

Taksonomska identifikacija i određivanje brojnosti cista dinoflagelata *Lingulodinium polyedra* (F. Stein) J. D. Dodge, 1989 u jezgri sedimenta iz Kaštelanskog zaljeva

Čavar, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:226:626202>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ EKOLOGIJA I ZAŠTITA MORA

Matea Čavar

TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE
BROJNOSTI CISTA DINOFLAGELATA *Lingulodinium*
***polyedra* (F. Stein) J. D. Dodge, 1989 U JEZGRI**
SEDIMENTA IZ KAŠTELANSKOG ZALJEVA

Diplomski rad

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ EKOLOGIJA I ZAŠTITA MORA

TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE
BROJNOSTI CISTA DINOFLAGELATA *Lingulodinium*
***polyedra* (F. Stein) J. D. Dodge, 1989 U JEZGRI**
SEDIMENTA IZ KAŠTELANSKOG ZALJEVA

Diplomski rad

Predmet: Biologija i ekologija planktona

Mentor:

Prof. dr. sc. Živana Ninčević Gladan

Student:

Matea Čavar

Split, rujan 2020.

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Ekologija i zaštita mora

Diplomski rad

**TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA I ODREĐIVANJE BROJNOSTI CISTA
DINOFLAGELATA *Lingulodinium polyedra* (F. Stein) J. D. Dodge, 1989 U JEZGRI
SEDIMENTA IZ KAŠTELANSKOG ZALJEVA**

Matea Čavar

Sažetak

U ovom diplomskom radu su predstavljeni rezultati istraživanja trajnih cista *Lingulodinium machaerophorum* dinoflagelata *Lingulodinium polyedra*. Identificiranje trajnih cista te opažanje i mjerenja morfoloških značajki istih provedeno je na invertnom mikroskopu (LEICA) pri povećanju od 200 puta. Trajne ciste identificirane su po veličini i obliku nastavaka koji su šuplji i zašiljeni na vrhu. Potvrđeno je da salinitet utječe na morfološke promjene kod ciste *L. machaerophorum*, točnije proporcionalno sa salinitetom povećava se dužina šiljastog nastavka u rasponu od 12 do 25 μm . Priprema uzoraka za mikroskopiranje provedena je po standardnoj palinološkoj metodi. Za praćenje gubitka broja cista prilikom pripreme uzoraka dodana je *Lycopodium* tableta koja sadrži spore koje se također broje pri mikroskopiranju u cilju procjene gubitka cista u procesu pripreme uzorka. Rezultati su pokazali da je 76 % spora izgubljeno u pripremi uzorka za mikroskopiranje što upućuje na potrebu dorade same metode kako bi se smanjili gubici.

(30 stranica, 25 slika, 2 tablice, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Lingulodinium polyedra*, *Lingulodinium machaerophorum*, trajne ciste, taksonomska identifikacija, palinološka metoda

Mentor: Prof.dr.sc. Živana Ninčević Gladan

Ocjenjivači: 1. Prof.dr.sc. Živana Ninčević Gladan
2. Doc.dr. sc. Olja Vidjak
3. Doc.dr. sc. Zvezdana Popović Perković

University of Split
Department of Marine Studies
Graduate study Ecology and protection of the sea

MSc Thesis

**TAXONOMIC IDENTIFICATION AND DETERMINING ABUNDANCE OF
DINOFLAGELLATE CYSTS *Lingulodinium polyedra* (F. Stein) J. D. Dodge, 1989 IN
SEDIMENT CORE FROM KASTELA BAY**

Matea Čavar

Abstract

This Master's thesis presents results from investigation of resting cyst *Lingulodinium machaerophorum* of dinoflagellate *Lingulodinium polyedra*. The identification of resting cysts, observations and measurements of their morphological features were conducted on an inverted microscope (LEICA), using 200x magnification. Resting cysts were identified by the size and shape of the processes that are hollow and pointed at the apex. The salinity was found to have the greatest influence on changes of morphological features, more precisely, in proportion to the salinity the length of processes increased in range from 12 to 25 µm. Sample preparation for microscopy was performed according to the standard palynological preparation method. To monitor the loss of cysts during preparation, a *Lycopodium* capsule with known amount of spores was added and the spores counted. We found that 76 % of the spores were lost during the sample preparation, therefore it is necessary to improve the method in order to reduce losses.

(30 pages, 25 figures, 2 tables, 30 references, original in: Croatian)

Keywords: *Lingulodinium polyedra*, *Lingulodinium machaerophorum*, resting cysts, taxonomic identification, palynological preparation method

Supervisor: Živana Ninčević Gladan, PhD

Reviewers: 1. Živana Ninčević Gladan, PhD / FullProfessor
2. Olja Vidjak, PhD / AssistantProfessor
3. Zvezdana Popović Perković, PhD / AssistantProfessor

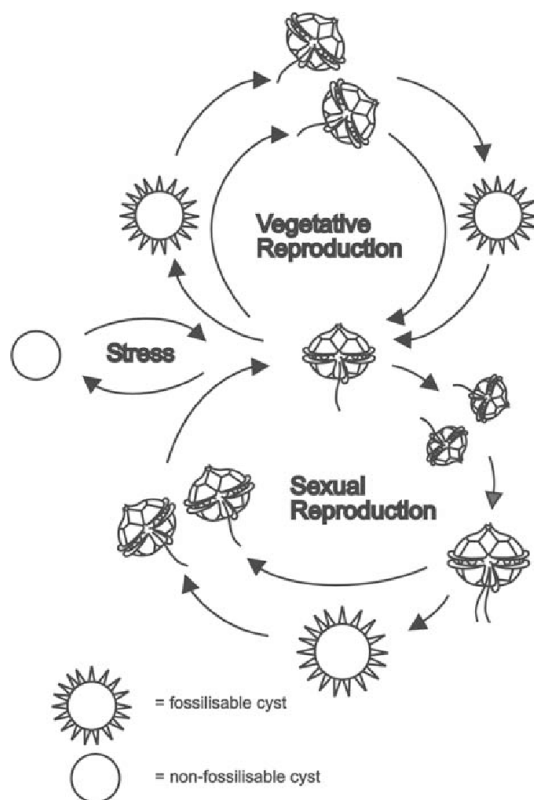
SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Životni ciklus vrste <i>Lingulodinium polyedra</i>	6
1.2. Dosadašnja istraživanja	9
1.3. Svrha i ciljevi rada	10
2. MATERIJALI I METODE	11
2.1. Uzorkovanje sedimenta	11
2.2. Priprema uzoraka za mikroskopiranje	12
2.3. Obrada uzoraka mikroskopiranjem	14
3. REZULTATI.....	16
4. RASPRAVA	22
4.1. Utjecaj kemijsko-fizikalnih parametara na morfološke promjene trajnih cisti <i>Lingulodinium machaerophorum</i>	22
4.2. „Standardna“ palinološka metoda za pripremu uzoraka.....	24
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

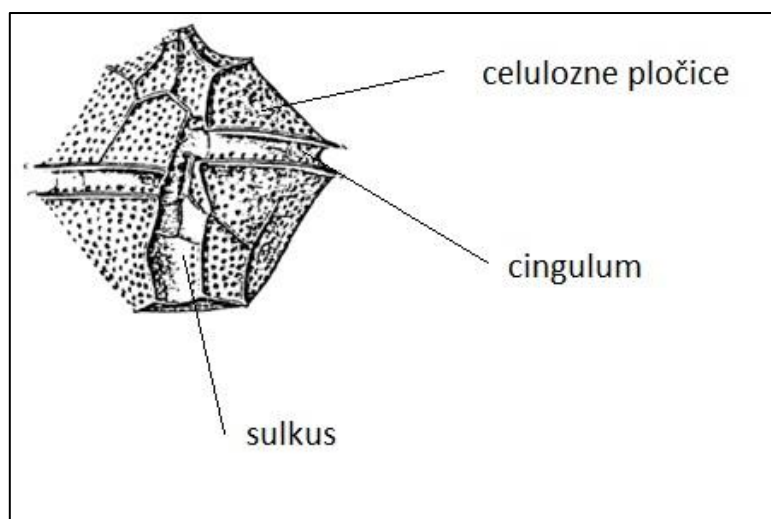
Fitoplankton je zajednički naziv za jednostanične mikroalge koje imaju sposobnost proizvodnje organske tvari fotosintezom. S obzirom na njihove morfološke i fiziološke osobine, podijeljene su u nekoliko osnovnih skupina, među kojima jednu od značajnijih po brojnosti, raznolikosti i rasprostranjenosti čine dinoflagelati (razred Dinophyceae). Stanica dinoflagelata nema staničnu stijenku, ali posjeduje karakterističan omotač – amfijejzu, čiji sastav omogućuje razlikovanje takozvanih golih i oklopljenih dinoflagelata. Ukoliko membrane amfijejze sadržavaju tekućinu, tada govorimo o golim odnosno netekatnim dinoflagelatima. S druge strane, ako se u membranama amfijejze nalaze krute celulozne pločice govorimo o oklopljenim, odnosno tekatnim dinoflagelatima. Upravo prema broju i rasporedu ovih pločica kod pojedine stanice omogućeno je međusobno razlikovanje vrsta tekatnih dinoflagelata (Marasović, 1990).

Neke vrste dinoflagelata u određenom dijelu životnog ciklusa kao reakciju na nepovoljne okolišne uvjete proizvode privremene (vijabilne) i trajne „resting“ ciste (fosilizirane) koje im omogućuju preživljavanje (Slika 1.). U tom procesu stanica odbacuje tekućinu i bičeve, postaje nepokretna te tone na morsko dno. Nespolnim razmnožavanjem nastaju privremene ciste. Karakterizira ih tanka vanjska ovojnica te se prilikom povoljnijih uvjeta vrlo brzo vraćaju u prvobitno pokretno stanje. Dakle, predstavljaju kratkotrajni oblik preživljavanja odnosno nisu sklone stanju duljeg mirovanja. Iz tog razloga mala je vjerojatnost da će takve ciste ostati očuvane u fosilnim zapisima. Nasuprot tome, trajne ciste su spolnog razmnožavanja i predstavljaju dugotrajni oblik preživljavanja. Mogu posjedovati otpornu vanjsku ovojnicu na čijoj se površini nalaze šiljci, unutar koje skladište produkte bitne za obavljanje uvelike reduciranih životnih procesa. Trajni stadiji su fiziološki uspavani i stoga se mogu promatrati kao vremenske kapsule, jer omogućuju očuvanje biološkog materijala kroz vrijeme (Head, 1996).



