vrijednosti bile usporedive s ostalim tretmanima, osobito pri 14 °C. Temperaturni učinak bio je najizraženiji u tretmanu T1 i tretmanu T2, gdje su prosječne vrijednosti RFU bile više pri 18 °C, dok su u tretmanima T3 i T4 razlike između temperatura bile slabije izražene ili su vrijednosti bile više pri 14 °C. (Slika 3.16).



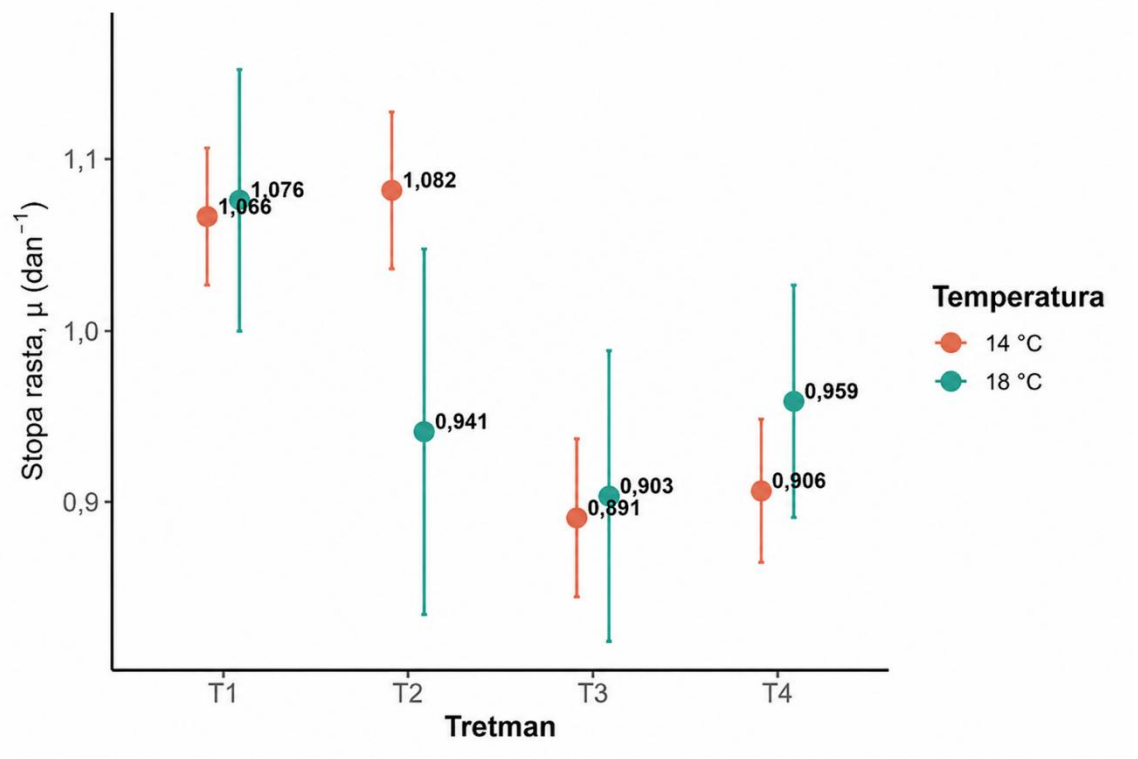
Slika 3.16 Vrijednosti *in vivo* fluorescencije stanične kulture *P. delicatissima* K465de praćen fluorescencijom (RFU) kroz vrijeme (dan) u tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%) pri 14 °C i 18 °C. Prikazane su aritmetičke sredine fluorescencije ± standardna devijacija (SD) na temelju bioloških replika; paneli prikazuju temperaturne uvjete.

Početne brojnosti bile su u rasponu od 7,25 × 10^3 do 13,65 × 10^3 stanica mL^{-1}. Najniža početna vrijednost zabilježena je u tretmanu T4 pri 18 °C, a najviša u tretmanu T2 pri 14 °C (Prilozi – Tablica 7.3. i Tablica 7.4.).

U kontrolnom tretmanu T1 zabilježene su visoke brojnosti pri obje temperature, s maksimalnim vrijednostima od 728,89 × 10^3 stanica mL^{-1} pri 14 °C i 1117,72 × 10^3 stanica mL^{-1} pri 18 °C. U odnosu na kontrolu, tretman T2 pokazao je nešto niže, ali i dalje visoke brojnosti pri obje temperature. Tretman T3 bio je usporediv s kontrolom pri 14 °C, dok su pri 18 °C brojnosti bile niže u odnosu na T1. Tretman T4 imao je niže brojnosti od kontrole pri 14 °C, ali je pri 18 °C dosezao visoke vrijednosti. Najizraženije odstupanje od kontrole zabilježeno je u tretmanu T3 pri 18 °C, što upućuje na to da je učinak smanjene dostupnosti silikata bio izraženiji pri višoj temperaturi.

Usporedba stopa rasta s kontrolnim tretmanom T1 pokazuje da su pri 14 °C tretmani T1 i T2 imali najviše i međusobno slične vrijednosti stope rasta (μ = 1,066 dan^{-1} i μ = 1,082 dan^{-1}). U odnosu na kontrolu, niže vrijednosti zabilježene su u tretmanima T3 (μ = 0,891 dan^{-1}) i T4 (μ = 0,906 dan^{-1}), što upućuje na smanjenje stope rasta u uvjetima smanjene dostupnosti silikata

te kombinirano smanjene dostupnosti fosfata i silikata. Pri 18 °C najviša stopa rasta zabilježena je u kontrolnom tretmanu T1 (μ = 1,076 dan⁻¹). Svi tretmani sa smanjenom dostupnošću hranjivih tvari imali su niže vrijednosti u odnosu na kontrolu, pri čemu su vrijednosti iznosile μ = 0,941 dan⁻¹ u tretmanu T2, μ = 0,903 dan⁻¹ u tretmanu T3 i μ = 0,959 dan⁻¹ u tretmanu T4 (Slika 3.17).



Slika 3.17 Prosječna maksimalna stopa rasta (μ, dan⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia delicatissima* K465de u različitim tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 –smanjenje koncentracije fosfata za 50%; T3 – smanjenje koncentracije silikata za 50%; T4 smanjenje koncentracije fosfata i silikata za 50%) pri 14 °C i 18 °C. Točke prikazuju srednje vrijednosti, a vertikalne linije standardnu devijaciju.

Usporedba između temperatura pokazuje da su stope rasta bile relativno slične unutar većine tretmana, osobito u kontrolnom tretmanu T1 i tretmanu T3. Najizraženija razlika zabilježena je u tretmanu T2, gdje je stopa rasta bila viša pri 14 °C nego pri 18 °C, dok je u tretmanu T4 zabilježen blagi porast pri 18 °C.

3.2.2.2 Usporedba rasta izolata K465de između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela

Analiza linearnim mješovitim modelom pokazala je da se fluorescencijski signal vrste *P. delicatissima* značajno razlikovao među tretmanima i temperaturnim uvjetima te se značajno mijenjao kroz vremenske točke mjerenja (Tablica 3.20).

Tablica 3.20 Učinci tretmana (promjenjene vrijednosti hranjivih soli, kontrolni tretman-T1, T2, -50 % fosfata, silikata, T3, -50 % silikata i T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) temperature i vremenske točke mjerenja na log-transformirani fluorescencijski signal stanične kulture *P. delicatissima* prema linearnom mješovitom modelu. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti.

Učinak	F	df	p-vrijednost
Tretman	13,77	3, 16	**< 0,001**
Temperatura	24,31	1, 16	**< 0,001**
Tretman × temperatura	0,40	3, 16	0,752
Tretman × vrijeme	5,03	36, 228	**< 0,001**
Temperatura × vrijeme	23,14	12, 228	**< 0,001**

Utvrđen je značajan učinak tretmana, temperature i dana mjerenja na fluorescencijski signal. Značajna interakcija tretmana i dana mjerenja pokazuje da su se razlike među tretmanima mijenjale tijekom eksperimenta. Također, značajna interakcija temperature i dana mjerenja upućuje na to da učinak temperature nije bio jednak tijekom cijelog eksperimenta. Interakcija tretmana i temperature nije bila statistički značajna, što pokazuje da ukupne razlike među tretmanima nisu značajno ovisile o temperaturi.

Kako bi se dodatno protumačili značajni učinci utvrđeni linearnim mješovitim modelom, provedene su post-hoc usporedbe procijenjenih marginalnih sredina. Budući da je cilj analize bio utvrditi ukupne razlike između tretmana i temperaturnih uvjeta, post-hoc usporedbe provedene su za glavne učinke tretmana i temperature, pri čemu su procijenjene marginalne sredine izračunate prosječenjem preko uključenih vremenskih točaka.

Post-hoc usporedbe tretmana pokazale su da se tretman T3 (-50% silikata) značajno razlikovao od kontrolnog tretmana T1 ($p < 0,001$), dok tretmani T2 (-50% fosfata) i T4 (-50% silikata i -50% fosfata) nisu pokazali statistički značajno odstupanje od kontrole. Tretman T3 također se značajno razlikovao od tretmana T2 i T4, što upućuje na to da je smanjena dostupnost silikata bila povezana s najizraženijim smanjenjem fluorescencijskog signala. Razlike između T1 i T2, T1 i T4 te T2 i T4 nisu bile statistički značajne (Tablica 3.21).

Tablica 3.21 Post-hoc usporedbe tretmana (promjenjene vrijednosti hranjivih soli, T1-kontrolni tretman, T2, -50 % fosfata, silikata, T3, -50 % silikata i T4, -50 % fosfata i 50 % silikata) na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P. delicatissima*. Statistički značajne p-vrijednosti i odgovarajući smjerovi razlike označeni su podebljanim slovima.

Usporedba	Procjena razlike	SE	df	p-vrijednost	Smjer razlike
T1 – T2	-0,022	0,038	16	0,938	nije značajno
T1 – T3	0,198	0,038	16	**< 0,001**	**T3 niži od T1**
T1 – T4	0,071	0,038	16	0,277	nije značajno
T2 – T3	0,220	0,038	16	**< 0,001**	**T3 niži od T2**
T2 – T4	0,093	0,038	16	0,107	nije značajno
T3 – T4	-0,127	0,038	16	**0,018**	**T3 niži od T4**

Post-hoc usporedba temperaturnih uvjeta pokazala je značajnu razliku između 14 °C i 18 °C. Negativna procjena razlike za usporedbu 14 °C – 18 °C pokazuje da su prosječne vrijednosti fluorescencijskog signala bile više pri 18 °C nego pri 14 °C (Tablica 3.22).

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.

Usporedba	Procjena razlike	SE	df	p-vrijednost	Smjer razlike
14 °C – 18 °C	-0,132	0,027	16	**< 0,001**	**viši signal pri 18 °C**

Učinak temperature bio je statistički značajan, pri čemu su prosječne vrijednosti fluorescencijskog signala bile više pri 18 °C nego pri 14 °C. Međutim, taj se obrazac nije jednako odrazio na sve pokazatelje rasta. Kontrolni tretman T1 imao je vrlo slične stope rasta pri obje temperature, dok je T2 pokazao nižu stopu rasta pri 18 °C. Tretmani T3 i T4 imali su blago više stope rasta pri 18 °C, ali su i dalje ostali niži od kontrole. Stoga se učinak temperature ne može tumačiti kao jednoznačno povećanje rasta pri 18 °C, nego kao učinak koji ovisi o dostupnosti hranjivih tvari i promatranom pokazatelju rasta slično kao i kod pethodno analizirane vrste *P. pseudodelicatissima*.

Skupno, rezultati pokazuju da je vrsta *P. delicatissima* K465de najstabilniji rast ostvario u kontrolnom tretmanu T1, dok je najjasnije odstupanje od kontrole zabilježeno u tretmanu sa smanjenom dostupnosti silikata-T3. Post-hoc usporedbe potvrdile su da je T3 imao značajno niži fluorescencijski signal od T1, T2 i T4, što upućuje na izraženiji negativni učinak smanjene dostupnosti silikata u odnosu na smanjenu dostupnost fosfata. Tretmani T2 i T4 nisu se statistički razlikovali od kontrole, što pokazuje da njihovi učinci nisu doveli do

značajnog odstupanja ukupnog fluorescencijskog signala od kontrolnih uvjeta. Za razliku od izolata K357ps, kod kojeg je T4 bio povezan s najvišim vrijednostima brojnosti i stope rasta, kod izolata K465de kombinirano smanjenje fosfata i silikata nije dovelo do povećanja rasta u odnosu na kontrolne uvjete.

3.2.2.3 Analiza toksičnosti staničnih kultura

Kako bi se procijenila povezanost između dinamike rasta i potencijalne produkcije toksina DK kod vrste *P. delicatissima*, uzorci su analizirani na prisutnost domoične kiseline u ključnim fazama rasta staničnih kultura, uključujući ranu eksponencijalnu fazu (1), fazu maksimalne stope rasta (2), kasniju fazu usporavanja rasta (3) te fazu raspadanja stanica (4).

Analiza uzoraka provedena je u više vremenskih točaka koje su obuhvatile cijeli ciklus rasta staničnih kultura. Domoična kiselina nije određena ni u jednom uzorku, pri čemu su izmjerene vrijednosti bile ispod granice detekcije primijenjene analitičke metode. Rezultati su bili konzistentni među svim tretmanima i temperaturnim režimima.

Izostanak domoične kiseline zabilježen je i u fazi najintenzivnijeg rasta, odnosno tijekom eksponencijalne faze kada je metabolička aktivnost stanica bila najizraženija, kao i u kasnijim fazama rasta kada se u nekim vrstama može očekivati pojačana sekundarna metabolitička aktivnost.

Ovi rezultati ukazuju da u uvjetima provedenog eksperimenta rast staničnih kultura nije bio praćen mjerljivom proizvodnjom domoične kiseline. Nadalje, izostanak toksina u svim fazama rasta upućuje na to da primijenjeni tretmani i temperaturni režimi nisu potaknuli toksični odgovor u izolatu vrste *P. delicatissima*.

3.2.3 *Pseudo-nitzschia multistriata*-izolat S442mu

3.2.3.1 Analiza rasta staničnih kultura

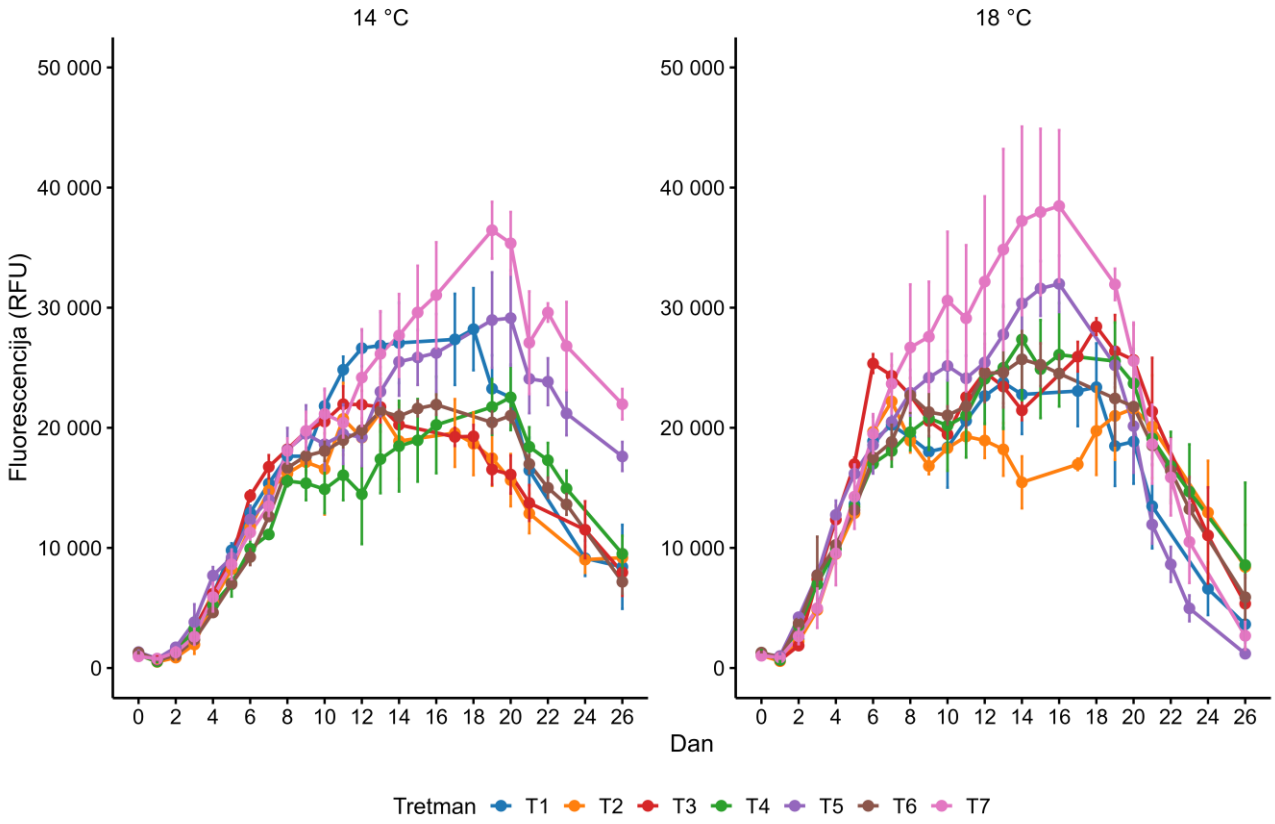
Promjene u rastu stanične kulture *P. multistriata* praćene su putem fluorescencije mjerene kroz vrijeme u eksperimentalnom sustavu s dva čimbenika: različitim tretmanima (T1–T7) i temperaturama (14 °C i 18 °C).

Vrijednosti fluorescencije razlikovale su se među tretmanima i temperaturnim uvjetima te su se kretale u rasponu od 430 RFU do 46 275 RFU. Najviše vrijednosti RFU zabilježene su u tretmanu T7 pri obje temperature, osobito pri 18 °C, dok su najniže vrijednosti zabilježene u tretmanu T2 pri 14 °C (Tablica 3.23).

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

Tretman	Uvjeti hranjivih tvari	Temperatura (°C)	Min RFU	Max RFU	Prosječna vrijednost RFU (N=3)
T1	Kontrolni tretman	14	653,07	31925,00	15834,62
T1	Kontrolni tretman	18	699,60	28050,33	14764,52
T2	−50 % fosfata	14	429,59	24980,33	12598,36
T2	−50 % fosfata	18	542,95	25944,67	14528,30
T3	−50 % silikata	14	634,84	24078,33	13709,38
T3	−50 % silikata	18	590,32	29813,67	17688,97
T4	−50 % fosfata i −50 % silikata	14	507,16	25546,00	12838,32
T4	−50 % fosfata i −50 % silikata	18	498,88	32865,84	16885,01
T5	−75 % fosfata	14	734,26	32650,00	17011,87
T5	−75 % fosfata	18	769,34	34685,67	17292,45
T6	−75 % silikata	14	633,47	22765,00	13484,00
T6	−75 % silikata	18	822,46	28063,08	16655,84
T7	−75 % fosfata i −75 % silikata	14	711,10	38683,00	19142,94
T7	−75 % fosfata i −75 % silikata	18	791,96	46275,04	20710,98

U većini tretmana vrijednosti RFU bile su više pri 18 °C nego pri 14 °C, dok je kontrolni tretman T1 pokazao nešto više vrijednosti pri 14 °C. U odnosu na kontrolu, tretmani T5 i T7 imali su više prosječne vrijednosti fluorescencije pri obje temperature, dok su tretmani T2 i T4 pri 14 °C pokazali niže vrijednosti. Ukupno, rezultati upućuju na to da izolat *P. multistriata* nije pokazao smanjenje fluorescencijskog signala u uvjetima jače smanjene dostupnosti hranjivih tvari, nego su najviše vrijednosti zabilježene upravo u proširenim tretmanima, osobito u T7. Time se T7 izdvaja kao tretman u kojem su stanice postizale najviši fluorescencijski signal, odnosno najvišu brojnost (Slika 3.18).



Slika 3.18 Vrijednosti *in vivo* fluorescencije stanične kulture *Pseudo-nitszchia multistriata* S442mu praćen fluorescencijom (RFU) u tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) pri 14 °C i 18 °C. Prikazane su aritmetičke sredine fluorescencije ± standardna devijacija (SD) na temelju bioloških replika; paneli prikazuju temperaturne uvjete.

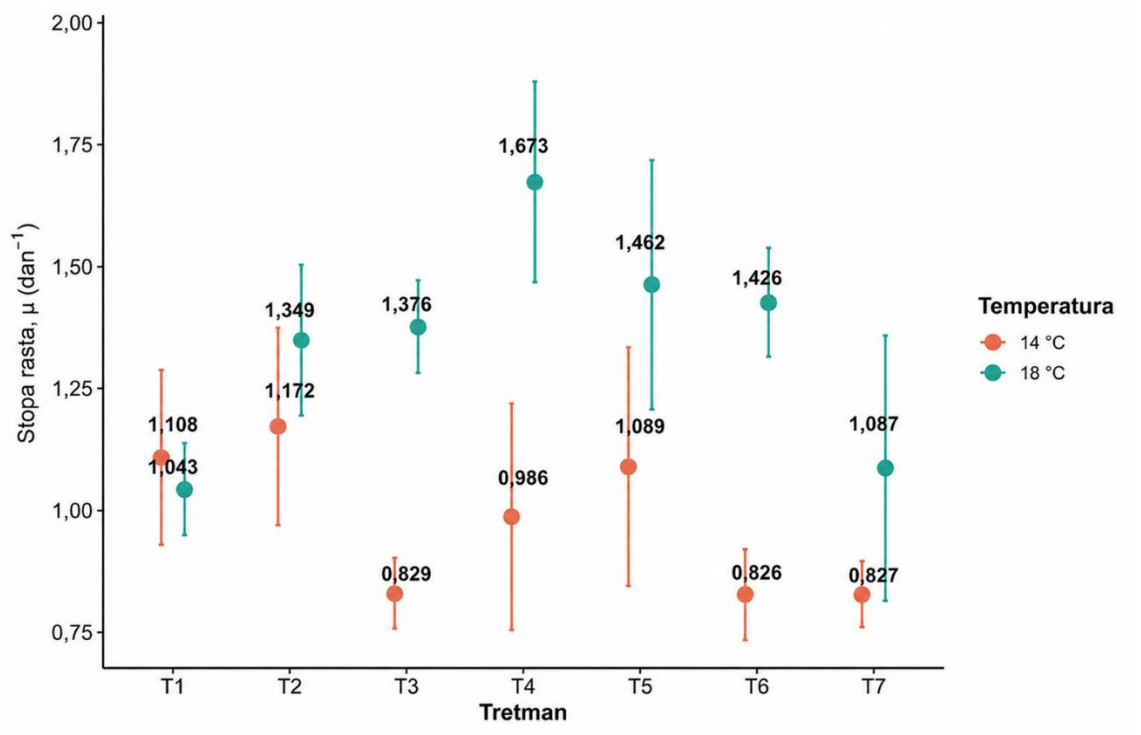
Početne brojnosti bile su relativno slične među tretmanima te su se kretale od 5,49 × 10^3 do 8,98 × 10^3 stanica mL^{-1}. Najniža početna vrijednost zabilježena je u tretmanu T7 pri 14 °C, a najviša u tretmanu T5 pri 18 °C (Prilozi – Tablica 7.5 i Tablica 7.6). U kontrolnom tretmanu T1 brojnost stanica dosezala je visoke vrijednosti pri obje temperature, s najvišim vrijednostima od 192,59 × 10^3 stanica mL^{-1} pri 14 °C i 191,57 × 10^3 stanica mL^{-1} pri 18 °C. U odnosu na kontrolu, tretmani T2, T3, T4 i T6 uglavnom su pokazali niže brojnosti stanica pri obje temperature. Tretman T5 bio je usporediv s kontrolom pri 14 °C, ali je pri 18 °C dosezao niže vrijednosti od kontrolnog tretmana.

Najviše brojnosti stanica zabilježene su u tretmanu T7 (– 75 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) pri obje temperature, s vrijednostima od 203,19 × 10^3 stanica mL^{-1} pri 14 °C i 205,33 × 10^3 stanica mL^{-1} pri 18 °C. U odnosu na kontrolni tretman T1, tretman T7 pokazao je blago više završne brojnosti, što upućuje na to da kombinirano jače smanjenje dostupnosti fosfata i silikata nije ograničilo postizanje visokih brojnosti stanica u analiziranim uvjetima.

Usporedba stopa rasta s kontrolnim tretmanom T1 pokazuje različit odgovor tretmana pri različitim temperaturama. Pri 14 °C najviša stopa rasta zabilježena je u tretmanu T2 (μ = 1,172 dan^{-1}), dok je kontrolni tretman T1 imao nešto nižu, ali sličnu vrijednost (μ = 1,108 dan^{-1}). Tretman T5 također je bio usporediv s kontrolom (μ = 1,089 dan^{-1}), dok su niže vrijednosti zabilježene u tretmanima T3 (μ = 0,829 dan^{-1}), T4 (μ = 0,986 dan^{-1}), T6 (μ = 0,826 dan^{-1}) i T7 (μ = 0,827 dan^{-1}).

Pri 18 °C većina tretmana sa smanjenom dostupnošću hranjivih tvari imala je više stope rasta od kontrolnog tretmana T1. Najviša vrijednost zabilježena je u tretmanu T4 (μ = 1,673 dan^{-1}), zatim u tretmanima T5 (μ = 1,462 dan^{-1}), T6 (μ = 1,426 dan^{-1}), T3 (μ = 1,376 dan^{-1}) i T2 (μ = 1,349 dan^{-1}). Kontrolni tretman imao je nižu vrijednost (μ = 1,043 dan^{-1}), dok je tretman T7 pokazao samo blago višu stopu rasta u odnosu na kontrolu (μ = 1,087 dan^{-1}).

Usporedba između temperatura pokazuje da većina tretmana pokazuje izražen porast stope rasta pri višoj temperaturi. Posebno se ističu tretmani T3, T4, T5 i T6, kod kojih dolazi do povećanja stope rasta pri 18 °C u odnosu na 14 °C. Suprotno tome, kontrolni tretman (T1) pokazuje blago smanjenje stope rasta pri višoj temperaturi, što upućuje na relativno stabilan odgovor neovisan o temperaturi (Slika 3.14).



Slika 3.19 Prosječna maksimalna stopa rasta (*μ*, dan^{-1}) vrste *Pseudo-nitzschia multistriata* S442mu u različitim tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 %) smanjena dostupnost fosfata i silikata. pri 14 °C i 18 °C. Točke prikazuju srednje vrijednosti, a vertikalne linije standardnu devijaciju.

3.2.3.2 Usporedba rasta izolata S442mu između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela

Analiza linearnim mješovitim modelom pokazala je da se log-transformirani fluorescencijski signal značajno razlikovao među tretmanima i temperaturnim uvjetima te se značajno mijenjao kroz vremenske točke mjerenja (Tablica 3.24).

Tablica 3.24 Učinci tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 %) temperature i dana mjerenja na fluorescencijski signal stanične kulture *Pseudo-nitzschia multistriata* S442mu prema linearnom mješovitom modelu.

Učinak	F	df	p-vrijednost
Tretman	9,74	6, 28	**< 0,001**
Temperatura	104,79	1, 28	**< 0,001**
Tretman × temperatura	5,71	6, 28	**< 0,001**
Tretman × vrijeme	2,72	108, 612	**< 0,001**
Temperatura × vrijeme	41,46	18, 612	**< 0,001**

Za razliku od prethodnih ispitivanih vrsta, *P. pseudodelicatissima* i *P. delicatissima*, kod *P. multistriata* vrste značajna je bila i interakcija tretmana i temperature, što pokazuje da obrazac razlika među tretmanima nije bio jednak pri 14 °C i 18 °C. Značajna interakcija tretmana i vremenske točke mjerenja pokazuje da se razlike među tretmanima nisu očitovale jednoliko tijekom cijelog eksperimenta, nego su se mijenjale ovisno o vremenskoj točki. Također, značajna interakcija temperature i vremenske točke mjerenja upućuje na to da se razlike između temperaturnih uvjeta nisu jednako očitovale tijekom cijelog eksperimenta.

U ukupnim post-hoc usporedbama s kontrolom samo se T7 značajno razlikovao od T1. Međutim, T2 i T5 sudjelovali su u značajnim razlikama u usporedbama s drugim tretmanima. Među svim parnim usporedbama, tretman T7 značajno se razlikovao od T1, T2, T4 i T6, dok se tretman T5 značajno razlikovao od T2 i T4. Ovi rezultati pokazuju da su najizraženija odstupanja od kontrole bila povezana s tretmanom T7 (Tablica 3.25).

Tablica 3.25 Post-hoc usporedbe tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) na procijenjenim marginalnim sredinama log-transformiranog fluorescencijskog signala vrste *P. multistriata*. Statistički značajne p-vrijednosti i odgovarajući smjerovi razlike označeni su podebljanim slovima.