Slika 1. Shematski prikaz nastanka ciste u životnom ciklusu dinoflagelata (izvor: Zonneveld i sur., 2005).

Navedenoj skupini tekatnih dinoflagelata pripada i vrsta *Lingulodinium polyedra* (Stein) Dodge (Slika 2., Tablica 1.). Stanice *L. polyedra* su srednje veličine, dužine 40-54 μm i širine 37-53 μm . Kutnog su oblika, a oklop čine celulozne ploče. Stanica posjeduje dva biča, transversalni i longitudinalni, koje koristi za kretanje. Transverzalni se proteže iz cinguluma dok longitudinalni prolazi kroz sulkus i velikim dijelom se nalazi izvan stanice (Lassus i sur., 2016).



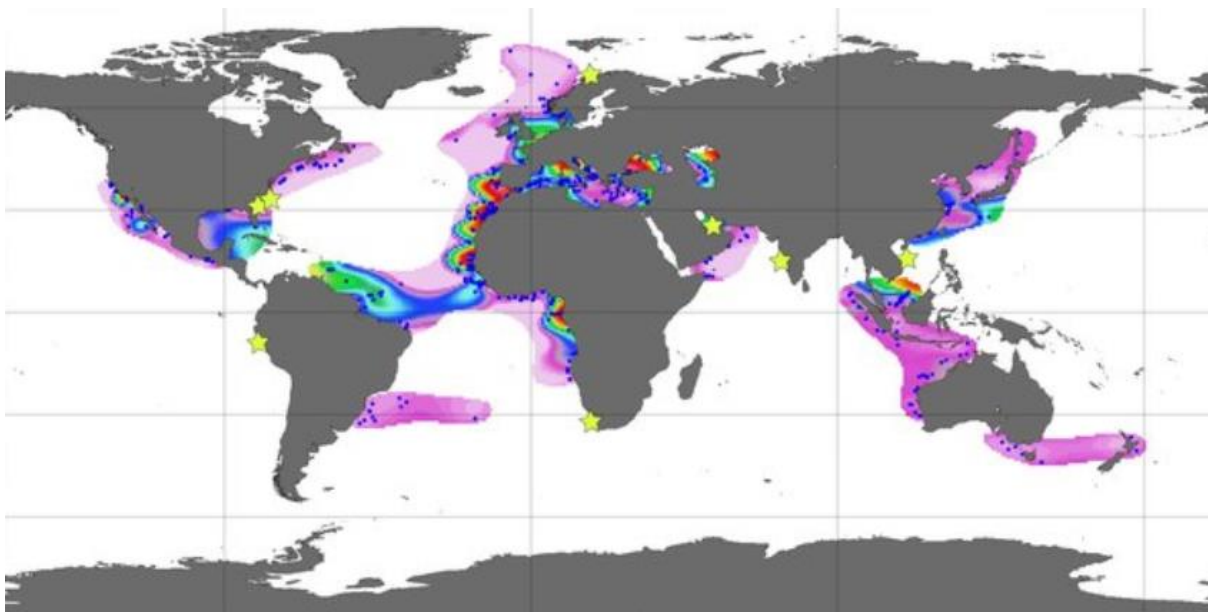
Slika 2. Ventralni prikaz stanice *Lingulodinium polyedra* (izvor: Lewis i Hallett, 1997).

Tablica 1. Sistematika vrste *Lingulodinium polyedra* (prema Lewis i Hallett, 1997).

DOMENA	<i>Eukaryota</i>
KOLJENO	<i>Dinoflagellata</i>
RAZRED	<i>Dinophyceae</i>
RED	<i>Gonyaulacales</i>
PORODICA	<i>Gonyaulacaceae</i>
ROD	<i>Lingulodinium</i>
VRSTA	<i>Lingulodinium polyedra</i>

Jezgra je smještena u središtu stanice u obliku slova U. Vrstu karakteriziraju smeđi kloroplasti. Široko je rasprostranjena diljem svijeta, posebice na području Europe, odnosno Sredozemnog, Baltičkog i Crnog mora, zatim na području Sjeverne Amerike u Kalifornijskom zaljevu, a u Južnoj Americi je zabilježena uz istočne obale Brazila (Lassus i sur., 2016).

Trajni stadiji („resting“ ciste) vrste *L. polyedra* su okruglog oblika, promjera između 31 i 54 μm . Okrugli centralni dio ciste ispunjen je citoplazmom, a na granuloznoj površini ciste nalaze se brojni šiljci koji se razlikuju po dužini i obliku. Dva prethodno navedena parametra su ključna u identifikaciji trajne ciste *L. polyedra* prilikom mikroskopiranja. Što se tiče geografske rasprostranjenosti ciste, zabilježena je u umjerenim i tropskim morima gdje se temperature kreću iznad 10°C ljeti i 0°C zimi (Zonneveld i Pospelova, 2015) (Slika 3.).

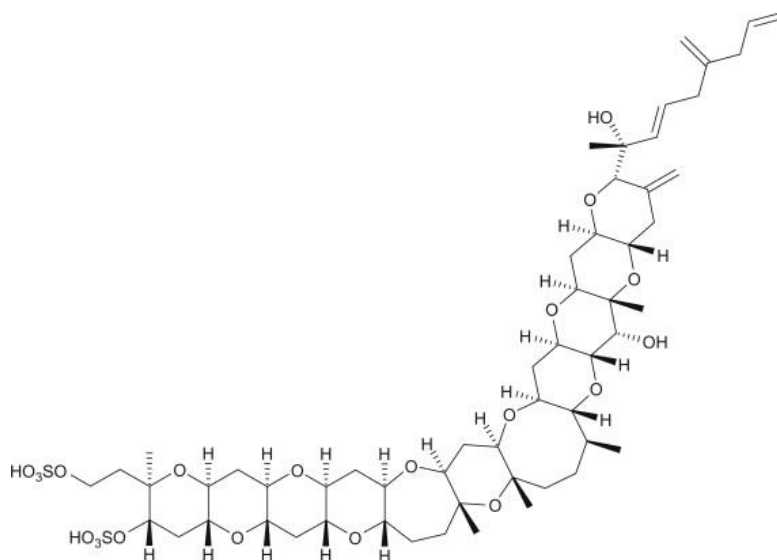


Slika 3. Geografska rasprostranjenost „resting“ cista *Lingulodinium machaerophorum* (izvor: Zonneveld i Pospelova, 2015).

Prisutnost cista vidljiva je u područjima širokog raspona saliniteta. Najveća brojnost cista zabilježena je u područjima *upwelling-a* te na ušćima rijeka, npr. rijeke Amazone, Po i općenito na SZ Afrike.

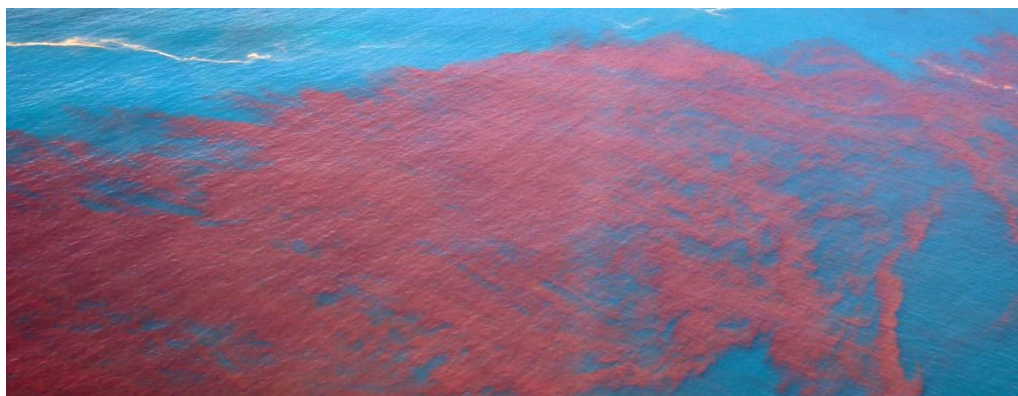
Istraživanjem provedenim na uzorcima s područja Jadrana potvrđeno je da *L. polyedra* proizvodi jesotoksin (YTX) (Paz i sur., 2004). Jesotoksin je morski polieterski toksin (Slika 4.) kojeg proizvode dinoflagelati *L. polyedra*, *Protoceratium reticulatum*, i *Gonyaulax spinifera*, koji može izazvati kod miševa simptome slične DSP (engl. *Diarrhetic Shellfish Poisoning*) i PSP (engl. *Paralytic Shellfish Poisoning*) trovanja. Izoliran je 1986. godine iz školjkaša Jakobove kapice (*Mizuhopecten yessoensis*) po čijem latinskom nazivu je i sam toksin imenovan. Jesotoksin također spada u lipofilne spojeve, što znači da se nakuplja u masnom tkivu školjkaša, resorbira se unutar probavnog trakta odakle se krvlju širi u ostala tkiva. Školjkaši kao organizmi koji se hrane filtriranjem morske vode gotovo u potpunosti ovise o fitoplanktonu kao izvoru hrane. Stoga se toksini koje proizvode dinoflagelati akumuliraju u tkivu školjkaša, a konzumacija takvih školjkaša može dovesti do prethodno spomenutih trovanja u ljudi. Iako u literaturi YTX pripada grupi toksina koji izazivaju DSP trovanje, novija istraživanja predlažu da se isključi iz te grupe jer je zaključeno da ne dovodi do simptoma koji su karakteristični za DSP trovanje (probavne smetnje). Istraživanje je dovelo do saznanja da je YTX, izoliran iz školjkaša, toksičan za miševe te izaziva simptome slične onima za PSP trovanje (vrtoглаvica, slabost) (Paz i sur., 2008). Što se tiče koncentracije

YTX na području istočne obale Jadranskog mora, podaci potvrđuju kako je YTX jedan od glavnih komponenti odgovornih za toksičnost dagnje (*Mytillus galloprovincialis*). Proporcionalno s porastom toksičnosti rasla je i brojnost vrste *L. polyedra* na ispitivanom području (Ninčević Gladan i sur., 2010).



Slika 4. Kemijska struktura jesotoksina (izvor: Quilliam, 2003).