Usporedba	Procjena razlike	SE	df	p-vrijednost	Smjer razlike
T1 – T2	0,103	0,038	28	0,123	nije značajno
T1 – T3	-0,046	0,038	28	0,878	nije značajno
T1 – T4	0,031	0,038	28	0,980	nije značajno
T1 – T5	-0,104	0,038	28	0,118	nije značajno
T1 – T6	0,005	0,038	28	1,000	nije značajno
T1 – T7	-0,141	0,038	28	**0,013**	**T7 viši od T1**
T2 – T3	-0,149	0,038	28	**0,007**	**T3 viši od T2**
T2 – T4	-0,072	0,038	28	0,485	nije značajno
T2 – T5	-0,207	0,038	28	**< 0,001**	**T5 viši od T2**
T2 – T6	-0,098	0,038	28	0,159	nije značajno
T2 – T7	-0,244	0,038	28	**< 0,001**	**T7 viši od T2**
T3 – T4	0,077	0,038	28	0,404	nije značajno
T3 – T5	-0,058	0,038	28	0,718	nije značajno
T3 – T6	0,051	0,038	28	0,818	nije značajno
T3 – T7	-0,095	0,038	28	0,187	nije značajno
T4 – T5	-0,135	0,038	28	**0,018**	**T5 viši od T4**
T4 – T6	-0,026	0,038	28	0,992	nije značajno
T4 – T7	-0,172	0,038	28	**0,001**	**T7 viši od T4**
T5 – T6	0,109	0,038	28	0,090	nije značajno
T5 – T7	-0,037	0,038	28	0,953	nije značajno
T6 – T7	-0,146	0,038	28	**0,009**	**T7 viši od T6**

Post-hoc usporedba temperaturnih uvjeta pokazala je značajnu razliku između 14 °C i 18 °C. Negativna procjena razlike za usporedbu 14 °C – 18 °C pokazuje da su prosječne vrijednosti fluorescencijskog signala bile više pri 18 °C nego pri 14 °C isto kao i kod prethodno analiziranih vrsta *P. pseudodelicatissima* i *P. delicatisssima* (Tablica 3.26).

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.

Usporedba	Procjena razlike	SE	df	p-vrijednost	Smjer razlike
14 °C – 18 °C	-0,205	0,020	28	**< 0,001**	**viši signal pri 18 °C**

Budući da je interakcija tretmana i temperature bila statistički značajna, dodatno su provedene post-hoc usporedbe tretmana u odnosu na kontrolni tretman T1 unutar svakog temperaturnog uvjeta. Pri 14 °C tretmani T2, T4 i T6 imali su značajno niži fluorescencijski signal u odnosu na kontrolu, dok se tretmani T3, T5 i T7 nisu značajno razlikovali od T1. Suprotno tome, pri 18 °C tretmani T3, T6 i T7 imali su značajno viši fluorescencijski signal u odnosu na kontrolu, dok se tretmani T2, T4 i T5 nisu značajno razlikovali od T1. Ovi rezultati pokazuju da učinak tretmana nije bio jednak pri obje temperature, nego je smjer odstupanja od kontrole ovisio o temperaturnom uvjetu (Tablica 3.27).

Tablica 3.27 Post-hoc usporedbe tretmana (T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata; T5 – 75 % smanjena dostupnost fosfata; T6 – 75 % smanjena dostupnost silikata; T7 – 75 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) 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.

Temperatura	Usporedba	Procjena razlike	SE	df	p-vrijednost	Smjer razlike
14	**T2 – T1**	-0,207	0,053	28	**0,003**	**T2 niži od T1**
14	T3 – T1	-0,063	0,053	28	0,388	nije značajno
14	**T4 – T1**	-0,197	0,053	28	**0,005**	**T4 niži od T1**
14	T5 – T1	0,083	0,053	28	0,388	nije značajno
14	**T6 – T1**	-0,160	0,053	28	**0,022**	**T6 niži od T1**
14	T7 – T1	0,080	0,053	28	0,388	nije značajno
18	T2 – T1	0,001	0,053	28	0,992	nije značajno
18	**T3 – T1**	0,155	0,053	28	**0,034**	**T3 viši od T1**
18	T4 – T1	0,134	0,053	28	0,052	nije značajno
18	T5 – T1	0,125	0,053	28	0,052	nije značajno
18	**T6 – T1**	0,150	0,053	28	**0,035**	**T6 viši od T1**
18	**T7 – T1**	0,202	0,053	28	**0,004**	**T7 viši od T1**

Skupno, rezultati pokazuju da rast izolata *Pseudo-nitzschia multistriata* S442mu nije bio najizraženiji u kontrolnim uvjetima, nego je snažno ovisio o kombinaciji tretmana i temperature. Smanjena dostupnost hranjivih tvari nije imala jednoznačno ograničavajući učinak: pri 14 °C niže vrijednosti fluorescencijskog signala u odnosu na T1 zabilježene su u tretmanima T2, T4 i T6, dok su pri 18 °C tretmani T3, T6 i T7 imali više vrijednosti od T1. Podaci o brojnosti stanica također pokazuju da smanjena dostupnost hranjivih tvari nije u svim tretmanima dovela do slabijeg rasta u odnosu na kontrolu. Tretman T7 izdvojio se višim vrijednostima brojnosti, osobito pri 18 °C, što upućuje na to da je odgovor izolata ovisio o kombinaciji nutritivnog tretmana i temperature, a ne samo o smanjenoj dostupnosti hranjivih tvari.

3.2.3.3 Analiza toksičnosti staničnih kultura

Proizvodnja domoične kiseline praćena je paralelno s rastom staničnih kultura *P. multistriata* kako bi se procijenila povezanost između dinamike rasta stanične kulture i sinteze toksina DK. U analiziranim uzorcima domoična kiselina nije detektirana ni pri jednoj kombinaciji tretmana i temperature.

S obzirom na to da su eksperimentalni uvjeti obuhvaćali dva temperaturna režima te sedam različitih tretmana, rezultati upućuju na to da nijedan od primijenjenih faktora nije potaknuo sintezu domoične kiseline u ispitivanoj vrsti tijekom trajanja eksperimenta.

Stanične kulture su pokazivale jasno definiranu eksponencijalnu fazu rasta i stabilnu dinamiku kroz vrijeme, bez istodobne produkcije mjerljivih koncentracija domoične kiseline. Ovi rezultati ukazuju da u ispitivanim eksperimentalnim uvjetima rast vrste *Pseudo-nitzschia multistriata* nije bio praćen toksičnim odgovorom, te da primijenjeni tretmani i temperaturni režimi nisu predstavljali okidač za sintezu domoične kiseline.

3.2.4 *Pseudo-nitzschia multiseries*-izolat T001ms

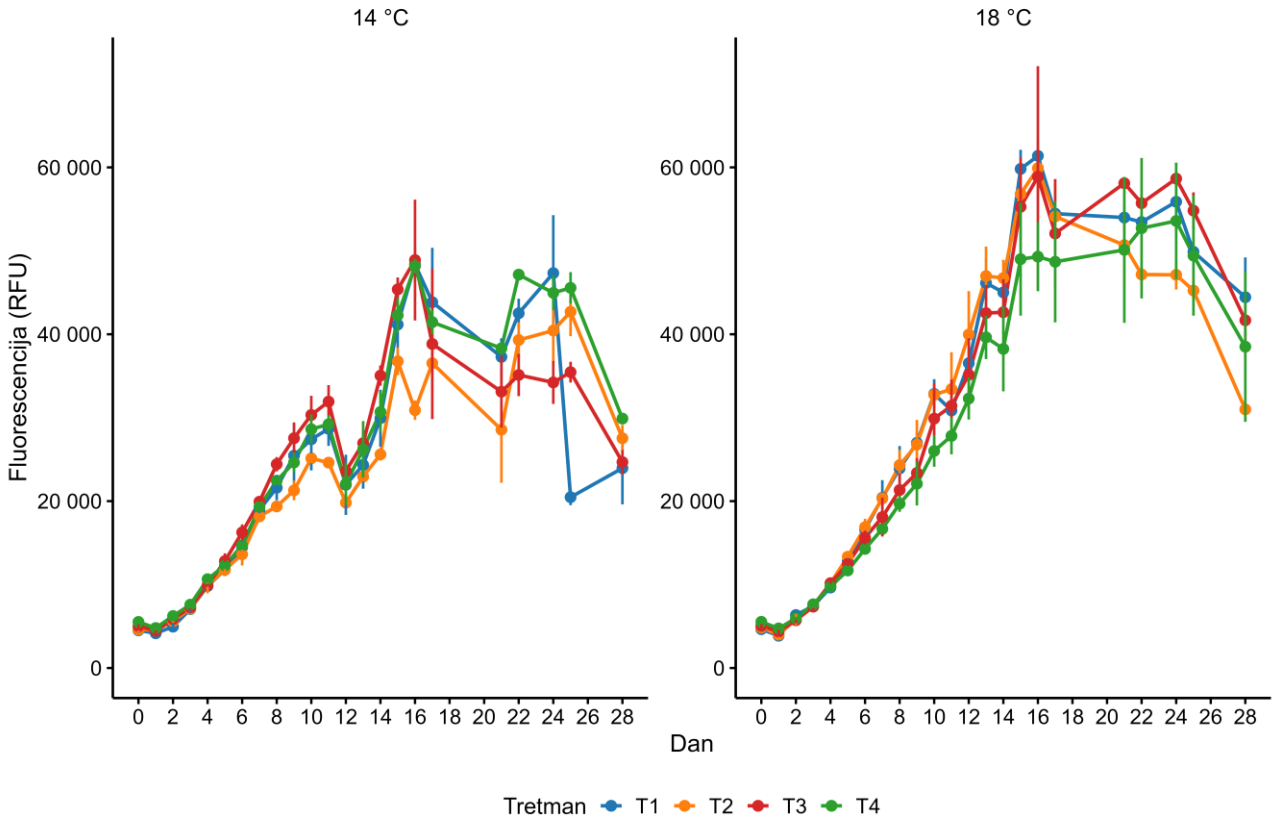
3.2.4.1 Analiza rasta staničnih kultura

U sklopu ovog istraživanja analiziran je rast stanične kulture *Pseudo-nitzschia multiseries*. Vrijednosti fluorescencije razlikovale su se među tretmanima i temperaturnim uvjetima te su se kretale u rasponu od 3823 RFU do 68 139 RFU. Najviše vrijednosti RFU zabilježene su pri 18 °C u svim tretmanima, osobito u tretmanu T3, dok su pri 14 °C vrijednosti bile niže i ujednačenije među tretmanima (Tablica 3.28).

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

Tretman	Uvjeti hranjivih tvari	Temperatura (°C)	Min RFU	Max RFU	Prosječna vrijednost RFU
T1	Kontrolni tretman	14	4013,00	52130,67	24350,49
T1	Kontrolni tretman	18	3823,00	62602,67	32927,49
T2	−50 % fosfata	14	4451,33	44655,33	22473,51
T2	−50 % fosfata	18	3865,67	62344,00	31559,03
T3	−50 % silikata	14	4092,67	53905,00	25088,99
T3	−50 % silikata	18	4033,00	68139,33	32190,81
T4	−50 % fosfata i −50 % silikata	14	4690,33	48665,33	26206,16
T4	−50 % fosfata i −50 % silikata	18	4725,00	58554,33	29278,36

U odnosu na kontrolni tretman T1, tretmani T2 i T3 pri 18 °C imali su slične prosječne vrijednosti fluorescencije, dok je tretman T4 imao nešto nižu vrijednost. Pri 14 °C prosječne vrijednosti bile su međusobno sličnije, a najviša vrijednost zabilježena je u tretmanu T4. Ovi rezultati upućuju na to da je temperaturni učinak bio izraženiji od razlika među tretmanima, budući da su vrijednosti RFU u svim tretmanima bile više pri 18 °C nego pri 14 °C (Slika 3.20).



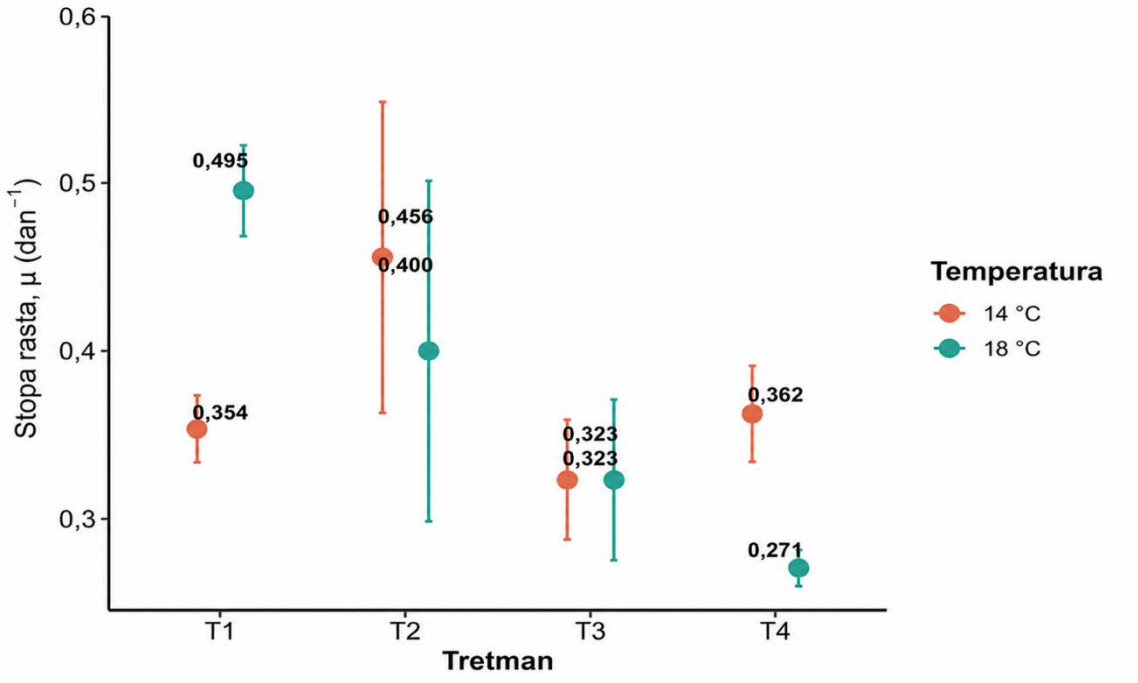
Slika 3.20 Vrijednosti in vivo fluorescencije stanične kulture *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms u tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) pri 14 °C i 18 °C. Prikazane su aritmetičke sredine fluorescencije ± standardna devijacija (SD) na temelju bioloških replika; paneli prikazuju temperaturne uvjete.

Početne brojnosti među tretmanima kretale su se u rasponu od 16,80 × 10^3 do 23,96 × 10^3 stanica mL^{-1}. Najniža početna vrijednost zabilježena je u tretmanu T1 pri 14 °C, a najviša u tretmanu T3 pri 14 °C (Prilozi – Tablica 7.7 i Tablica 7.8). U kontrolnom tretmanu T1 brojnost stanica dosezala je više vrijednosti pri 18 °C nego pri 14 °C, s najvišim vrijednostima od 162,42 × 10^3 stanica mL^{-1} pri 18 °C i 125,97 × 10^3 stanica mL^{-1} pri 14 °C. U odnosu na kontrolu, tretmani smanjene dostupnosti fosfata (T2) i silikata (T3) pri 18 °C pokazali su nešto niže ili slične brojnosti, dok su pri 14 °C najviše vrijednosti zabilježene u tretmanu T3, do 166,66 × 10^3 stanica mL^{-1}. Kombinirani tretman T4 pri 14 °C također je dosezao visoke brojnosti, dok je pri 18 °C bio niži od kontrolnog tretmana.

Ukupno, brojnosti stanica pokazuju da se odgovor izolata T001ms razlikovao između temperaturnih uvjeta. Pri 18 °C najviše brojnosti zabilježene su u kontroli T1, dok su pri 14 °C tretmani T3 i T4 dosezali više vrijednosti od kontrole. Time se ne može zaključiti da je smanjena dostupnost hranjivih tvari jednoznačno ograničila brojnost stanica, nego je učinak ovisio o tretmanu i temperaturi.

Pri 14 °C najviša stopa rasta zabilježena je u tretmanu T2 (μ = 0,456 dan⁻¹), dok su nešto niže vrijednosti zabilježene u tretmanima T4 (μ = 0,363 dan⁻¹) i T1 (μ = 0,354 dan⁻¹). Najniža stopa rasta pri 14 °C zabilježena je u tretmanu T3 (μ = 0,323 dan⁻¹).

U odnosu na kontrolu (μ =0,495 dan⁻¹), svi tretmani sa smanjenom dostupnošću hranjivih tvari pri 18 °C imali su niže vrijednosti stope rasta, pri čemu su vrijednosti iznosile μ = 0,400 dan⁻¹ u tretmanu T2, μ = 0,323 dan⁻¹ u tretmanu T3 i μ = 0,271 dan⁻¹ u tretmanu T4. Najniža vrijednost zabilježena je u kombiniranom tretmanu T4. Najniža stopa rasta je zabilježena u tretmanu T4 (μ = 0,271 dan⁻¹) (Slika 3.21).



Slika 3.21 Prosječna stopa rasta (μ, dan⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms u tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) pri 14 °C i 18 °C. Točke prikazuju srednje vrijednosti, a vertikalne linije standardnu devijaciju.

Usporedba između temperatura pokazuje da je u kontrolnom tretmanu T1 stopa rasta bila viša pri 18 °C nego pri 14 °C. Suprotno tome, u tretmanima T2 i T4 stopa rasta bila je niža pri 18 °C, dok je tretman T3 imao jednake vrijednosti pri obje temperature. Ovi rezultati upućuju na to da povišena temperatura nije jednako utjecala na rast u svim tretmanima te da je pri 18 °C učinak smanjene dostupnosti hranjivih tvari bio izraženiji u odnosu na kontrolu.

3.2.4.2 Usporedba rasta izolata T001ms između tretmana i temperaturnih uvjeta primjenom linearnog mješovitog modela

Analiza linearnim mješovitim modelom pokazala je da glavni učinak tretmana nije bio statistički značajan, dok su učinci temperature i vremenske točke mjerenja bili značajni (Tablica 3.29).

Tablica 3.29 Učinci tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) temperature i vremenske točke mjerenja na log-transformirani fluorescencijski signal za vrstu *P. multiseries* prema linearnom mješovitom modelu.

Učinak	F	df	p-vrijednost
Tretman	1,00	3, 8	0,442
Temperatura	73,06	1, 8	**< 0,001**
Tretman × temperatura	4,58	3, 8	**0,038**
Tretman × vrijeme	1,81	66, 242	**< 0,001**
Temperatura × vrijeme	15,77	22, 242	**< 0,001**

Tretmani se nisu razlikovali kao jedinstven prosječan učinak kroz cijeli eksperiment. Međutim, značajne interakcije tretman × temperatura i tretman × vrijeme mjerenja pokazuju da se razlike među tretmanima ipak pojavljuju, ali ovise o temperaturnom uvjetu i vremenu mjerenja. Značajna interakcija temperature i vremenske točke mjerenja dodatno pokazuje da se razlika između 14 °C i 18 °C nije očitovala jednoliko tijekom cijelog eksperimenta, nego se mijenjala kroz vremenski tijek rasta stanične kulture.

U svrhu detaljnijeg tumačenja značajne interakcije dobivene linearnim mješovitim modelom, provedene su post-hoc usporedbe procijenjenih marginalnih sredina. Budući da glavni učinak tretmana nije bio statistički značajan, post-hoc usporedbe nisu provedene za ukupni učinak tretmana. Post-hoc usporedba provedena je za učinak temperature, dok su zbog značajne interakcije tretmana i temperature dodatno provedene usporedbe tretmana unutar svakog temperaturnog uvjeta. Rezultati post-hoc analize pokazali su da se, unatoč značajnoj interakciji tretmana i temperature u LMM-u, pojedinačne razlike među tretmanima unutar temperaturnih uvjeta nisu izdvojile kao statistički značajne nakon korekcije za višestruke usporedbe. Stoga se interakcija tumači kao pokazatelj da se ukupni obrazac odgovora na tretmane razlikovao između 14 °C i 18 °C, ali bez jasnog izdvajanja pojedinog tretmana kao statistički različitog od ostalih.

Post-hoc usporedba temperaturnih uvjeta pokazala je značajnu razliku između 14 °C i 18 °C. Negativna procjena razlike za usporedbu 14 °C – 18 °C pokazuje da su prosječne vrijednosti fluorescencijskog signala bile više pri 18 °C nego pri 14 °C (Tablica 3.30).

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

Usporedba	Procjena razlike	SE	df	p-vrijednost	Smjer razlike
14 °C – 18 °C	-0,184	0,022	8	**< 0,001**	**viši signal pri 18 °C**

Budući da je interakcija tretmana i temperature bila statistički značajna, dodatno su provedene post-hoc usporedbe tretmana unutar svakog temperaturnog uvjeta. Međutim, nakon Tukey korekcije nijedna parna usporedba tretmana nije bila statistički značajna ni pri 14 °C ni pri 18 °C. Najizraženija razlika pri 14 °C zabilježena je između tretmana T2 i T4, ali nije dosegnula razinu statističke značajnosti ($p = 0,054$). Ovi rezultati upućuju na to da se ukupni obrazac razlika među tretmanima razlikovao između temperatura, ali da pojedinačne razlike između parova tretmana unutar svake temperature nisu bile dovoljno izražene nakon korekcije za višestruke usporedbe.

Zaključno, rast izolata T001ms bio je najjasnije povezan s temperaturom, pri čemu je 18 °C pogodovala višem fluorescencijskom signalu i većoj brojnosti u kontrolnim uvjetima (T1). Smanjena dostupnost fosfata i/ili silikata nije dovela do dosljednog smanjenja fluorescencije ili brojnosti u svim uvjetima, ali je pri 18 °C bila povezana s nižim stopama rasta u odnosu na kontrolu, osobito u kombiniranom tretmanu T4. Time rezultati upućuju na to da je kod izolata *P. multiseries* T001ms temperatura imala dominantniji učinak na ukupni fluorescencijski signal, dok se učinak smanjene dostupnosti hranjivih tvari jasnije očitovao kroz promjene stope rasta nego kroz ukupne vrijednosti fluorescencije.

3.2.4.3 Analiza toksičnosti staničnih kultura

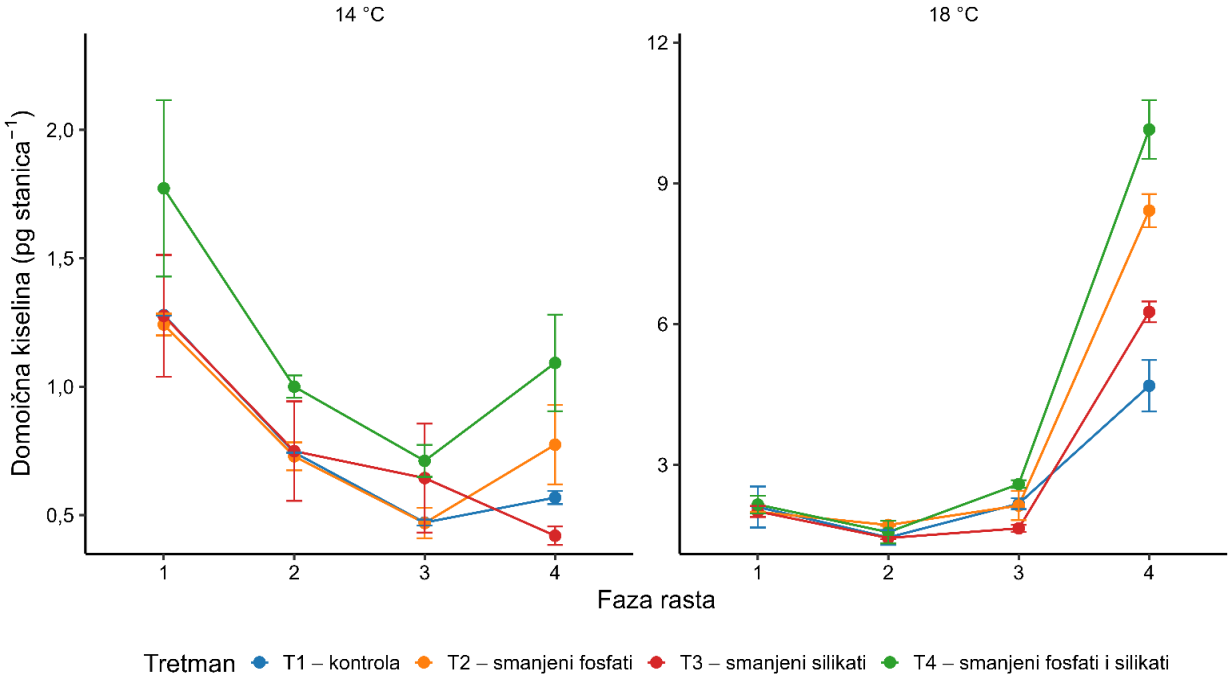
Prosječne vrijednosti domoične kiseline (DK) po stanici varirale su ovisno o temperaturi, tretmanu i fazi rasta. Općenito, više vrijednosti zabilježene su pri višoj temperaturi (18 °C) u usporedbi s 14 °C, pri čemu su razlike bile posebno izražene u kasnijim fazama rasta Koncentracije DK po stanici bile su se u rasponu od 0,42 do 10,15 pg stanica^{-1}. Najniža prosječna vrijednost zabilježena je u tretmanu T3 pri temperaturi od 14 °C u fazi rasta 4 (0,42 ± 0,04 pg stanica^{-1}), dok je najviša vrijednost zabilježena u tretmanu T4 pri 18 °C također u fazi 4 (10,15 ± 0,63 pg stanica^{-1}) (Tablica 3.31).

Tablica 3.31 Prosječne vrijednosti domoične kiseline (DK; pg stanica^{-1}) i pripadajuće standardne devijacije za vrstu *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms uzgajane pri različitim temperaturama (14 i 18 °C), tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) i fazama rasta (1–4).

Tretman	Temperatura	Faza rasta	Prosječna vrijednost DK (pg stanica^{-1})	Standardna devijacija
T1	14	1	1,279	0,002
T1	14	2	0,744	0,001
T1	14	3	0,471	0,012
T1	14	4	0,568	0,025
T1	18	1	2,102	0,437
T1	18	2	1,452	0,159
T1	18	3	2,173	0,115
T1	18	4	4,685	0,549
T2	14	1	1,242	0,042
T2	14	2	0,729	0,055
T2	14	3	0,469	0,059
T2	14	4	0,774	0,155
T2	18	1	1,998	0,004
T2	18	2	1,718	0,017
T2	18	3	2,132	0,310
T2	18	4	8,418	0,352
T3	14	1	1,276	0,237
T3	14	2	0,749	0,193
T3	14	3	0,644	0,212
T3	14	4	0,420	0,036
T3	18	1	2,007	0,117
T3	18	2	1,441	0,027
T3	18	3	1,646	0,074
T3	18	4	6,259	0,221
T4	14	1	1,773	0,344
T4	14	2	1,000	0,044
T4	14	3	0,711	0,062
T4	14	4	1,093	0,188
T4	18	1	2,153	0,189

T4	18	2	1,566	0,240
T4	18	3	2,590	0,082
T4	18	4	10,146	0,627

U ranoj eksponencijalnoj fazi (1) vrijednosti DK bile su niže i ujednačene između tretmana, s nešto višim vrijednostima pri 18 °C (≈1,99–2,15 pg stanica^{-1}) u odnosu na 14 °C (≈1,24–1,77 pg stanica^{-1}). Tijekom kasne ekponencijalne faze 2 uočeno je blago smanjenje vrijednosti DK kod većine tretmana, osobito pri 14 °C, gdje su vrijednosti bile najniže (≈0,73–1,00 pg stanica^{-1}) (Slika 3.22).



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

U stacionarnoj fazi 3 dolazi do ponovnog porasta vrijednosti DK, posebno pri 18 °C, gdje su vrijednosti dosezale do ≈2,59 pg stanica^{-1} (T4). Nasuprot tome, pri 14 °C vrijednosti su ostale niže (≈0,47–0,71 pg stanica^{-1}), što ukazuje na izražen temperaturni učinak na biosintezu toksina.

Najviše vrijednosti zabilježene su u fazi raspadanja 4 pri 18 °C, pri čemu je tretman T4 pokazao maksimalne koncentracije (≈10,15 pg stanica^{-1}), dok su i ostali tretmani pokazali značajno povišene vrijednosti (≈4,69–8,42 pg stanica^{-1}). Suprotno tome, pri 14 °C vrijednosti

su ostale niske u svim tretmanima (≈0,42–1,09 pg stanica^{-1}), bez izraženog porasta u kasnijim fazama rasta.

3.2.4.4 Rezultati analize vrijednosti domoične kiseline (DK) linearnim mješovitim modelom (LMM)

Analiza LMM-om je pokazala da su tretman, temperatura i faza rasta imali značajan učinak na vrijednost domoične kiseline (Tablica 3.32).

Tablica 3.32 Učinci tretmana (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata) temperature i faze uzorkovanja na log-transformiranu koncentraciju domoične kiseline *P. multiseries* prema linearnom mješovitom modelu. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti.

Učinak	F	df	p-vrijednost
Tretman	15,54	3, 8	**0,001**
Temperatura	869,81	1, 8	**< 0,001**
Faza rasta	142,93	3, 33	**< 0,001**
Tretman × temperatura	1,28	3, 8	0,346
Tretman × faza rasta	4,54	9, 33	**< 0,001**
Temperatura × faza rasta	201,27	3, 33	**< 0,001**

Značajna interakcija tretmana i faze uzorkovanja pokazuje da se razlike među tretmanima nisu jednako očitovale u svim fazama rasta, nego su ovisile o fazi rasta. Također, značajna interakcija temperature i faze rasta pokazuje da se razlika između 14 °C i 18 °C mijenjala među fazama. Interakcija tretmana i temperature nije bila statistički značajna, što upućuje na to da ukupni obrazac razlika među tretmanima nije značajno ovisio o temperaturi.