Poznato je da *L. polyedra* može uzrokovati štetne cvatnje, tzv. „red tide“, koje se često istražuju zbog negativnog utjecaja na morski okoliš i ljudsko zdravlje (Slika 5.). Intenzivne cvatnje ove vrste zabilježene su u razdoblju od sredine osamdesetih do sredine devedesetih godina prošlog stoljeća u Kaštelanskom zaljevu (Marasović i sur., 1991, 1995). Takve su cvatnje uglavnom posljedica visoke koncentracije nutrijenata i visokih temperatura. Također, vrlo bitna stavka za pojavu cvjetanja su trajne ciste, čija prisutnost u sedimentu može poslužiti kao izvor za razvoj nove populacije (Keafer i sur., 2005).

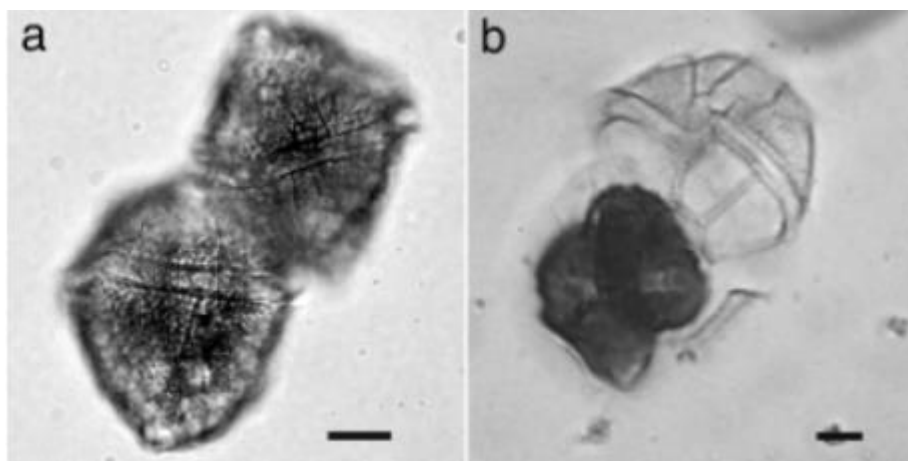


Slika 5. Pojava „red tide“ uzrokovana vrstom *Lingulodinium polyedra* (izvor: surfrider.org/coastal-

1.1. Životni ciklus vrste *Lingulodinium polyedra*

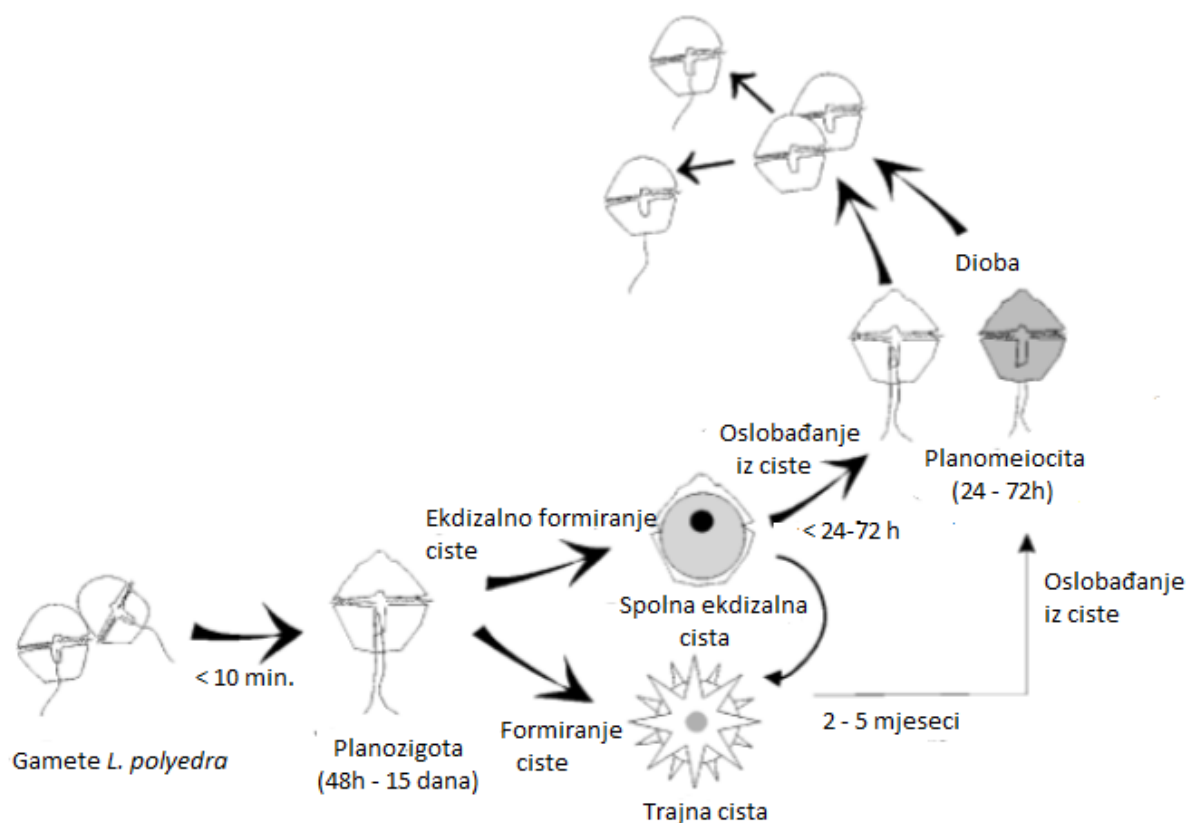
Životni ciklus *Lingulodinium polyedra* započinje planktonskim stadijem, odnosno haploidnom stanicom koja posjeduje dva biča, te se razmnožava vegetativnom diobom. Ukoliko su okolišni uvjeti nepovoljni, stanice stvaraju privremene ciste i u tom obliku preživljavaju, a vraćaju se u prvobitni oblik tek kada ponovno nastupe povoljni uvjeti. Jedan od značajnih stadija životnog ciklusa je planozigota koja nastaje spajanjem gameta vegetativnih stanica, stoga je karakterizirana kao diploidni pokretni stadij. Često se koristi u svrhu određivanja specifične faze u životnom ciklusu prilikom mikroskopiranja, jer je zbog dva biča koja posjeduje lako uočljiva. Kod nekih vrsta je zabilježeno da planozigota izgubi pokretljivost, odbaci teku te razvije više slojeva vanjskih ovojnica. Takav stadij naziva se hipnozigota, odnosno trajna cista. Nakon što prođe vrijeme mirovanja, hipnozigota ulazi u stadij germinacije i mejotički se dijeli. Produkt takve diobe su vegetativne pokretne stanice od kojih započinje novi životni ciklus (Kokinos i Anderson, 1995).

Tri su glavna procesa koji objedinjuju životni ciklus vrste *L. polyedra*, a to su vegetativno odnosno nespolno razmnožavanje, formiranje tzv. ekdizalnih (engl. *ecdysal*) stadija te spolno razmnožavanje. Ekdiza je proces promjene staničnog pokrova koja kod dinoflagelata uključuje gubitak stare plazmatske membrane, amfijeze i tekatnih ploča uz istovremeno stvaranje nove plazmatske membrane fuzijom unutrašnjih vezikula amfijeze. Proces je povezan sa stvaranjem cista i često se u literaturi naziva „*ecdysal cyst*“ (Bravo i sur., 2010). Nespolno razmnožavanje se uglavnom odvija tzv. procesom „*desmoschisis*“, putem izmjene tekatnih ploča. Ukoliko su nepovoljni uvjeti okoline, tada se nespolno razmnožava tzv. procesom „*eleutheroschisis*“, kada se protoplast ispušta kroz epiteku te se njegovom diobom formiraju dvije gole stanice (Slika 6.) (Figueroa i Bravo, 2005).



Slika 6. Prikaz nespolnog razmnožavanja; a-desmoschisis, b-eleutheroschisis (Figueroa i Bravo, 2005).

Spajanje gameta odvija se kroz dva mehanizma: adhezijom putem ploča i spajanjem stanica putem transversalnog biča te povezivanje sulkalnim dijelom. Rezultati istraživanja koje su proveli Figueroa i Bravo (2005) pokazali su da su samo one stanice koje su se povezivale sulkalnim dijelom uspjele formirati planozigotu, što dovodi do zaključka da se samo te stanice smatraju gametama. Dakle, haploidne gamete formiraju diploidnu planozigotu. Planozigote zatim formiraju resting cistu, te spolnu „*ecdysal*“ cistu iz koje se potom ispušta protoplast kroz epiteku koji za sobom ostavlja teku i germinacijom formira planomeiocitu. Planomeiocita daljnom diobom stvara nove haploidne vegetativne stanice (Slika 7.). Faktor o kojem ovisi hoće li planozigota formirati resting cistu ili spolnu „*ecdysal*“ cistu je razina fosfata u okolini (Figueroa i Bravo, 2005).



Slika 7. Ciklus spolnog razmnožavanja vrste *Lingulodinium polyedra* (izvor: Figueroa i Bravo, 2005).

Kao što je prethodno navedeno, *L. polyedra* ima sposobnost stvaranja privremenih cista kao fiziološki odgovor na nepovoljne uvjete u okolini. Istraživanje koje je provedeno na tu temu, odnosno dokazivanja utjecaja temperature na stvaranje cista, pokazalo je da stanice koje su izložene temperaturi od 8°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) stvaraju privremene ciste, te se povećanjem temperature na 18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) ponovno vraćaju u oblik pokretne stanice. Rezultati tog istraživanja su pokazali da vrsta vrlo brzo reagira na uvjete niske temperature. Naime, dva do tri sata nakon smanjivanja vrijednosti temperature sve jedinke su se spustile na dno posude, odbacile su teke i bičeve i formirale okrugli oblik s vanjskom ovojnicom. Nakon 24 sata jedinke su izložene sobnoj temperaturi te su se u vrlo kratkom roku vratile u prvobitno pokretno stanje, što pokazuje da promjena temperature uvjetuje reverzibilne i relativno brze promjene životne faze. Stoga su zaključili da je temperatura važan pokazatelj pri formiranju bilo privremenih ili trajnih cista (Slika 8.) (Roy i sur., 2013).



Slika 8. Trajna cista vrste *Lingulodinium polyedra* pod povećanjem 400x (Foto: M. Čavar)

1.2. Dosadašnja istraživanja

Krajem 1950-ih i početkom 1960-ih godina sve veći broj znanstvenika istražuje stvaranje cista kod dinoflagelata (Kokinos i Anderson, 1995; Figueroa i Bravo, 2005). Naime, veliki broj vrsta koje obitavaju u obalnom i estuarijskom okruženju, poput dinoflagelata *L. polyedra*, imaju fazu mirovanja tj. ciste kao dio svog životnog ciklusa (Dale, 1983). Takva istraživanja dovela su do saznanja da temeljnu ulogu u reproduktivnom ciklusu nekih vrsta dinoflagelata imaju upravo ovi stadiji. Istraživanjem cista istovremeno se bave i geolozi i biolozi, što je dovelo do dvostrukog imenovanja. Naime, biolozi koriste naziv planktonske vrste uz napomenu da se radi o cisti (npr. cista *L. polyedra*). Geolozi, koji su uglavnom zaslužni za taksonomsku identifikaciju cista, daju posebna imena za stadij ciste pa se za ciste vrste *L. polyedra* koristi naziv *L. machaerophorum* (Mertens i sur., 2009).

U međuvremenu je razvoj uzgoja kultura stanica u laboratorijskim uvjetima omogućio nova znanja o morfološkom razvoju trajnih cista *L. machaerophorum* dinoflagelata *L. polyedra*. Trajne ciste u uzgojnim kulturama pokazale su visoku raznolikost u formiranju šiljaka na površini ciste, uzimajući u obzir njihov broj, veličinu i oblik. Istraživanje je pokazalo da dužina tipičnih šiljaka varira od 5 do 10 μm , te da se sužavaju od površine ciste do vrha šiljka. Morfološke razlike među navedenim trajnim cistama mogu biti ekološki kontrolirane (Kokinos i Anderson, 1995). Wall i sur. (1973) su povezali smanjenu dužinu šiljaka sa smanjenim salinitetom na području Crnog mora.

U okviru međunarodnog projekta BALMAS (IPA ADRIATIC CBC, 2013.-2016.) provedeno je istraživanje vezano uz dinoflagelatne ciste u Jadranskom moru, u svrhu dobivanja novih saznanja o njihovom sastavu, brojnosti i rasprostranjenosti u devet većih jadranskih luka duž talijanske, slovenske i hrvatske obale. Luke su posebno zanimljive za istraživanje zbog utjecaja balastnih voda i mogućih unosa novih (nezavičajnih) vrsta. Jedna od promatranih vrsta u istraživanju, a ujedno i dominantna, bila je vrsta *L. polyedra*. Pokazalo se da je rasprostranjena duž istočne i zapadne Jadranske obale u svim ispitivanim lukama, uz najveću brojnost među svim zabilježenim vrstama. Najveća brojnost trajnih cista ove vrste zabilježena je na područjima uzdizanja morske vode tzv. „*upwelling-a*“, u područjima visoke turbulencije te u blizini riječnih ušća. Povećana brojnost također je povezana s eutrofnim područjima, relativno visokim površinskim temperaturama i nižim salinitetima (DiPoi i sur., 2019).

1.3. Svrha i ciljevi rada

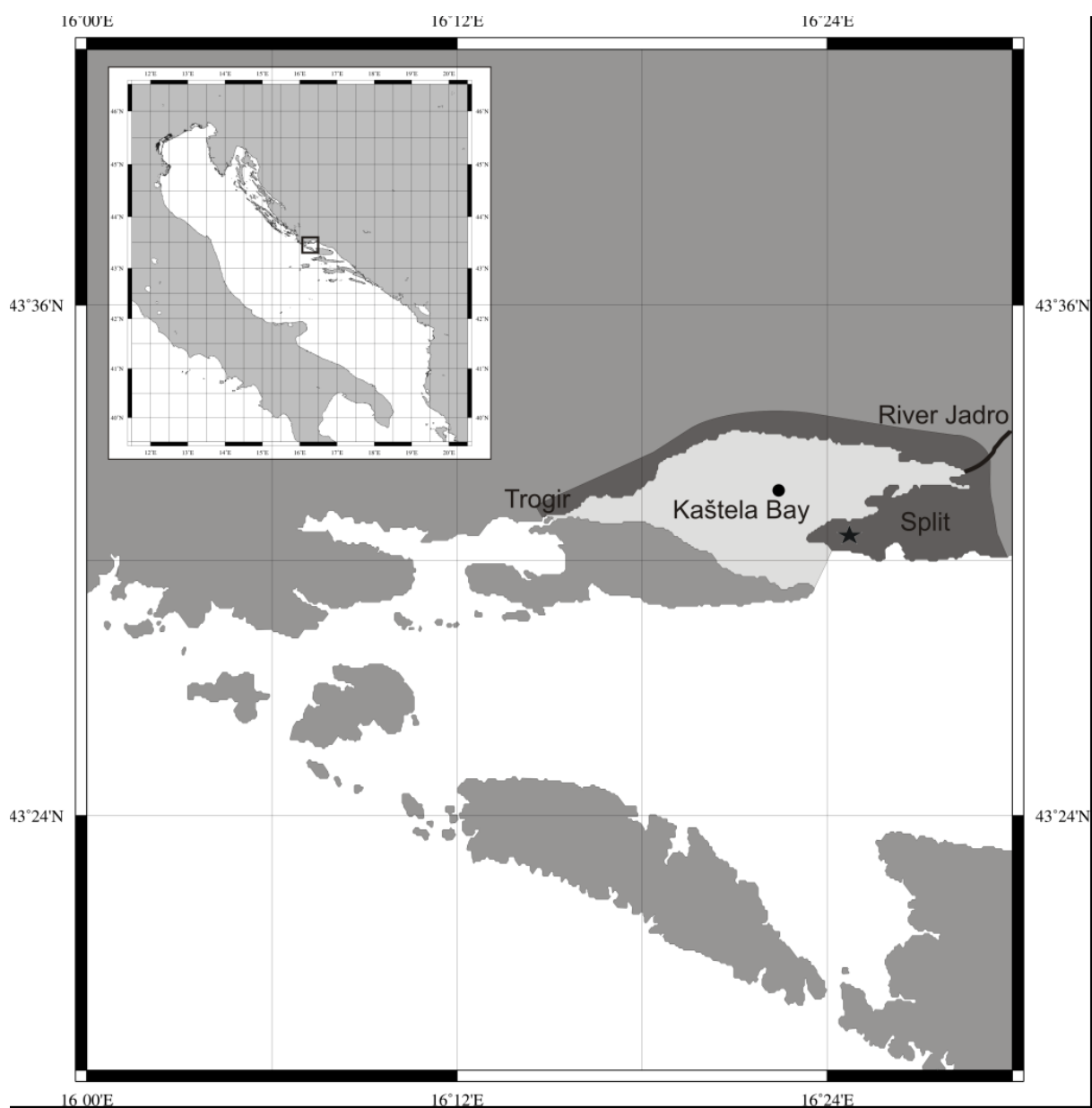
Svrha diplomskog rada je utvrditi detaljnu dubinsku raspodjelu cista dinoflagelata *L. polyedra* u jezgri sedimenta sa područja Kaštelanskog zaljeva. Nadalje, prikazati ekologiju spomenute vrste i dosadašnja istraživanja koja su provedena na ovu temu. Specifični ciljevi rada uključuju:

- sakupljanje cisti iz sedimenta Kaštelanskog zaljeva pomoću udarne sonde
- određivanje brojnosti cista u poduzorcima sedimenta prebrojavanjem pod mikroskopom
- donošenje zaključaka o taksonomskoj identifikaciji trajne ciste vrste *L. polyedra* ovisno o kemijsko-fizikalnim parametrima (salinitet i temperatura) morske vode na području uzorkovanja
- analiziranje protokola standardne palinološke metode i usporedba s drugim autorima

2. MATERIJALI I METODE

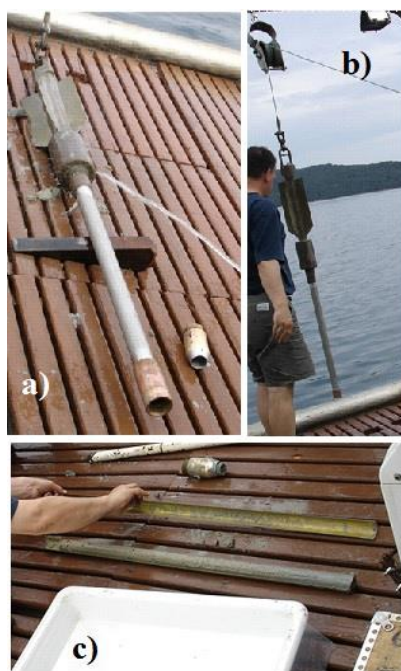
2.1. Uzorkovanje sedimenta

Uzorci sedimenta su sakupljeni na postaji u centralnom dijelu Kaštelanskog zaljeva (Slika 9.) na dubini od 38 metara, upotrebom udarne sonde (HYDROWERKE).



Slika 9. Položaj istraživane postaje u Kaštelanskom zaljevu (izvor: Ninčević Gladan, 2009).

Udarne sonda ima masu 30 kilograma, te se sastoji od cijevi dužine jednog metra i unutarnjeg promjera 41 milimetra, metalnog uložka i automatskog zatvarača montiranog na dno cijevi. Prilikom uzorkovanja sonda se spaja sa hidrauličkim vitlom i zatim spušta u more. U blizini morskog dna otpušta se čelično uže nakon čega cijev sonde udara u dno i prodire u sediment. Nakon izvlačenja sonde iz mora, uzorkovana jezgra sedimenta ostala je u metalnom uložku u cijevi sonde (Slika 10.). Jezgru sedimenta zatim smo dijelili na poduzorke ovisno o dubini; od površine do dubine od 50 centimetara podijeljena je na 20 poduzoraka debljine 2,5 centimetara, a od dubine od 50 do 90 centimetara na 10 poduzoraka debljine 4 centimetra.