U svrhu detaljnijeg tumačenja značajne interakcije utvrđene linearnim mješovitim modelom, provedene su post-hoc usporedbe procijenjenih marginalnih sredina. Budući da je značajna bila interakcija tretmana i faze rasta, usporedbe tretmana provedene su unutar svake faze uzorkovanja.

Post-hoc usporedbe pokazale su da u fazama rasta 1 i 2 nisu zabilježene značajne razlike među tretmanima (Tablica 3.33).

Tablica 3.33 Značajne post-hoc razlike u vrijednosti domoične kiseline (DK; pg stanica^{-1}) među tretmanima (T1 – kontrolni tretman; T2 – 50 % smanjena dostupnost fosfata; T3 – 50 % smanjena dostupnost silikata; T4 – 50 % smanjena dostupnost fosfata i silikata)tijekom faza uzorkovanja kod vrste *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Faza rasta	Usporedba	p-vrijednost	Smjer razlike
3	T4 – T3	**0,037**	**T4 viši**
4	T2 – T1	**< 0,001**	**T2 viši**
4	T4 – T1	**< 0,001**	**T4 viši**
4	T2 – T3	**0,002**	**T2 viši**
4	T4 – T3	**< 0,001**	**T4 viši**

Prva značajna razlika pojavila se u fazi 3, gdje je tretman T4 imao višu koncentraciju domoične kiseline u odnosu na T3. Najizraženije razlike među tretmanima zabilježene su u fazi 4. U toj fazi T2 je imao višu koncentraciju domoične kiseline od T1 i T3, dok je T4 imao višu koncentraciju od T1 i T3. Ovi rezultati pokazuju da se razlike među tretmanima nisu pojavile u ranim fazama uzorkovanja, nego su bile najizraženije u kasnijoj fazi.

S obzirom na značajnu interakciju temperature i faze rasta stanične kulture, provedene su post-hoc usporedbe temperatura unutar svake faze. Rezultati su pokazali da je vrijednost domoične kiseline bila značajno viša pri 18 °C u svim fazama uzorkovanja (Tablica 3.34).

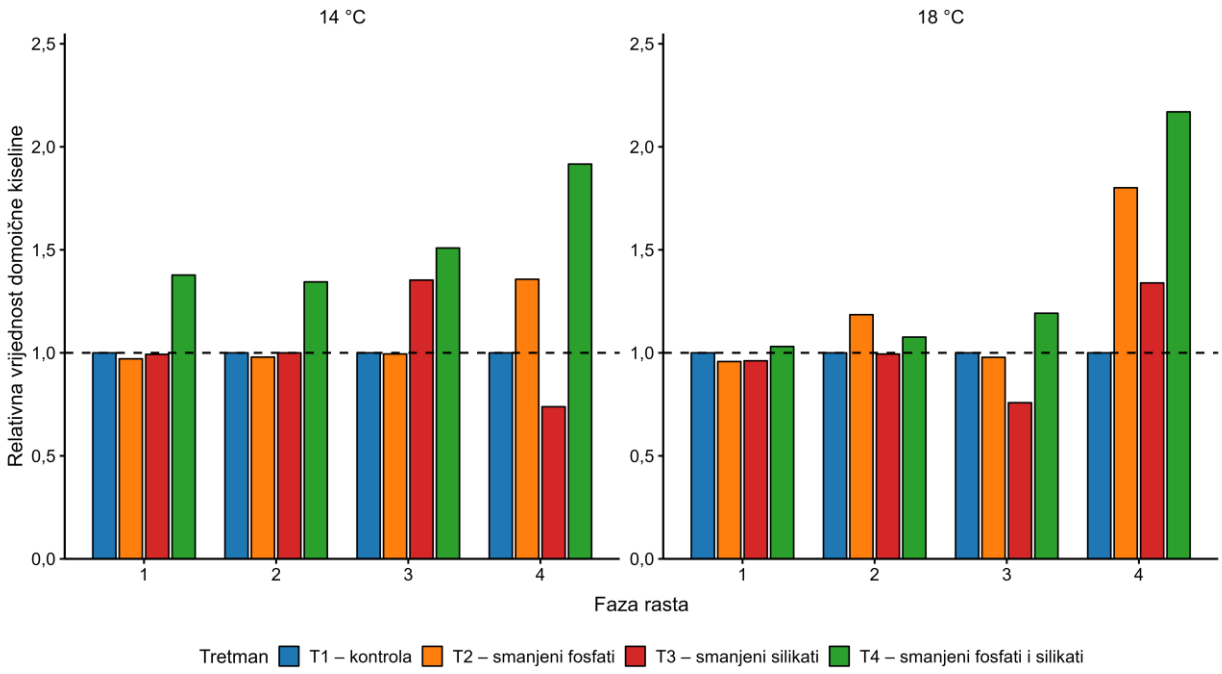
Tablica 3.34 Značajne post-hoc razlike u vrijednosti domoične kiseline (DK; pg stanica^{-1}) između temperatura tijekom faza uzorkovanja kod vrste *Pseudo-nitzschia multiseries* T001ms. Podebljane su statistički značajne p-vrijednosti i pripadajući smjerovi razlike.

Faza rasta	Usporedba	Prilagođena p-vrijednost	Smjer razlike
1	14 °C – 18 °C	**< 0,001**	**18 °C viši DK**
2	14 °C – 18 °C	**< 0,001**	**18 °C viši DK**
3	14 °C – 18 °C	**< 0,001**	**18 °C viši DK**
4	14 °C – 18 °C	**< 0,001**	**18 °C viši DK**

Razlika između temperatura bila je prisutna već u fazi 1, ali se povećavala kroz faze uzorkovanja. Najizraženija razlika zabilježena je u fazi 4, gdje je koncentracija domoične kiseline pri 18 °C bila znatno viša nego pri 14 °C. Ovi rezultati upućuju na izražen učinak povišene temperature na koncentraciju domoične kiseline, osobito u kasnijim fazama rasta.

Ukupno gledano, rezultati post hoc analiza potvrđuju da je temperatura bila ključan čimbenik u regulaciji proizvodnje DK, pri čemu su razlike između 14 °C i 18 °C postajale sve izraženije u kasnijim fazama rasta.

Relativne promjene u proizvodnji domoične kiseline u odnosu na kontrolni tretman (T1) dodatno su prikazane na Slici 3.23, gdje je vidljivo da se razlike među tretmanima povećavaju u kasnijim fazama rasta, osobito pri temperaturi od 18 °C.



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 multiseries* (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.

4 Diskusija

Ovo istraživanje obuhvatilo je 54 izolata osam vrsta roda *Pseudo-nitzschia* (*P. allochrona, P. calliantha, P. delicatissima, P. fraudulenta, P. galaxiae, P. mannii, P. multistriata* i *P. pseudodelicatissima*) s područja srednjeg Jadrana pri standardnim uvjetima uzgoja te analizu četiriju odabranih izolata (*P. pseudodelicatissima, P. delicatissima, P. multistriata* i *P. multiseries*) pri promjenama temperature i dostupnosti hranjivih tvari, odnosno pri izmijenjenim uvjetima uzgoja. Iako su prethodna istraživanja u Jadranskom moru znatno pridonijela poznavanju raznolikosti, sezonske dinamike i toksičnosti ovoga roda, uglavnom su bila usmjerena na sjeverni i sjeverozapadni Jadran ili su obuhvaćala manji broj izolata, vrsta i eksperimentalnih uvjeta. U sjevernom Jadranu istražena su ekološka, morfološka i molekularna obilježja sedam vrsta roda *Pseudo-nitzschia*, dok je toksičnost analizirana u 20 uzoraka staničnih kultura, u jednoj točki uzorkovanja i bez praćenja promjena tijekom različitih faza rasta (Marić Pfannkuchen, 2013). U sjeverozapadnom Jadranu analizirano je 138 izolata, ali domoična kiselina nije zabilježena ni u jednom od njih (Giulietti i sur., 2021). Turk Dermastia i sur. (2022) analizirali su 33 izolata, pri čemu je proizvodnja domoične kiseline u toksičnih izolata dodatno praćena u više vremenskih točaka. Ovo istraživanje istodobno uspoređuje veći broj izolata i vrsta s područja uzgoja školjkaša srednjeg Jadrana te povezuje dinamiku rasta i proizvodnju domoične kiseline u standardnim i izmijenjenim uvjetima uzgoja.

4.1 Dinamika rasta staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* pri standardnim i izmijenjenim uvjetima

4.1.1 Brojnost stanica, stope rasta i utjecaj temperature

Među vrstama analiziranima pri standardnim uvjetima uzgoja najveće brojnosti postigli su izolati *P. delicatissima*, s vrijednostima do 819,00 × 10^3 stanica mL^{-1}. Takav je rezultat u skladu s prethodnim istraživanjima u kojima je ova vrsta u kulturi dosezala brojnosti do 1,6 × 10^6 stanica mL^{-1} (Fehling i sur., 2005). Visoke brojnosti zabilježene su i za *P. galaxiae*, čiji su izolati dosegnuli do 466,80 × 10^3 stanica mL^{-1}. Turk Dermastia i sur. (2022) navode da ova vrsta u kulturi može dosegnuti brojnosti veće od 1 × 10^6 stanica mL^{-1}, dok su visoke brojnosti potvrđene i u prirodnim populacijama Napuljskog zaljeva (Cerino i sur., 2005). Izolati *P. calliantha* u ovom su istraživanju postigli maksimalne brojnosti od 113,75 × 10^3 do 277,60 × 10^3 stanica mL^{-1}, što je unutar raspona prethodno zabilježenih laboratorijskih vrijednosti od 272 × 10^3 do 1,97 × 10^6 stanica mL^{-1} (Thessen i sur., 2009).

Najviše stope rasta pri standardnim uvjetima zabilježene su za *P. delicatissima*, zatim za *P. pseudodelicatissima* i *P. mannii*. Visoka stopa rasta vrste *P. delicatissima* u skladu je s vrijednošću od 1,47 dan^{-1} koju su zabilježili Lundholm i sur. (2004), dok su u uvjetima promijenjene dostupnosti željeza i bakra zabilježene niže vrijednosti, s najvišom stopom od 0,91 dan^{-1} u kontrolnim kulturama (Lelong i sur., 2013). Visoke stope rasta vrste *P.*

pseudodelicatissima prethodno su zabilježili i Lundholm i sur. (1997). U vrsta zastupljenih izolatima s više područja pojedine više stope rasta zabilježene su za izolate iz Malostonskog zaljeva, ali se zbog neujednačenog broja izolata po područjima takve razlike ne mogu jednoznačno povezati s područjem izolacije.

Rezultati eksperimenata provedenih pri izmijenjenim uvjetima uzgoja, koji su uključivali temperature od 14 °C i 18 °C te promijenjenu dostupnost hranjivih tvari, dodatno su pokazali da odgovor na temperaturu nije bio jednak među vrstama ni među različitim pokazateljima rasta. U svih analiziranih izolata ukupni fluorescencijski signal bio je viši pri 18 °C, a taj je učinak bio osobito izražen u vrste *P. multiseries*. Međutim, više vrijednosti fluorescencije nisu uvijek bile praćene višim stopama rasta ili većim brojnostima stanica. U vrste *P. pseudodelicatissima* stope rasta u većini nutritivnih uvjeta bile su više pri 14 °C, dok je u vrste *P. delicatissima* najviša stopa rasta također zabilježena pri 14 °C. Nasuprot tome, u vrste *P. multistriata* stope rasta u većini izmijenjenih nutritivnih uvjeta bile su više pri 18 °C, a najviša vrijednost zabilježena je pri kombiniranom smanjenju dostupnosti fosfata i silikata. U vrste *P. multiseries* viša temperatura povećala je fluorescencijski signal, ali nije dosljedno povećala stopu rasta.

Takvo razilaženje pokazuje da fluorescencijski signal, brojnost stanica i stopa rasta opisuju različite dijelove dinamike rasta kulture. Fluorescencijski signal korišten je kao neizravni pokazatelj promjena u rastu stanične kulture, pri čemu na njegov intenzitet mogu utjecati i fotosintetska aktivnost te fiziološko stanje stanica, dok stopa rasta opisuje najveći relativni porast tijekom eksponencijalne faze. Zbog toga uvjeti u kojima je zabilježena najveća stopa rasta ne moraju biti isti kao oni u kojima su postignute najveće brojnosti ili najviše vrijednosti fluorescencije. To je bilo osobito vidljivo u vrste *P. multistriata*, u koje su najveće vrijednosti fluorescencije i brojnosti zabilježene pri najvećem kombiniranom smanjenju dostupnosti fosfata i silikata, dok je najviša stopa rasta zabilježena pri blažem kombiniranom smanjenju i temperaturi od 18 °C.

Različiti odgovori istraživanih vrsta u skladu su s dosadašnjim spoznajama prema kojima temperatura utječe na rast morskog fitoplanktona, ali smjer i intenzitet odgovora ovise o biološkim značajkama vrste i drugim okolišnim uvjetima (Bissinger i sur., 2008). U vrste *P. australis* stopa rasta povećavala se do temperaturnog optimuma između 13,5 i 18,6 °C, ovisno o intenzitetu svjetlosti, a zatim se pri višim temperaturama smanjivala (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 pojedinu vrstu može ubrzati rast, ali taj učinak ovisi i o svjetlosti i dostupnosti hranjivih tvari (Edwards i sur., 2016).

U prirodnim populacijama sjeverozapadnog Japanskog mora zabilježena je pozitivna povezanost između temperature vode i brojnosti vrste *P. multistriata*, a dugoročno zatopljenje navedeno je kao jedan od mogućih čimbenika promjene sastava cvjetajućih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* (Stonik, 2021). Budući da je riječ o terenskom istraživanju, ta povezanost ne potvrđuje izravno uzročno djelovanje temperature, ali podupire rezultat ovog istraživanja prema kojem je viša temperatura pogodovala stopi rasta *P. multistriata* u većini nutritivnih uvjeta.

U kontekstu klimatskih promjena porast temperature mora, promjene u stratifikaciji vodenog stupca i dostupnosti hranjivih tvari mogu mijenjati sastav fitoplanktonske zajednice i uvjete pogodne za razvoj pojedinih štetnih vrsta (Gobler, 2020). Međutim, povećane metaboličke potrebe pri višoj temperaturi ne moraju nužno dovesti do većih brojnosti ili viših stopa rasta ako je istodobno ograničena dostupnost hranjivih tvari (Boyd i sur., 2013). Budući da su u ovom istraživanju ispitane samo dvije temperature, 14 °C i 18 °C, dobiveni rezultati prikazuju odgovor istraživanih izolata unutar ograničenog temperaturnog raspona. To je važno uzeti u obzir jer se temperature obalnih voda sjevernog i srednjeg Jadrana sezonski kreću od približno 7 °C zimi do 27 °C ljeti, dok su dublje vode temperaturno stabilnije, s vrijednostima od približno 10 do 18 °C (Russo i sur., 2012).

Na dinamiku rasta mogle su utjecati i razlike u početnom fiziološkom stanju kultura. U pojedinim slučajevima veća početna brojnost inokuluma bila je povezana s nižom stopom rasta, iako je eksponencijalna faza i dalje bila jasno prepoznatljiva. U nekoliko izolata faza odumiranja nije bila jasno uočljiva, pa je četvrta točka uzorkovanja odgovarala stacionarnoj fazi. Takva odstupanja vjerojatno su posljedica manjih vremenskih neusklađenosti uzorkovanja, faze rasta matične kulture u trenutku inokulacije i mogućih odstupanja pri brojanju, što potvrđuje složenost čimbenika koji određuju dinamiku rasta kultura roda *Pseudo-nitzschia* (Turk Dermastia i sur., 2022).

4.1.2 Utjecaj smanjene dostupnosti hranjivih tvari na rast

Smanjena dostupnost silikata najjasnije je ograničila rast izolata *P. pseudodelicatissima* i *P. delicatissima*. U obe vrste zabilježene su niže vrijednosti fluorescencije, dok su u vrste *P. pseudodelicatissima* smanjene i brojnost stanica i stopa rasta pri 14 °C. Silicij je dijatomejama potreban za izgradnju silicificirane stanične stijenke, pa njegova smanjena dostupnost može izravno ograničiti staničnu diobu i fiziologiju rasta (Pan i sur., 1996a; Trainer i sur., 2012).

Ipak, odgovor na smanjenu dostupnost silikata nije bio jednak među svim vrstama. U vrste *P. multistriata* ni blaže ni veće smanjenje dostupnosti silikata nije dovelo do jasnog ograničenja rasta. Naprotiv, najveće brojnosti i vrijednosti fluorescencije zabilježene su u uvjetima najvećeg kombiniranog smanjenja fosfata i silikata, dok se ostali nutritivni uvjeti nisu značajno razlikovali od kontrole. To pokazuje da se učinak smanjenja silikata ne može promatrati odvojeno od vrste, temperature i odnosa s ostalim hranjivim tvarima.

Smanjena dostupnost fosfata također nije imala jednak učinak među vrstama ni temperaturama. U vrste *P. delicatissima* najviša stopa rasta pri 14 °C zabilježena je upravo pri smanjenoj dostupnosti fosfata, dok je pri 18 °C bila niža od kontrolne vrijednosti. Takav rezultat pokazuje da smanjenje fosfata u primijenjenom rasponu nije bilo jednoznačno ograničavajuće. S tim su u skladu opažanja iz sjevernog Jadrana, gdje je kompleks vrste *P. delicatissima* često zabilježen u uvjetima nižih koncentracija fosfata (Turk Dermastia i sur., 2020). Različit odgovor na smanjenu dostupnost fosfata i silikata upućuje na to da te hranjive tvari mogu različito regulirati metabolizam, fiziologiju i stopu rasta vrste *P. delicatissima* (Pan i sur., 1996b; Tatters i sur., 2012).

Kombinirano smanjenje fosfata i silikata također je izazvalo različite odgovore. U vrste *P. pseudodelicatissima* nije ograničilo rast, nego je bilo povezano s visokim brojnostima, fluorescencijom i najvišim stopama rasta pri obje temperature. U vrste *P. multistriata* najviša stopa rasta u cijelom eksperimentu zabilježena je pri kombiniranom smanjenju fosfata i silikata i temperaturi od 18 °C. Nasuprot tome, u vrste *P. multiseries* isti je tip nutritivnog uvjeta pri 18 °C bio povezan s najnižom stopom rasta. Ti rezultati pokazuju da odgovor ne ovisi samo o smanjenju pojedinog nutrijenta, nego i o njihovu međusobnom omjeru i fiziološkim značajkama vrste.

Brzezinski (1985) pokazao je da se omjeri silicija, ugljika i dušika razlikuju među vrstama dijatomeja i mijenjaju ovisno o uvjetima uzgoja, što upućuje na različite nutritivne potrebe pojedinih vrsta. U zaljevu Seine visoke vrijednosti domoične kiseline bile su povezane s prisutnošću *P. australis* i mogućim ograničenjem silikata, odnosno niskim omjerom Si:N (Thorel i sur., 2017). Iako se taj rezultat odnosi na prirodnu populaciju i drugu vrstu, podupire zaključak da fiziološki odgovor ne određuje samo koncentracija pojedinog nutrijenta, nego i njegov odnos s drugim hranjivim tvarima.

Relativno niske stope rasta *P. multiseries* u usporedbi s prethodno zabilježenim vrijednostima (do 1,12 dan^{-1}) mogu biti povezane s dugotrajnim održavanjem korištene kulture u laboratorijskim uvjetima (Lundholm i sur., 2004; Martin-Jézéquel i sur., 2015). Dugotrajan uzgoj može utjecati na fiziološko stanje kulture, uključujući stopu rasta i metaboličku aktivnost (Lakeman i sur., 2009; Lelong i sur., 2014). Zbog toga njezin odgovor nije moguće pripisati samo temperaturi i dostupnosti hranjivih tvari.

Sveukupno, smanjena dostupnost silikata najjasnije je ograničila rast *P. pseudodelicatissima* i *P. delicatissima*, dok su *P. multistriata* i *P. multiseries* pokazale drukčije odgovore. Kombinirano smanjenje fosfata i silikata nije nužno djelovalo negativno, nego je u pojedinih vrsta bilo povezano s visokim brojnostima ili stopama rasta. Rast analiziranih izolata stoga je ovisio o zajedničkom učinku temperature, dostupnosti hranjivih tvari i značajkama pojedine vrste.

4.2 Toksičnost staničnih kultura *Pseudo-nitzschia* pri standardnim i izmijenjenim uvjetima

4.2.1 Proizvodnja domoične kiseline u istraživanim vrstama

Od osam vrsta analiziranih pri standardnim uvjetima uzgoja mjerljive količine domoične kiseline proizvodila je samo *P. pseudodelicatissima*. Izolati ove vrste dobiveni su iz uzoraka prikupljenih u razdoblju u kojem su mjerljive vrijednosti domoične kiseline zabilježene u dagnjama, što je upućivalo na prisutnost toksičnih predstavnika roda *Pseudo-nitzschia* na istraživanom području. Dosad je u sjevernom Jadranu domoična kiselina u školjkašima zabilježena nakon cvjetanja *P. calliantha* (Marić Pfannkuchen i sur., 2011), dok je u srednjem Jadranu zabilježena u školjkašima i planktonskim mrežnim uzorcima tijekom cvjetanja roda *Pseudo-nitzschia*, uz istodobnu prisutnost više potencijalno toksičnih vrsta (Arapov i sur., 2016). Proizvodnja domoične kiseline naknadno je potvrđena u kulturama *P.*

calliantha izoliranima iz srednjeg Jadrana (Arapov i sur., 2020). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da je i *P. pseudodelicatissima* jedan od mogućih izvora domoične kiseline na tom području.

Pri izmijenjenim uvjetima uzgoja mjerljivu proizvodnju domoične kiseline pokazale su *P. pseudodelicatissima* i *P. multiseries*, dok u *P. delicatissima* i *P. multistriata* toksin nije zabilježen ni pri jednoj kombinaciji temperature i dostupnosti hranjivih tvari. Slično tome, pri standardnim uvjetima domoična kiselina nije zabilježena ni u *P. calliantha, P. delicatissima, P. fraudulenta, P. galaxiae* i *P. multistriata*. Ipak, izostanak mjerljive domoične kiseline u analiziranim izolatima ne isključuje njihov toksikološki potencijal. Proizvodnja domoične kiseline prethodno je potvrđena u *P. calliantha* (Arapov i sur., 2020; Hlaili i sur., 2016; Tanković i sur., 2022), *P. delicatissima* (Fernandes i sur., 2014; Penna i sur., 2013; Sahraoui i sur., 2011; Tanković i sur., 2022; Turk Dermastia i sur., 2022), *P. fraudulenta* (Fernandes i sur., 2014; Lema i sur., 2017; Tatters i sur., 2012), *P. galaxiae* (Moschandreou i sur., 2012; Turk Dermastia i sur., 2022) i *P. multistriata* (Orsini i sur., 2002; Pistocchi i sur., 2012; Turk Dermastia i sur., 2022). Te se vrste smatraju slabo ili varijabilno toksičnima, pa ne proizvode nužno mjerljive količine toksina u svim uvjetima.

Izolati *P. allochrona* i *P. mannii* također nisu proizvodili domoičnu kiselinu, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Amato i Montresor, 2008; Hlaili i sur., 2016; Percopo i sur., 2022; Quijano-Scheggia i sur., 2010). Sveukupno, rezultati potvrđuju izraženu varijabilnost toksičnosti unutar roda *Pseudo-nitzschia*, ne samo među vrstama nego i među izolatima iste vrste. Thessen i sur. (2009) utvrdili su toksičnost u samo dva od devet izolata *P. calliantha* i dva od pet izolata *P. fraudulenta*. Stoga izostanak domoične kiseline u pojedinom izolatu i eksperimentalnom uvjetu ne znači da vrsta nema sposobnost njezine proizvodnje.

Vrijednosti domoične kiseline znatno su se razlikovale između dviju vrsta koje su je proizvodile pri izmijenjenim uvjetima. U vrste *P. pseudodelicatissima* kretale su se od 0,001071 do 0,005823 pg stanica^{-1}, dok su u vrste *P. multiseries* iznosile od približno 0,42 do 10,15 pg stanica^{-1}. Vrsta *P. multiseries* posebno je toksikološki značajna jer je povezana s prvim opisanim slučajem amnezijskog trovanja školjkašima (Bates, 1989). Raspon dobiven za *P. multiseries* nalazi se unutar širokog raspona prethodno zabilježenih vrijednosti od 0,0003 do 21 pg stanica^{-1} (Dong i sur., 2020; Nishimura i sur., 2021; Orlova i sur., 2008). Za isti izolat iz Mramornog mora Sezgin i sur. (2025) pri standardnim uvjetima zabilježili su vrijednosti od 2,46 do 3,24 pg stanica^{-1}. U ovom su istraživanju u pojedinim uvjetima zabilježene više vrijednosti, što pokazuje da se njegova toksičnost može povećati ovisno o kombinaciji temperature, dostupnosti hranjivih tvari i faze rasta.

Nasuprot tome, izolat *P. pseudodelicatissima* K357ps pri izmijenjenim je uvjetima proizvodio nekoliko puta manje domoične kiseline nego pri ranijoj analizi u standardnim uvjetima, kada je najveća vrijednost iznosila 0,0250 pg stanica^{-1}. Jedno od mogućih objašnjenja jest vremenski odmak između analiza i dulje održavanje kulture u laboratoriju. Smanjenje toksičnosti tijekom dugotrajnog održavanja prethodno je zabilježeno u pojedinih izolata roda *Pseudo-nitzschia*, iako takav obrazac nije jednak u svih vrsta i izolata (Fernandes i sur., 2014). Zbog toga se niže vrijednosti izolata K357ps ne mogu pripisati isključivo primijenjenim eksperimentalnim uvjetima.

4.2.2 Odnos faze rasta i proizvodnje domoične kiseline

U većine toksičnih izolata *P. pseudodelicatissima* pri standardnim uvjetima domoična kiselina zabilježena je u fazi odumiranja. Izolat K357ps dosegnuo je najveću proizvodnju toksina upravo u toj fazi, a ukupno je devet od jedanaest toksičnih izolata proizvodilo domoičnu kiselinu tijekom odumiranja. Takav je obrazac u skladu s rezultatima Moschandreou i Nikolaidis (2010), koji su također zabilježili proizvodnju toksina u vrste *P. pseudodelicatissima* u kasnijoj fazi rasta.

Pri izmijenjenim uvjetima najniže vrijednosti domoične kiseline u *P. pseudodelicatissima* i *P. multiseries* zabilježene su tijekom eksponencijalnog rasta, odnosno u razdoblju intenzivne diobe stanica. U vrste *P. pseudodelicatissima* više su vrijednosti zabilježene u kasnijim fazama, a najveća je vrijednost postignuta u fazi odumiranja pri 14 °C i smanjenoj dostupnosti silikata. U vrste *P. multiseries* najveća vrijednost također je zabilježena u fazi odumiranja, ali pri 18 °C i kombiniranom smanjenju dostupnosti fosfata i silikata.

Prethodna istraživanja drugih vrsta pokazuju da odnos faze rasta i proizvodnje domoične kiseline nije jednak u cijelom rodu. *P. calliantha* iz srednjeg Jadrana pokazala je najviše vrijednosti toksina u ranoj fazi rasta i pri nižoj brojnosti stanica (Arapov i sur., 2020), a sličan je obrazac zabilježen u toksičnih izolata *P. multistriata* iz sjevernog Jadrana (Turk Dermastia i sur., 2022). U nekih vrsta sinteza domoične kiseline započinje tijekom eksponencijalnog rasta, dok se u drugih povećava nakon usporavanja rasta i ulaska u stacionarnu fazu, često u uvjetima nutritivnog ili drugog fiziološkog stresa (Bates i sur., 2018).

U ovom istraživanju nije utvrđen jednoznačan odnos između brojnosti stanica i proizvodnje domoične kiseline. Toksin je u pojedinim slučajevima bio prisutan pri niskoj brojnosti u ranoj fazi, dok visoka brojnost u stacionarnoj fazi nije nužno bila povezana s većom količinom toksina. Praćenje više faza rasta stoga omogućuje potpuniji uvid od pristupa u kojima se toksičnost određuje samo u jednoj vremenskoj točki, primjerice u ranoj stacionarnoj fazi (Accoroni i sur., 2020) ili samo u stacionarnoj fazi (Turk Dermastia i sur., 2022).

4.2.3 Utjecaj temperature na proizvodnju domoične kiseline

Učinak temperature na proizvodnju domoične kiseline razlikovao se između analiziranih vrsta i faza rasta. U vrste *P. pseudodelicatissima* tijekom eksponencijalnog rasta više vrijednosti zabilježene su pri 18 °C, dok je u fazi odumiranja najveća vrijednost zabilježena pri 14 °C. Takav rezultat pokazuje da učinak temperature ovisi i o fiziološkom stanju kulture.

Prethodna istraživanja također pokazuju izraženu temperaturnu varijabilnost toksičnosti vrste *P. pseudodelicatissima*. Izolat iz sjevernog Jadrana uzgajan pri 16 °C proizvodio je niže vrijednosti domoične kiseline (Tanković i sur., 2022), dok su Lapworth i sur. (2001) zabilježili proizvodnju toksina samo u jednoj od pet kultura uzgajanih pri 14 °C. Svih šest izolata iz Solunskog zaljeva proizvodilo je domoičnu kiselinu pri 19 °C (Moschandreou i

sur., 2010), dok izolati uzgajani pri 20 i 24 °C nisu proizvodili mjerljive količine toksina (Lundholm i sur., 2003; Orsini i sur., 2002). U standardnim uvjetima ovog istraživanja 11 od 12 izolata proizvodilo je domoičnu kiselinu pri 18 °C, a eksperiment s izmijenjenim uvjetima potvrdio je da izolat K357ps proizvodi toksin i pri 14 °C. Toksičnost ove vrste stoga nije ograničena na jedan temperaturni uvjet.