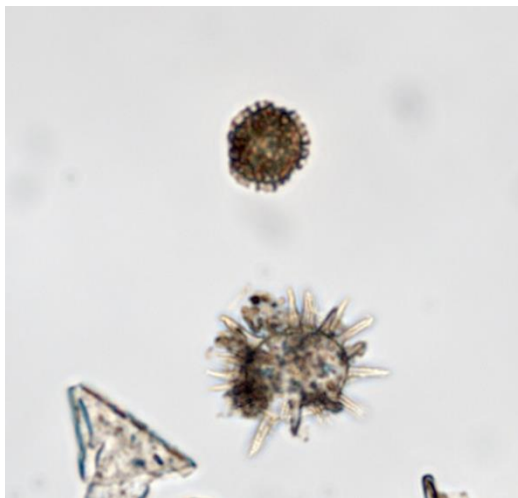
Slika 10. Prikaz udarne sonde: a) ispiranje udarne sonde pored koje se nalazi automatski zatvarač koji se namota na donji dio cijevi udarne sonde; b) udarna sonda spojena na čelično uže spušta se u more; c) metalni uložak koji je izvučen iz cijevi udarne sonde sa uzorkovanim sedimentom. (Foto:

D. Bogner)

2.2. Priprema uzoraka za mikroskopiranje

Uzorkovani sediment se sušio u sušioniku 24 sata na temperaturi od 45 °C. Nakon toga izvagan je 1 g suhog sedimenta i položen u kivetu. Uzorku je dodana jedna *Lycopodium* tableta koja sadrži točno određen broj *Lycopodium* spora, a u ovom slučaju sadrži 9666 spora. Ove se tablete dodaju u svrhu kasnijeg preračunavanja brojnosti cista na gram suhog sedimenta budući da je prilikom naknadnog mikroskopiranja (Slika 11.) moguće procijeniti i

uzeti u obzir gubitke koji nastanu pri obradi uzorka prema konačnom broju prethodno spomenutih spora u uzorku (Benninghoff, 1962).



Slika 11. Prikaz *Lycopodium* spore (sredina, iznad) i trajne ciste *Lingulodinium machaerophorum* (sredina, ispod) slikano invertnim mikroskopom, povećanje 200x (Foto: M. Čavar).

Zatim je uzorku dodano 25 ml 10% klorovodične kiseline (HCl), kako bi se uklonili karbonati. Dodavanjem klorovodične kiseline dolazi do nastanka pjene, pa se iz tog razloga kiselina u kivetu dodavala postepeno te je uzorak ostavljen 20-ak minuta dok pjenjenje nije završilo. Kiveta s uzorkom se nakon toga centrifugirala 10 minuta pri 3000 okr./min, a supernatant se potom dekantirao. Uzorak je dva puta neutraliziran dodavanjem 30 ml destilirane vode, nakon čega je prosijan kroz sita veličine pora 125 μm i 20 μm (Slika 12.). Čestice zaostale na situ veličine 20 μm isprane su destiliranom vodom do pojave bistre vode, nakon čega je uzorak sakupljen u kivetu.



Slika 12. Sita za prosijavanje sedimenta veličina 125 μm i 20 μm (Foto: M. Čavar).

Uzorak je zatim centrifugiran po prethodno spomenutom principu. Nakon centrifugiranja, uzorku je dodano 25 ml koncentrirane fluorovodične kiseline (HF). Tako pripremljen uzorak ostavljen je 48 sati kako bi se uklonio silikatni materijal iz uzorka kao što su čestice pijeska, ostaci dijatomeja, silikoflagelata i dr. Nakon 48 sati ponovo je centrifugiran i ponovno je dodano 25 ml 10% HCl. Uzorak je zatim odstajao 20-ak minuta, te je nakon centrifugiranja dva puta neutraliziran dodavanjem 30 ml destilirane vode. Nakon toga ponovno je obavljeno prosijavanje po prethodno navedenom principu. Konačni volumen uzorka sakupljen u kiveti mora sadržavati 10 ml.

2.3. Obrada uzoraka mikroskopiranjem

Uzorci su pregledani pod mikroskopom na način da se od ukupnog volumena uzorka u kiveti pipetom odvoji 1 ml u kojemu se potom prebrojavaju ciste *L. polyedra* i *Lycopodium* spore. Pritom valja naglasiti da su se prilikom brojanja cista u obzir uzimale samo one koje su nakon manipulacije ostale netaknute ili koje su sadržavale barem polovicu ciste (Slika 13.). Brojenje je obavljeno na invertnom mikroskopu LEICA pri povećanju od 200 puta.



Slika 13. Polovica trajne ciste *Lingulodinium polyedra* pod povećanjem od 200x (Foto: M. Čavar).

Nakon mikroskopske obrade uzoraka, brojnost cista po gramu suhog sedimenta u uzorku preračunava se prema slijedećoj jednadžbi (Benninghoff, 1962):

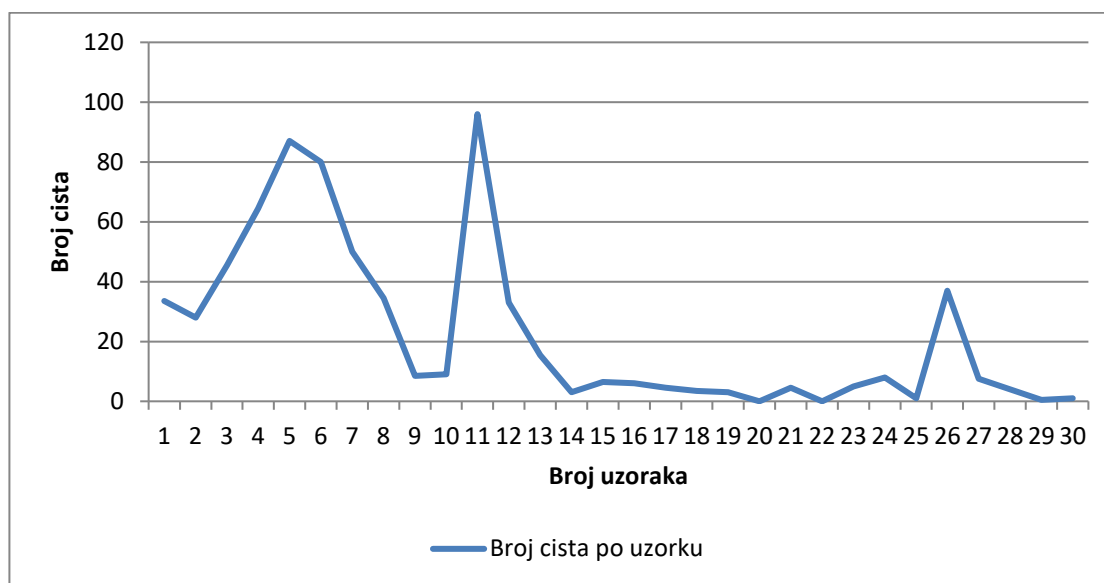
$$c = \frac{dcxLtxt}{Lcxw}$$

pri čemu pojedini elementi jednadžbe predstavljaju:

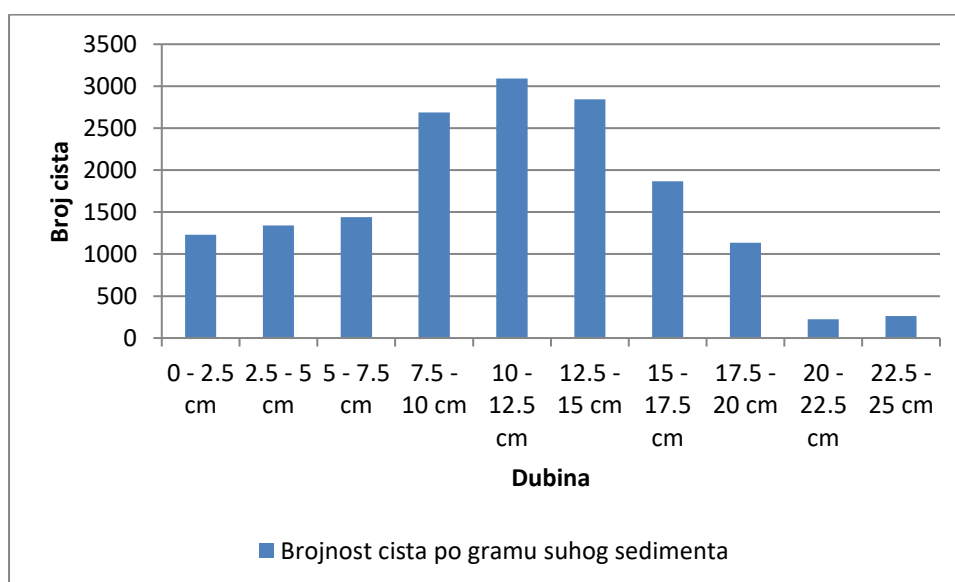
c – brojnost cista po gramu suhog sedimenta (g^{-1})
dc – broj cista određenih u uzorku
Lt – broj *Lycopodium* spora po tableti
t – broj dodanih *Lycopodium* tableta
Lc – broj pronađenih *Lycopodium* spora u uzorku
w – masa odvagane suhog sedimenta (g).

3. REZULTATI

Broj cista u jezgri sedimenta nije pokazao proporcionalan rast ili pad s dubinom jezgre, već je zabilježeno nekoliko maksimuma (Slika 14.). Rezultati abundancije cista su uvršteni u jednadžbu prema Benninghoff (1962), te prikazani grafičkim slikama 15., 16. i 17.

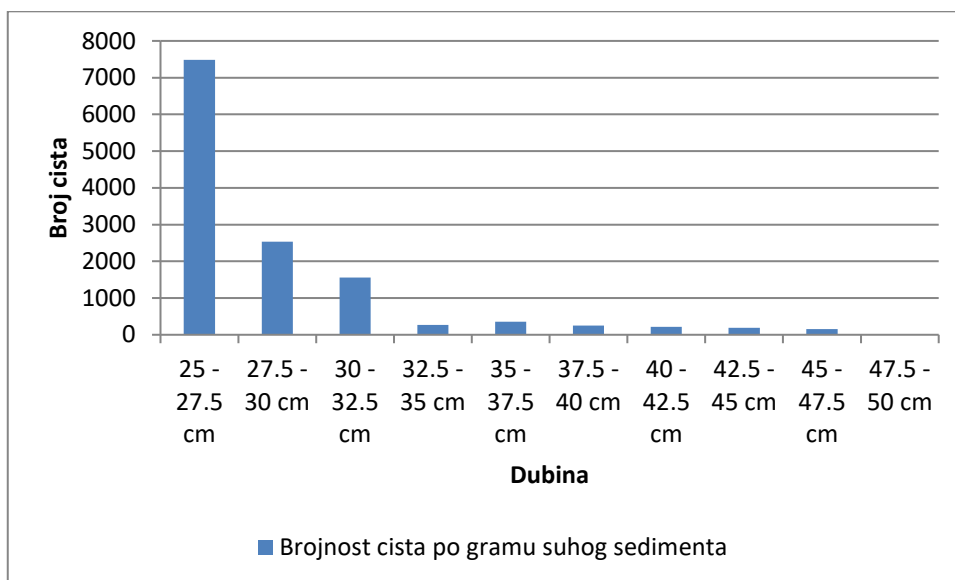


Slika 14. Grafički prikaz broja cista u svakom od uzoraka.