U vrste *P. multiseries* temperaturni je odgovor bio jasniji jer su vrijednosti domoične kiseline pri 18 °C bile više nego pri 14 °C. Najveća vrijednost zabilježena je pri 18 °C, u kombiniranom nutritivnom tretmanu i fazi odumiranja. Lewis i sur. (1993) također su pokazali da se proizvodnja domoične kiseline u vrste *P. multiseries* povećavala s porastom temperature. Sličan temperaturni odgovor zabilježen je u vrste *P. seriata* (Weber i sur., 2025), dok je u vrste *P. australis* učinak temperature ovisio i o dostupnosti hranjivih tvari i intenzitetu svjetlosti (Santiago-Morales i García-Mendoza, 2011; Thorel i sur., 2014).

Terenska istraživanja dodatno podupiru moguću povezanost toplijih uvjeta i povećane toksičnosti. Na području sjeveroistočnog Pacifika povišene vrijednosti domoične kiseline u školjkašima bile su povezane s pozitivnim temperaturnim anomalijama površine mora i izraženijim toplim fazama Oceanic Niño Indexa (McKibben i sur., 2017). Ti rezultati ne izdvajaju pojedinačne vrste, nego domoičnu kiselinu promatraju kao posljedicu prisutnosti toksičnih predstavnika roda u sustavu. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da viša temperatura može povećati proizvodnju toksina u pojedinih izolata, osobito izolata vrste *P. multiseries*, ali se ne mogu generalizirati na cijeli rod zbog ograničenog broja toksičnih izolata i ispitivanja samo dviju temperatura.

4.2.4 Utjecaj smanjene dostupnosti hranjivih tvari na proizvodnju domoične kiseline

U izolata vrste *P. pseudodelicatissima* pojedinačno smanjenje dostupnosti fosfata ili silikata bilo je povezano s višim vrijednostima domoične kiseline u odnosu na kontrolni tretman i kombinirano smanjenje obaju nutrijenata. Iako je najviša prosječna vrijednost zabilježena pri smanjenoj dostupnosti silikata, razlika između tretmana sa smanjenom dostupnošću fosfata i silikata nije bila statistički značajna. Povećanje proizvodnje domoične kiseline stoga se ne može pripisati isključivo smanjenoj dostupnosti silikata, nego upućuje na to da pojedinačno smanjenje dostupnosti fosfata ili silikata može predstavljati fiziološki stres povezan s povećanom sintezom toksina.

Kombinirano smanjenje dostupnosti fosfata i silikata u izolata vrste *P. pseudodelicatissima* nije imalo isti učinak kao pojedinačno smanjenje tih nutrijenata. To pokazuje da proizvodnja domoične kiseline nije određena samo ukupnim stupnjem nutritivnog ograničenja, nego može ovisiti i o međusobnim omjerima hranjivih tvari te specifičnom fiziološkom odgovoru stanica. Brzezinski (1985) pokazao je da se omjeri silicija, ugljika i dušika razlikuju među vrstama dijatomeja i mijenjaju ovisno o uvjetima uzgoja, dok su Pan i sur. (1996, 1998) utvrdili da smanjena dostupnost fosfata i silikata može povećati stanični sadržaj domoične kiseline, osobito nakon usporavanja rasta i ulaska stanične kulture u kasnije faze.

U izolata vrste *P. multiseries* najveća vrijednost domoične kiseline zabilježena je pri kombiniranom smanjenju dostupnosti fosfata i silikata, temperaturi od 18 °C i u fazi odumiranja. Takav rezultat upućuje na zajednički učinak nutritivnog stresa, više temperature i fiziološkog stanja kulture. Povezanost smanjene dostupnosti hranjivih tvari s povećanom proizvodnjom domoične kiseline u vrste *P. multiseries* prethodno su zabilježili Tatters i sur. (2012), dok su Pan i sur. (1998) proizvodnju toksina povezali s fiziološkim stresom uzrokovanim smanjenom dostupnošću silikata i/ili fosfata.

Međutim, smanjena dostupnost hranjivih tvari nije potaknula mjerljivu proizvodnju domoične kiseline u izolata vrsta *P. delicatissima* i *P. multistriata*. Takav rezultat potvrđuje da nutritivni stres ne izaziva jednak toksikološki odgovor u svih vrsta i izolata. Amato i sur. (2010) pokazali su da smanjena dostupnost silikata i fosfata te niska razina svjetlosti mogu povećati proizvodnju domoične kiseline u vrste *P. multistriata*, dok je viša temperatura bila povezana sa smanjenom proizvodnjom toksina. Izostanak domoične kiseline u ovom istraživanju stoga može odražavati svojstva analiziranih izolata ili činjenicu da primijenjena kombinacija eksperimentalnih uvjeta nije potaknula njezinu proizvodnju.

Promjene dostupnosti hranjivih tvari u prirodnom okolišu povezane su i s klimatskim promjenama. Osim porasta temperature mora, promjene kemijskog sastava mora mogu utjecati na otapanje, recikliranje i ponovno dospijevanje biogenog silicija u površinske slojeve mora, čime se mijenja dostupnost silikata dijatomejama (Taucher i sur., 2022; Tréguer i De La Rocha, 2013). Budući da je silicij ključan za izgradnju stanične stijenke dijatomeja, promjene njegove dostupnosti mogu utjecati i na rast i na proizvodnju domoične kiseline.

U ovom istraživanju smanjena dostupnost silikata bila je povezana sa slabijim rastom izolata vrste *P. pseudodelicatissima*, ali istodobno i s višim vrijednostima domoične kiseline u kasnijim fazama rasta. U izolata vrste *P. multiseries* najveća proizvodnja toksina zabilježena je pri kombinaciji više temperature, smanjene dostupnosti hranjivih tvari i faze odumiranja. Nasuprot tome, u izolata vrsta *P. delicatissima* i *P. multistriata* smanjenje dostupnosti hranjivih tvari nije potaknulo mjerljivu proizvodnju domoične kiseline. Ti rezultati potvrđuju da učinak nutritivnog stresa na toksičnost ovisi o vrsti, izolatu, temperaturi, dostupnosti hranjivih tvari i fazi rasta te se ne može tumačiti kao posljedica djelovanja samo jednog čimbenika (Lelong i sur., 2012).

Sveukupno, rezultati ovog istraživanja pokazali su da rast i proizvodnja domoične kiseline u vrsta roda *Pseudo-nitzschia* ne ovise o pojedinačnom okolišnom čimbeniku, nego o zajedničkom djelovanju temperature, dostupnosti hranjivih tvari, faze rasta te značajki vrste i izolata.

Ovi su nalazi osobito važni za Jadransko more, u kojem je potvrđena velika raznolikost vrsta roda *Pseudo-nitzschia*, uz povremenu pojavu visokih brojnosti pojedinih vrsta i toksičnih događaja (Turk Dermastia i sur., 2025). Ovo istraživanje proširuje postojeće spoznaje jer je obuhvatilo osam vrsta i 54 izolata iz srednjeg Jadrana, a zatim detaljno analiziralo rast i toksičnost četiriju odabranih vrsta pri promjenama temperature i dostupnosti hranjivih tvari.

Dobivene spoznaje pružaju osnovu za daljnje proširenje istraživanja na veći broj vrsta i izolata, širi temperaturni raspon koji bolje odražava sezonske uvjete u Jadranu, približno od

10 do 26 °C, te dodatne biotičke čimbenike, uključujući predaciju. Takav bi pristup dodatno unaprijedio razumijevanje uvjeta koji utječu na razvoj, rast i toksičnost vrsta roda *Pseudo-nitzschia* te pridonio preciznijoj procjeni rizika pojave domoične kiseline u Jadranskom moru.

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 različitih 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 različitih područja, nije se mogla jednoznačno procijeniti za sve analizirane vrste. Kod dijela vrsta svi su izolati s istog područja, primjerice *P. allochrona* 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. multiseries*, 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. multiseries* 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. multiseries* 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. multiseries* 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., Ujevic I., Pfannkuchen D. M., Godrijan J., Bakrac A., Gladan Z. N., Marasovic 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., Acri 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-Uribe 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.

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., i sur. 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.

Gajski G., Gerić M., Baričević A., Smodlaka Tanković M. Domoic Acid: A Review of Its Cytogenotoxicity Within the One Health Approach. *Antioxidants*. 2024; 13(11): 1366. doi: 10.3390/antiox13111366.

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.

Hansen L. R., Soylu 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. multiseries. *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 ^{137}Cs 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 multiseries* 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. multiseries* (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 multiseries* Hasle, a neurotoxigenic 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 toxigenic diatom Pseudo-nitschia multiseries 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 multiseries*. 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 allochrona* 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.

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.

Scholin 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 multiseries* 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 CO 2 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.

Vilibić I., Šantić D. Deep Water Ventilation Traced by *Synechococcus* Cyanobacteria. *Ocean Dynamics*. 2008; 58(2): 119–125. doi: 10.1007/s10236-008-0135-8.

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.

Vrdoljak Tomaš A., Šantić D., Šolić M., Skejić S., Milinković A., Cvitešić Kušan A., Gašparović B., Šestanović S., Frka S. How Do Open Coastal Fire Episodes' Impact Sea Surface Microlayer Neuston Communities? *Science of the Total Environment*. 2023; 861: 160593. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160593.

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.

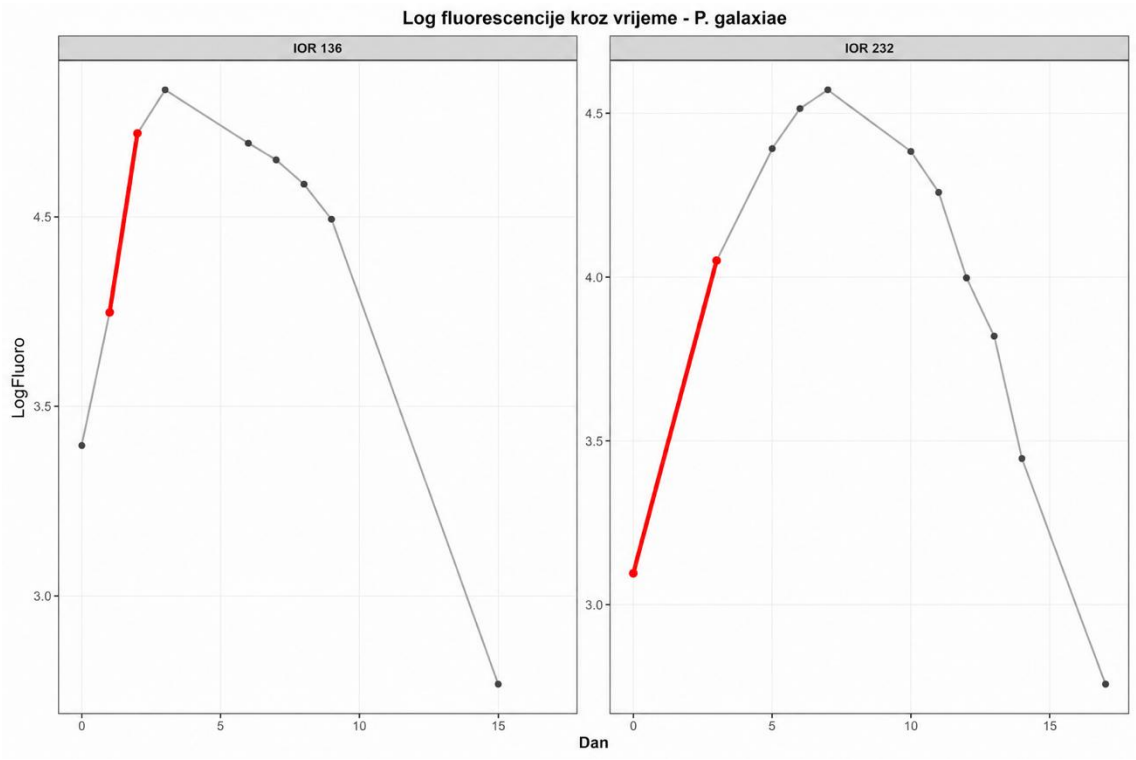
Wingert C. J., Cochlan W. P. Effects of ocean acidification on the growth, photosynthetic performance, and domoic acid production of the diatom *Pseudo-nitzschia australis* from the California Current System. *Harmful Algae*. 2021; 107: 102030. doi: 10.1016/j.hal.2021.102030.

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.

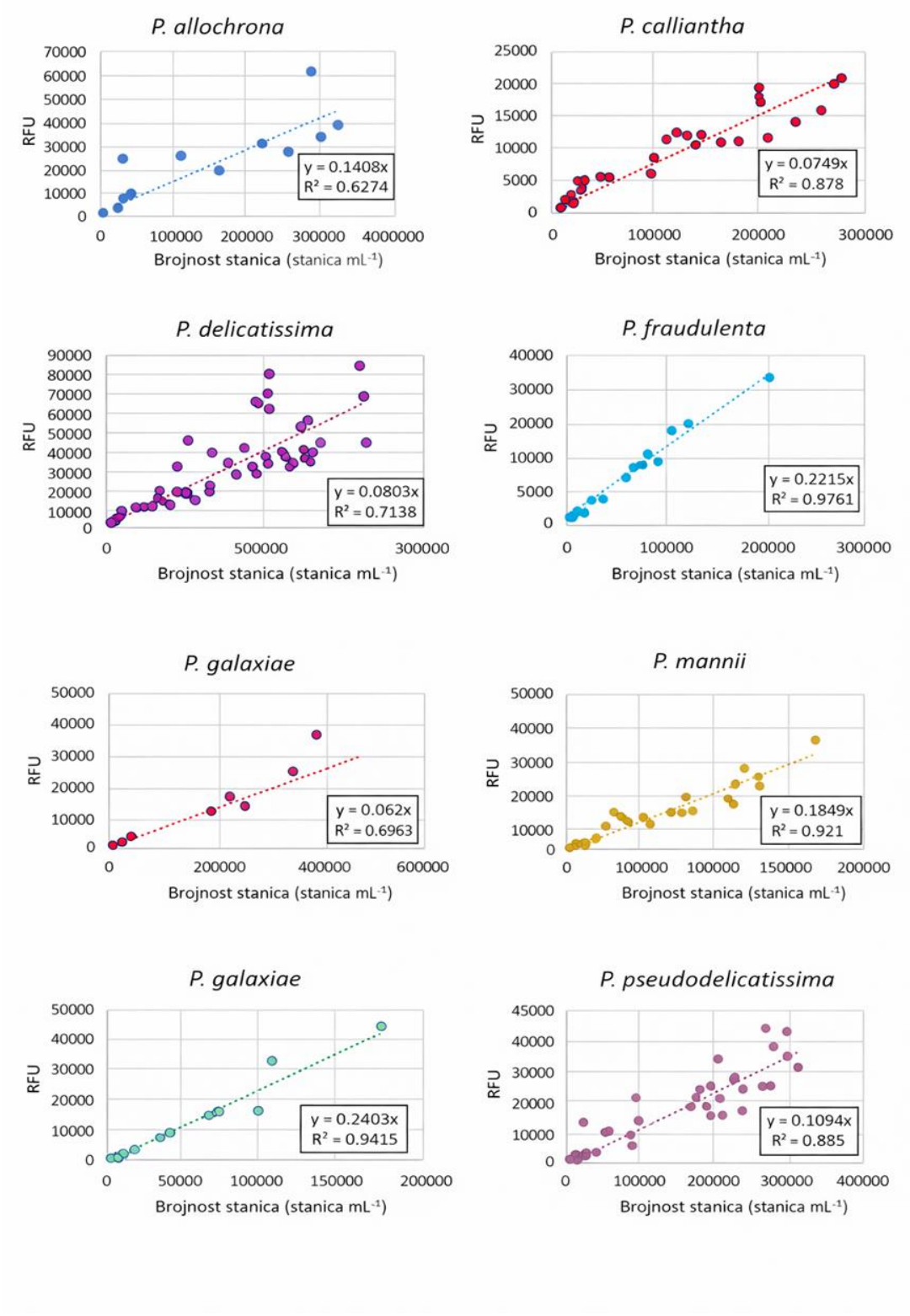
Wright J. L. C., Boyd R. K., de Freitas A. S. W., Falk M., Foxall R. A., Jamieson W. D., Laycock M. V., McCulloch A. W., McInnes A. G., Odense P., i sur. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Canadian Journal of Chemistry*. 1989; 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.