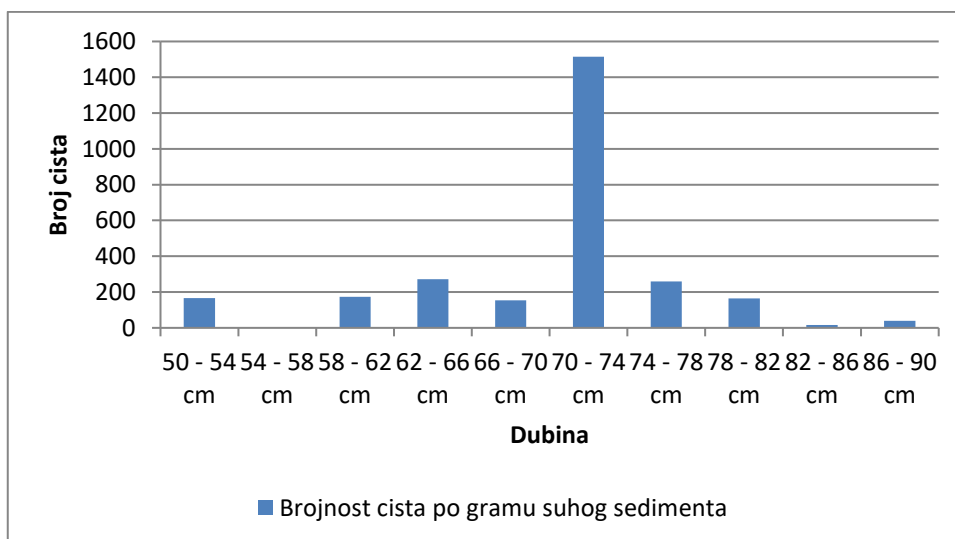
Slika 15. Brojnost cista po gramu suhog sedimenta ovisno o dubini (od 0 cm do 25 cm).

Na slici 15 uočavamo da se brojnost cista *Lingulodinium polyedra* na dubini od 0 do 25 cm kretala u rasponu od 1231 g⁻¹ (dubina 0-2,5 cm) do 260 g⁻¹ (dubina 22,5-25 cm). Na dubinama od 7.5 do 15 cm uočava se skok brojnosti s maksimumom zabilježenim na dubini od 10-12,5 cm (3091 g⁻¹). U sljedeća dva mjerenja ponovo dolazi do pada u brojnosti cista pri čemu je minimum zabilježen na dubini od 20-22,5 cm (222 g⁻¹).



Slika 16. Brojnost cista po gramu suhog sedimenta ovisno o dubini (od 25 cm do 50 cm).

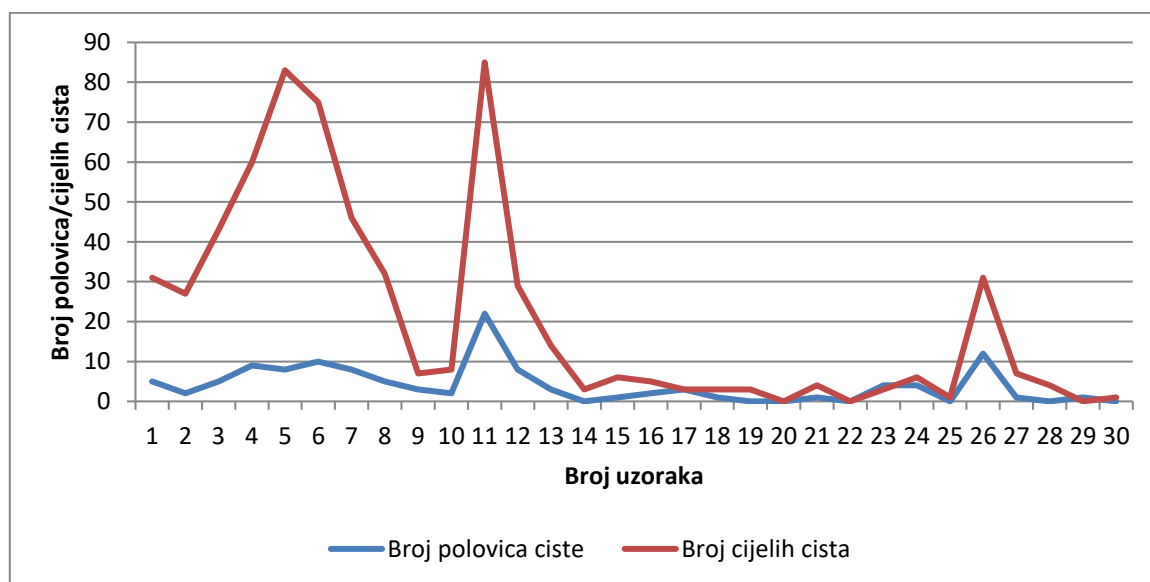
U sljedećem grafičkom prikazu (Slika 16) primjetna je značajna oscilacija pri izračunu brojnosti cista po gramu suhog sedimenta, na dubini od 25 cm do 27,5 cm, a taj nagli skok očituje se u brojnosti od 7483 g⁻¹ cista. Slijede mjerenja na dubinama od 27,5 cm do 50 cm koja prikazuju trend pada brojnosti cistau rasponu od 2531 g⁻¹ do 50 cm gdje brojnost cista iznosi 0 g⁻¹.



Slika 17. Brojnost cista po gramu suhog sedimenta ovisno o dubini (od 50 cm do 90 cm).

Posljednji grafički prikaz (Slika 17) se nadovezuje na gornji primjer opadanja brojnosti cista, s jednim odskakanjem na dubini od 70 do 74 cm gdje brojnost cista iznosi 1515 g^{-1} . Na dubinama od 50 cm do 90 cm brojnost pokazuje minimalne oscilacije u iznosu od 166 g^{-1} do 38 g^{-1} .

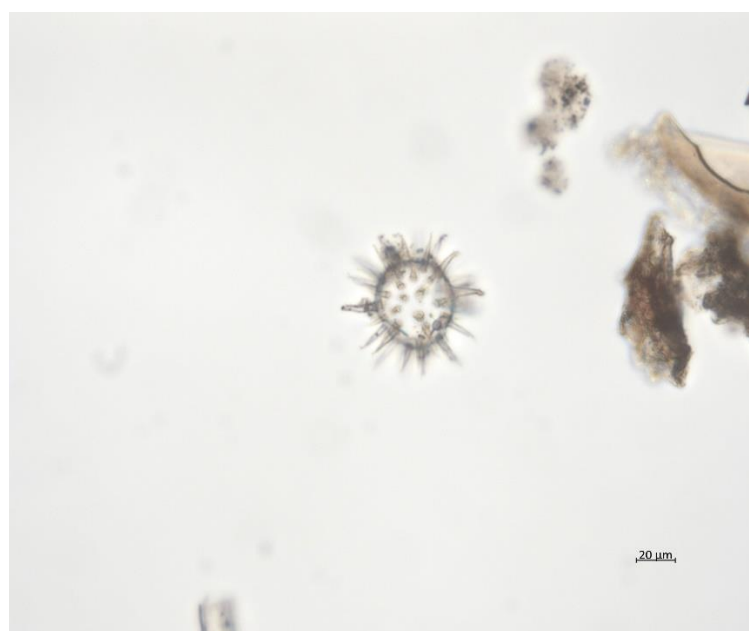
U poglavlju Materijali i metode naglašeno je da su se prilikom brojanja cista u obzir uzimale samo one koje su nakon manipulacije ostale netaknute ili koje su sadržavale barem polovicu ciste. Stoga je na sljedećem grafu (Slika 18) prikazan odnos između broja netaknutih cista i polovica cista.



Slika 18. Odnos između polovičnih i cijelih cista u svakom od uzoraka.

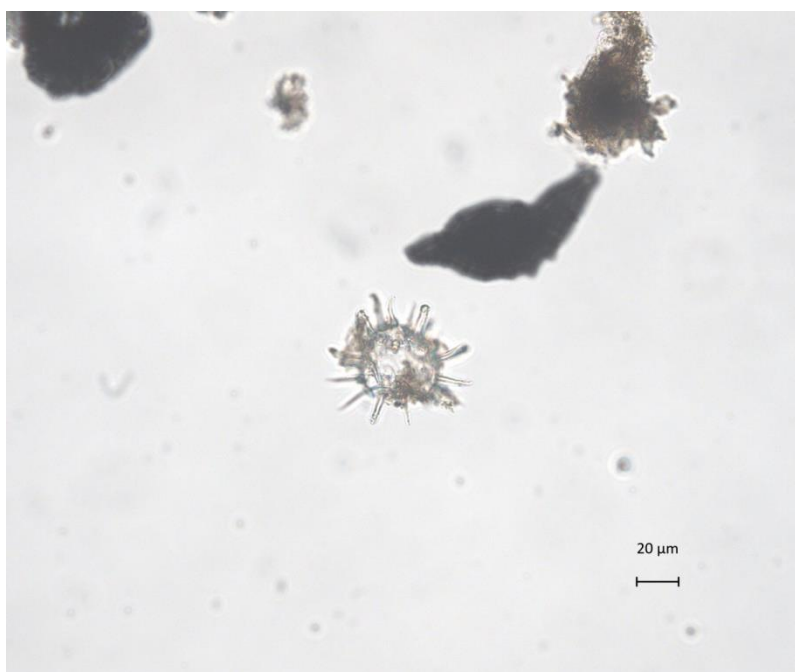
Brojnost cista se u praksi često utvrđuje dodavanjem *Lycopodium* tableta u uzorak kao kontrola, odnosno za praćenje gubitka materijala tijekom manipulacije i obrade uzoraka. Ukupan broj spora u jednoj *Lycopodium* tableti koje su korištene u ovom istraživanju iznosi 9666, dok je prosječan broj pronađenih spora prilikom mikroskopiranja jednak 2267 ± 722 . Prethodne brojke pokazuju da je postotak pronađenih spora u odnosu na kontrolu iznosio 24%.