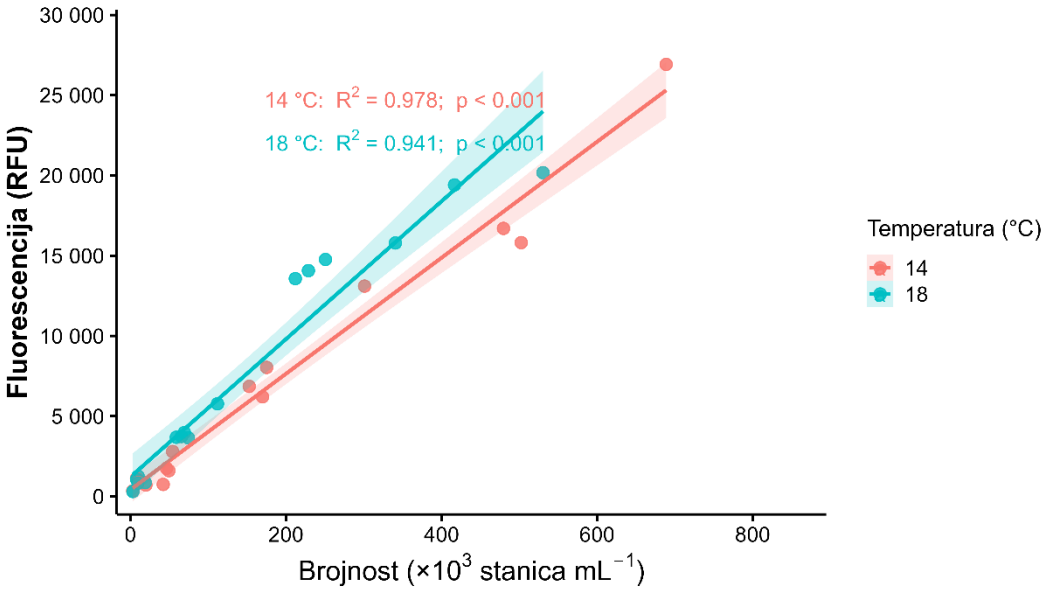
7 Prilozi



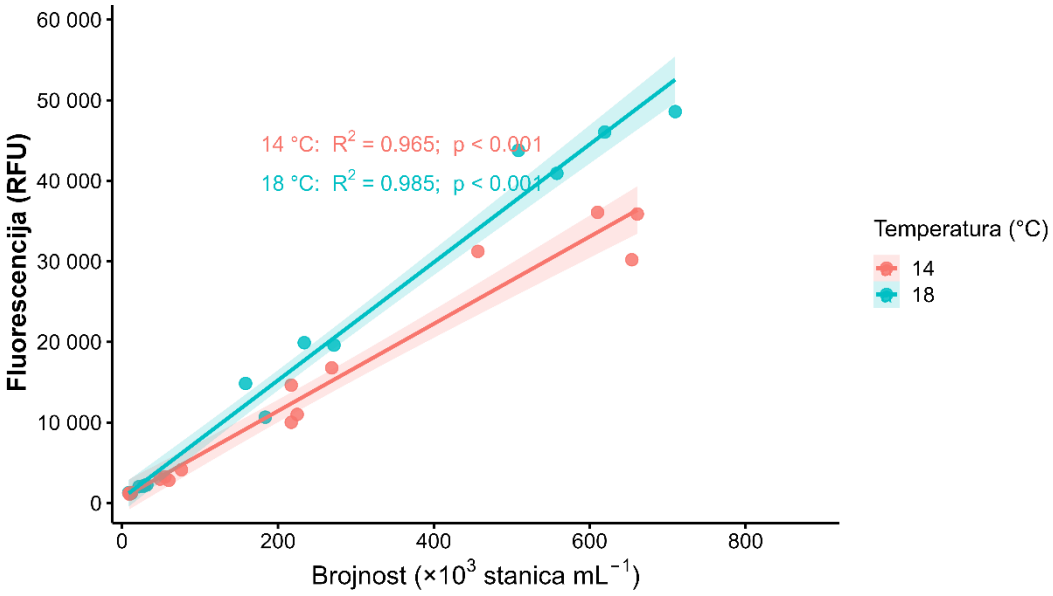
Slika 7.1 Promjena logaritamski transformirane fluorescence kroz vrijeme za dva izolata vrste *Pseudo-nitzschia galaxiae*. Siva linija prikazuje promjenu vrijednosti log fluorescencije tijekom trajanja pokusa, dok crveni segment označava dio krivulje korišten za izračun stope rasta.



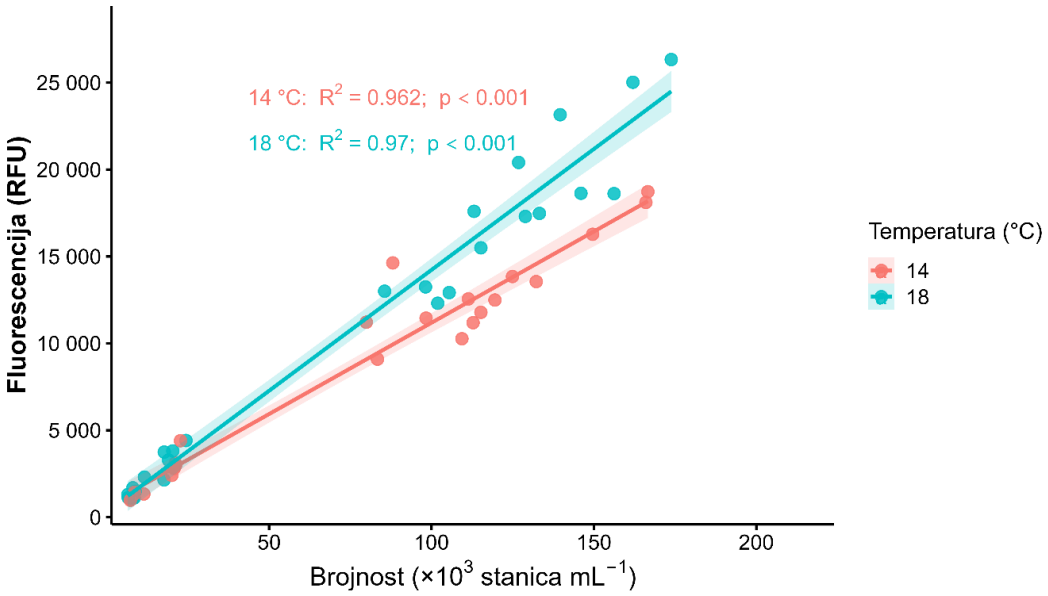
Slika 7.2 Odnos između relativne fluorescencije (RFU) i brojnosti stanica (stanica mL^{-1}) kod vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Isprekidane linije predstavljaju linearne regresijske odnose, a u panelima prikazane su regresijske jednadžbe i koeficijenti determinacije (R^2). RFU označava relativne fluorescencijske jedinice.



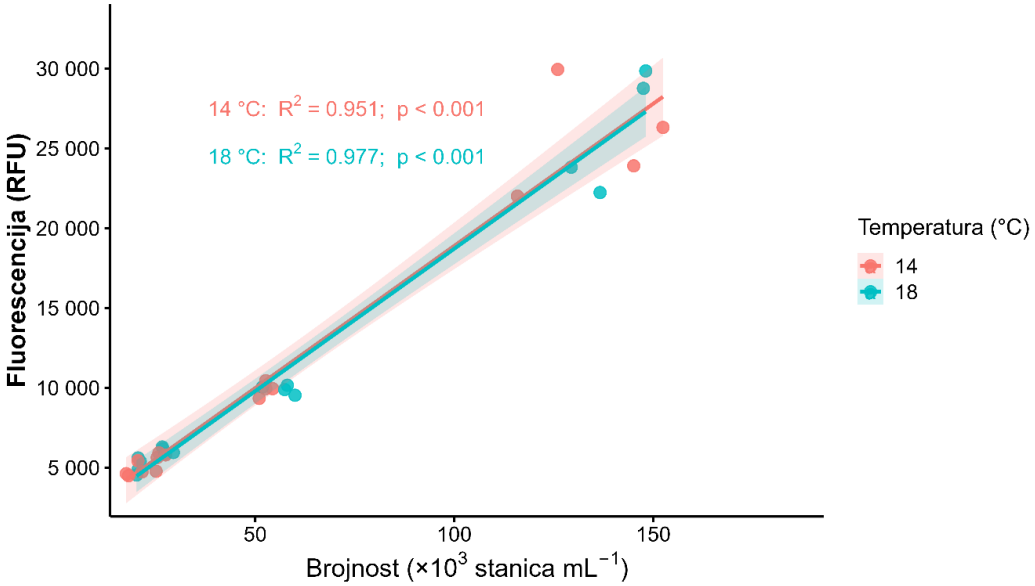
Slika 7.3 Odnos između fluorescencijskog signala (RFU) i brojnosti stanica (×10³ stanica mL⁻¹) kod vrste *P. pseudodelicatissima* pri 14 °C i 18 °C. Pune linije prikazuju linearne regresijske odnose, a zasjenjena područja 95 %-tni interval pouzdanosti. Na slici su prikazani koeficijenti determinacije (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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ stanica mL⁻¹) kod vrste *P. multiseries* 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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ 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 (×10³ stanica mL⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia multiseries* 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 (×10³ stanica mL⁻¹) vrste *Pseudo-nitzschia multiseries* 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

8 Sažetak na hrvatskom jeziku

U ovom je istraživanju predstavlja prvo sveobuhvatno istraživanje toksičnosti roda *Pseudo-nitzschia* s uzgojnih područja za školjkaše srednjeg Jadrana s naglaskom na dinamiku rasta istraživanih kultura te potencijalnu prijetnju za morski ekosustav. Vrste istraživanog roda česti su predstavnici fitoplanktonske zajednice Jadrana, a zanimljive su zbog mogućnosti sinteze neurotoksina domoične kiseline (DK), koja uzrokuje amnezijsko trovanje školjkašima (ASP). Uspostavljene stanične kulture analizirane su pri standardnim laboratorijskim uvjetima te u izmijenjenim uvjetima temperature i dostupnosti hranjivih tvari. Rast staničnih kultura praćen je određivanjem brojnosti stanica, stope rasta i mjerenjem fluorescencijskog signala, dok je proizvodnja DK određena LC–MS/MS metodom. Pri standardnim uvjetima analizirano je osam vrsta te 54 izolata roda *Pseudo-nitzschia*, pri čemu je mjerljiva proizvodnja DK potvrđena kod *P. pseudodelicatissima*. Toksin je zabilježen u 11 od 12 izolata ove vrste, s vrijednostima od 0,0007 do 0,0250 pg stanica^{-1}. U izmijenjenim uvjetima uzgoja analizirane su četiri vrste: *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima*, *P. multistriata* i *P. multiseries*. Temperatura i dostupnost hranjivih tvari značajno su utjecale na rast pojedinih vrsta, ali se odgovor nije jednako odrazio na sve pokazatelje rasta. Proizvodnja DK u izmijenjenim uvjetima potvrđena je kod *P. pseudodelicatissima* i *P. multiseries*. Kod *P. pseudodelicatissima* vrijednosti DK bile su niže, od 0,001071 do 0,005823 pg stanica^{-1}, dok je *P. multiseries* pokazala znatno veći toksični potencijal, s vrijednostima od 0,420 do 10,146 pg stanica^{-1}. Najviša vrijednost DK kod *P. multiseries* zabilježena je pri 18 °C u tretmanu kombiniranog smanjenja hranjivih tvari u kasnoj fazi rasta. Rezultati potvrđuju da se vrste roda *Pseudo-nitzschia* razlikuju u dinamici rasta i toksičnom potencijalu te da proizvodnja DK ovisi o vrsti, izolatu, fazi rasta, temperaturi i dostupnosti hranjivih tvari. Ovo istraživanje doprinosi boljem razumijevanju rasta i toksičnosti potencijalno toksičnih vrsta roda *Pseudo-nitzschia* u srednjem Jadranu te pruža temelj za pouzdaniju procjenu rizika pojave DK u uzgojnim područjima školjkaša.

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. multiseries*. 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. multiseries*. In *P. pseudodelicatissima*, DA values were lower, ranging from 0.001071 to 0.005823 pg cell^{-1}, whereas *P. multiseries* showed a substantially higher toxic potential, with values ranging from 0.420 to 10.146 pg cell^{-1}. The highest DA value in *P. multiseries* 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:

Skejić, S; Milić Roje, B.; Arapov, J.; Ninčević Gladan, Ž.; Straka, M.; Bakrač, A.; Bonačić, T.; Rabadan, Dora.; **Tomašević, T**.; Bužančić, M. i sur. Capturing Phytoplankton Diversity in the Central Adriatic Sea: Complementary Insights from DNA Metabarcoding and Morphological Identification. Diversity, 2026.

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. brasiliana, 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, 2022.

Hrabar, J.; Smodlaka, 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. brasiliana, 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., Calduch 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 doktorskog studija usavršavala sam se u području rada sa staničnim kulturama na stručnom usavršavanju u Urbinu 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.