Prilikom mikroskopiranja uzoraka prvenstveno je bilo potrebno identificirati trajne ciste kako bi se nadalje mogla utvrditi njihova abundancija. Slike 19-22 prikazuju morfološke razlike u cistama koje su identificirane u svakom od 30 uzoraka. Morfološke razlike većinom su vezane uz oblik i veličinu šiljaka koji izlaze sa površine ciste (Tablica 2.).



Slika 19. Trajna cista *Lingulodinium machaerophorum* (Foto: M. Čavar).

Prikazana cista na slici 19 je promjera 45 μm , dok je duljina šiljaka 16 μm . Šiljci su donekle pravilno raspoređeni te se ravnomjerno udaljavaju od površine ciste, odnosno sužavaju se od baze do vrha šiljka.



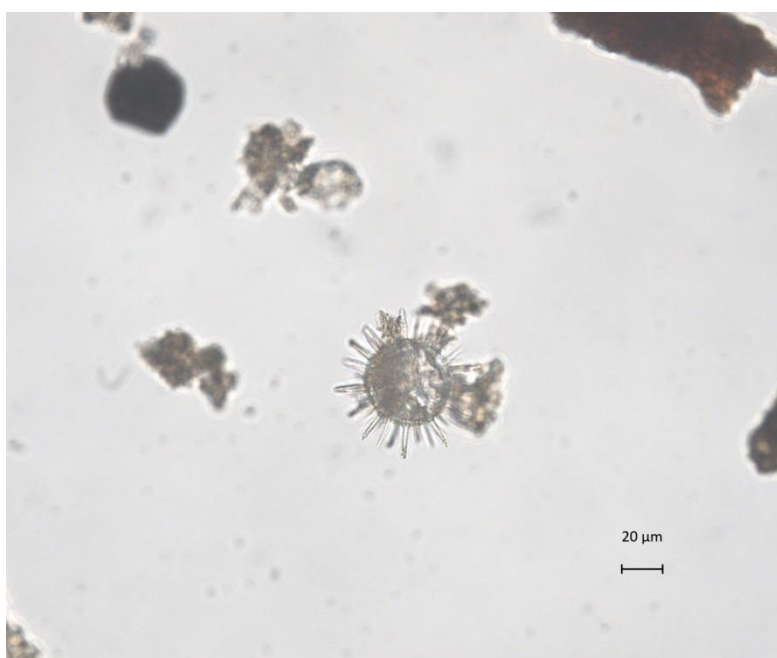
Slika 20. Trajna cista *Lingulodinium machaerophorum* (Foto: M. Čavar).

Promjer ciste na slici 20. iznosi 35 μm , a duljina šiljaka 12 μm . Šiljci su manje pravilno raspoređeni, pokazuju manju brojnost i manje je vidljivo sužavanje od baze prema vrhu šiljka.



Slika 21. Trajna cista *Lingulodinium machaerophorum*(Foto: M. Čavar).

Cista prikazana na slici 21 ima promjer od 38 μm , a duljina šiljaka iznosila je 25 μm . Raspored šiljaka je manje pravilno raspoređen po površini ciste. Šiljci su dulji od prethodna dva primjerka, brojniji su, a vidljivo je sužavanje od baze prema vrhu.



Slika 22. Trajna cista *Lingulodinium machaerophorum*(Foto: M. Čavar).

Promjer ciste prikazane na slici 22. iznosi 40 μm , a duljina šiljaka je 14 μm . Šiljci su pravilno raspoređeni oko površine ciste i dulji od prethodnih primjeraka. Vidljivo je sužavanje od baze prema vrhu šiljka.

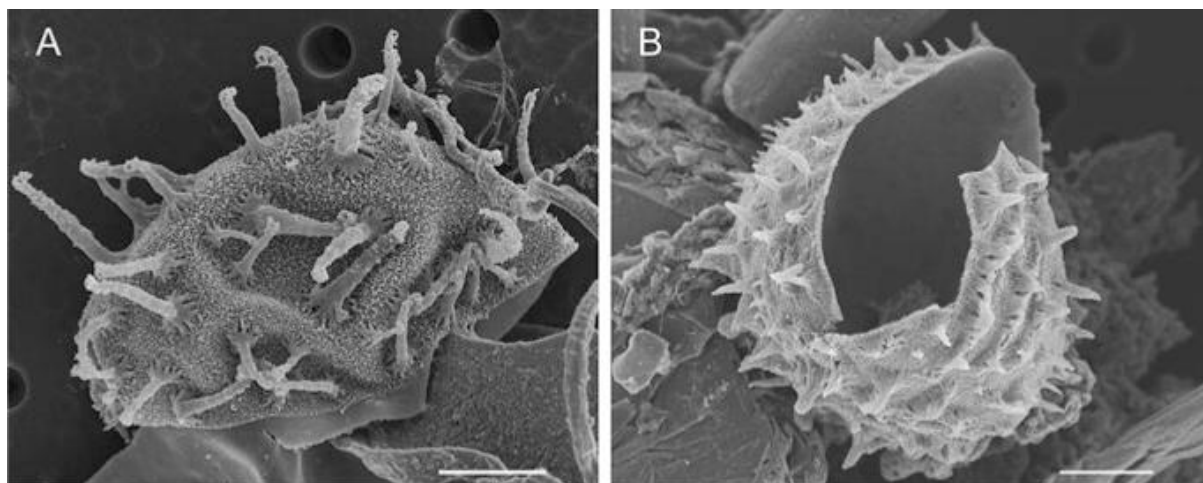
Tablica 2. Prikaz promjera ciste i duljine šiljaka prikazanih na slikama 19., 20., 21. i 22.

	Promjer ciste	Duljina šiljaka
Cista 1	45 μm	16 μm
Cista 2	35 μm	12 μm
Cista 3	38 μm	25 μm
Cista 4	40 μm	14 μm

4. RASPRAVA

4.1. Utjecaj kemijsko-fizikalnih parametara na morfološke promjene trajnih cisti *Lingulodinium machaerophorum*

Na području uzorkovanja u središnjem dijelu Kaštelanskog zaljeva godišnja temperatura varira između 9°C i 26°C, a vrijednosti saliniteta se kreću od 34 do 38 te se smatra da je pod utjecajem slatkovodnog dotoka rijeke Jadro (Bužančić i sur., 2012). Prema Hallett (1999), raspon temperature pri kojima je u kulturama zabilježeno nastajanje cista *Lingulodinium polyedra* je od 9°C do 31°C i saliniteta od 10 do 40, što se uklapa u rezultate ovog rada. Kao odgovor na promjene fizikalnih uvjeta sredine dolazi također i do morfoloških promjena kod cista. Analiziranjem morfoloških promjena uzrokovanih promjenom vrijednosti saliniteta pokazalo se da utječe na duljinu šiljaka (Slika 23.). Prema Ellegaard i sur. (2017), odnos između vrijednosti saliniteta i dužine šiljaka je proporcionalan.

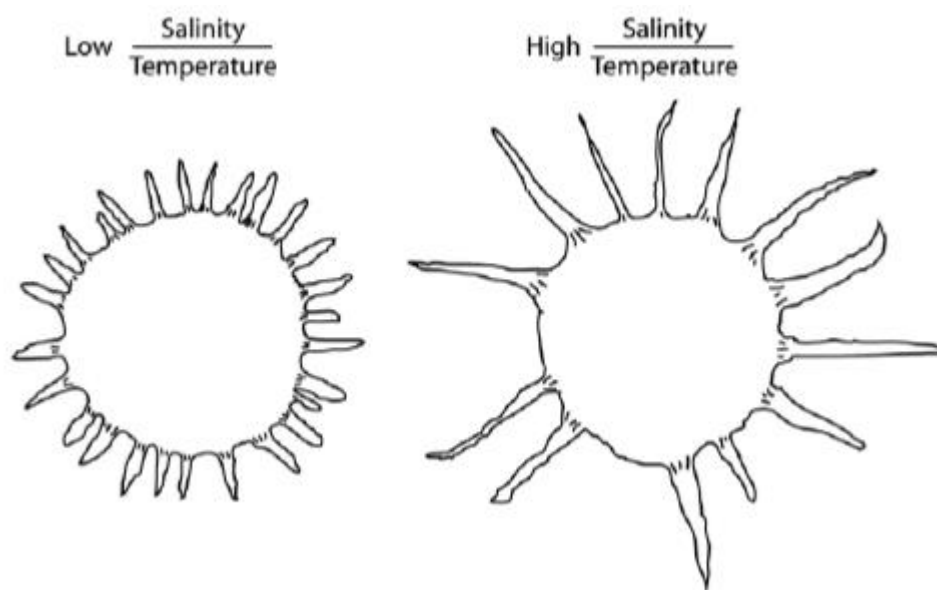


Slika 23. Morfološke promjene duljine šiljaka u odnosu na salinitet. A- *Lingulodinium machaerophorum* u morskoj sredini, B- *Lingulodinium machaerophorum* u brakičnom području (izvor: Ellegard i sur., 2017).

Temperatura je važan čimbenik koji utječe na distribuciju cista, a može imati i utjecaja na njihovu morfologiju. Trajne ciste omogućuju preživljavanje vrste u nepovoljnim uvjetima, u ovom primjeru *L. polyedra* koji je karakterističan za toplija mora i samim time njegova prisutnost je ograničena na mora čija se najniža temperatura ne kreće ispod 10°C (Ellegard i sur., 2017). Ukoliko je temperatura manja od navedene, pokretna stanica može prijeći u oblik

trajne ciste i čekati povoljnije uvjete, tj. zatopljenje iznad 10°C. Za razliku od saliniteta, odnos između temperature i veličine trajne ciste je obrnuto proporcionalan. Po istom principu je zabilježena i promjena tj. smanjenje duljine šiljaka, ali su potrebna daljnja istraživanja na tu temu (Ellegard i sur., 2017).

Između promjera ciste i duljine šiljaka nije pronađena poveznica, što je i očekivano s obzirom na rezultate prethodnih ispitivanja na uzgojnim kulturama. Pokazalo se da promjer ciste ne ovisi o promjeni saliniteta, a pretpostavlja se da su varijacije u promjeru cista vjerojatno rezultat germinacije (Hallett, 1999). Istraživanja Peña-Manjarrez i sur. (2005) za područje zaljeva Todos Santos (Meksiko) i Lewis i sur. (1985) na području Loch Creran (SZ Škotska) pokazala su da vrsta *L. polyedra* pokazuje eksponencijalni rast u vrijeme kasnog ljeta i rane jeseni, što se poklapa s najvećom brojnosti ciste *L. machaerophorum*. Ispitivanja na kulturama pokazuju da je temperatura jedan od čimbenika koji utječu na proizvodnju cisti (Lewis i Hallett, 1997). Stoga zaključujemo da su ciste u Kaštelanskom zaljevu na dubinama od 25 cm do 27,5 cm, koje pokazuju najveću brojnost, nastale u prethodno spomenutim periodima godine. Utjecaj saliniteta i temperature na duljinu šiljaka je očekivan, jer je proces nastanka šiljaka biokemijske prirode i ovisi o oba parametra (Slika 24.) (Hallett, 1999). S tim u vezi, oba parametra utječu na gustoću morske vode, a što je gustoća viša, duži su i šiljci na cistama. Stoga se smatra da u morima s većom gustoćom morske vode porast duljine šiljaka omogućuje njihovo grupiranje i lakše tonjenje cista (Mertens i sur., 2009).



Slika 24. Razlika u duljini šiljaka ovisno o vrijednosti saliniteta/temperature (izvor: Mertens i sur., 2009).

S obzirom na izmjerene duljine šiljaka u ovom radu, može se zaključiti da su ciste na slikama 19., 20. i 22. nastale na području manje gustoće morske vode, a cista na slici 21. na području veće gustoće morske vode. Uzimajući u obzir da je većina zabilježenih cista karakterizirana manjom duljinom šiljaka, može se potvrditi utjecaj rijeke Jadro na Kaštelanski zaljev, odnosno na ispitivanu postaju kroz smanjene vrijednosti saliniteta.

4.2. Analiza „Standardne“ palinološke metode za pripremu uzoraka

Standardna palinološka metoda uključuje korištenje klorovodične kiseline (HCl) koja služi za uklanjanje karbonata iz uzorka, fluorovodične kiseline (HF) kako bi se uklonili silikati iz uzorka te sita za prosijavanje uzorka (Lignum i sur., 2008). Premda se u literaturi navedena metoda naziva „standardna“, razlike u protokolu ipak postoje između većine istraživanja u kojima se koristi. Najčešće razlike su zabilježene u korištenju raznih volumena uzorka, zatim u tretiranju uzorka prethodno navedenim kiselinama različitih koncentracija i volumena, u drukčijem materijalu sita za prosijavanje i njegovim veličinama, ili pak u provođenju metode izmijenjenim redoslijedom (Lignum i sur., 2008; Mertens, 2009).

Kao što je već navedeno, u ovom radu brojanje trajnih cista *L. machaerophorum* i spora *Lycopodium* se obavljalo putem invertnog mikroskopa (povećanje 200x), a u obzir smo uzimali samo ciste koje su cijele ili polovično očuvane. Mertens i sur. (2009) su se koristili istom polazišnom tezom za mikroskopiranje uzoraka kao i korištenjem jednadžbe po Benninghoff (1962) (prikazana u poglavlju Materijali i metode) za računanje ukupne brojnosti cista po uzorku.

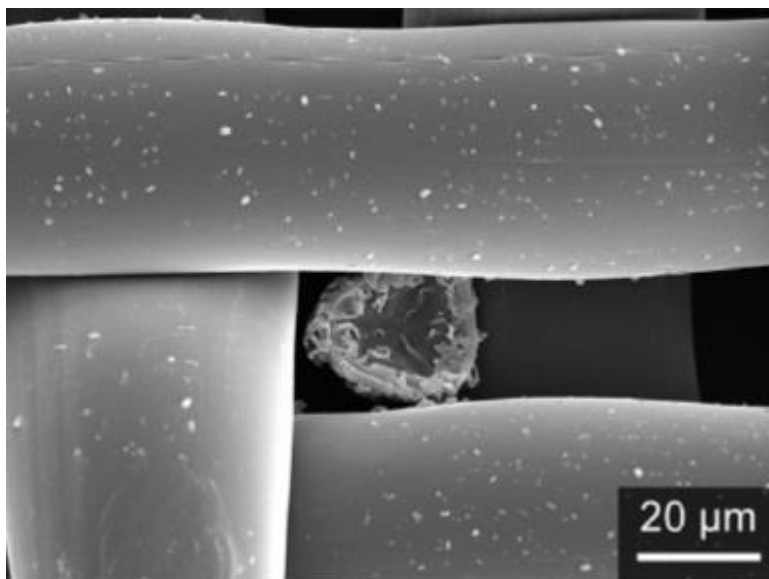
Prilikom pripreme uzoraka cista za mikroskopsku obradu uzorci su izloženi degradaciji, bilo kemijskim putem (kiseline) ili mehaničkim (centrifugiranje, prosijavanje), stoga se taj utjecaj mora uzeti u obzir nakon obrade rezultata, odnosno brojanja *Lycopodium* spora i trajnih cisti te promatranja njihove morfologije. Broj spora u *Lycopodium* tableti se razlikuje ovisno o proizvođaču, pa odabir tableta ovisi o potrebama istraživanja (Lignum i sur., 2008).

Istraživanja na temu brojnosti dinoflagelatnih cista prikazuju različite pristupe palinološkoj metodi. Što se tiče tretiranja uzorka kiselinama, u ovom istraživanju uzorku je dodana fluorovodična kiselina (HF) jednom, a klorovodična kiselina (HCl) dva puta. Lignum i sur. (2008) u ispitivanju su također koristili obje kiseline, svaku po jedan put, osim u slučaju kada je nakon mikroskopske obrade uzorka bilo potrebno dodatno uklanjanje karbonata ili

silikata. U našem istraživanju dodatno tretiranje kiselinama nije bilo potrebno zbog čistoće preparata u koja je dozvoljavala nesmetane identifikacije cista i spora.

Nakon dodavanja kiselina Lignum i sur. (2008) su u uzorak dodavali vodu i prosijavali ga, za razliku od koraka u ovome radu, gdje se nakon dodavanja kiseline uzorak najprije centrifugirao, zatim dekantirao te naposljetku prije prosijavanja neutralizirao dodavanjem destilirane vode. Vrlo je bitno naglasiti da dekantiranje prije prosijavanja uzorka može rezultirati neželjenim gubitkom *Lycopodium* spora, zato što je uočeno da plutaju u otopini. Nakon dodavanja kiselina, uzorak je ostavljen da se taloži 24 sata, dok je u ovom radu ostavljen dvadesetak minuta a zatim centrifugiran. Prema Mertens i sur. (2009), istraživači koji su u ovome koraku birali kratko vrijeme taloženja koristili su centrifugiranje kako bi koncentrirali uzorak i smanjili mogućnost gubitka materijala prilikom dekantiranja, što se slaže s našim pristupom.

S obzirom na moguću degradaciju prilikom pripreme uzorka važno je odrediti kojoj grupi pripada ispitivana cista. *Lingulodinium machaerophorum* pripada grupi umjereno osjetljivih cista (Mertens i sur., 2009). Po Mertens i sur. (2009) centrifugiranje ne uzrokuje degradaciju cista. Nadalje, uobičajeno je da se nakon dodavanja fluorovodične kiseline uzorak ostavi barem 12 sati. Budući da fluorovodična kiselina ne utječe na oštećenje ili bilo kakvu morfološku promjenu kod dinoflagelatne ciste, izbor vremenskog perioda je proizvoljan. Stoga 48 sati koje je uzorak u ovom ispitivanju proveo u fluorovodičnoj kiselini nema utjecaja na mogući gubitak materijala. U slučajevima kada je za prosijavanje korišteno samo jedno sito veličine 20 µm, pregledavanjem uzorka putem elektronskog mikroskopa je uočeno da neke od *Lycopodium* spora prolaze kroz sito te veličine pa je i na taj način moguć gubitak određenog broja spora (Slika 25.) (Lignum i sur, 2008). U ovome radu su korištena dva sita, veličina 125 µm i 20 µm, pa treba uzeti u obzir mogućnost da je određeni dio spora i cista izgubljen prilikom dvostrukog prosijavanja. Nadalje, uz prosijavanje je bitan i oblik ciste. *Lingulodinium machaerophorum* na svojoj površini sadrži šiljke, te su zbog svog oblika moguć razlog za gubitak određenog broja cista te njihovu degradaciju prilikom prosijavanja. Lignum i sur. (2008) smatraju da se prosijavanje treba odvijati na situ od 15 µm kako bi se smanjio mogući gubitak *Lycopodium* spora, a tu pretpostavku potvrđuju Mertens i sur. (2009), dokazujući da je upravo u tom koraku zabilježen značaj gubitak spora, iako ne i cista. Stoga, brojka od 24 % pronađenih spora, odnosno gubitak od 76 % istih je vjerojatno rezultat nedostataka same metode, točnije koraka duplog prosijavanja.



Slika 25. Prikaz *Lycopodium* spore na situ veličine pora 20 μm (izvor: Lignum i sur., 2008).

5. ZAKLJUČCI

Vrsta *Lingulodinium polyedra* proizvodi trajne ciste u određenoj fazi životnog ciklusa, koje tonu kroz vodeni stupac i akumuliraju se u sedimentu gdje mogu provesti određeno vrijeme, ovisno o uvjetima u kakvima se nalazi. Parafrazirajući Ellegard i sur. (2017), koji kažu da će istraživanje sedimenta i njegove dublje arhive biti ekvivalent odlasku u prošlost, treba naglasiti kako ovakvim istraživanjima pružamo izvrstan materijal za proučavanje adaptacije vrste ne samo na prošle, nego i na buduće promjene u okolini. Bitno je naglasiti da ciste imaju ulogu „sjemena“, jer pri uspostavljanju povoljnih okolišnih uvjeta mogu iznova započeti proces cvatnje (Pfiester i Anderson, 1987). Ta spoznaja je od iznimne važnosti za buduća istraživanja jer se na taj način mogu prognozirati i detaljnije istražiti razlozi za moguće cvatnje.

Zaključci ovog diplomskog rada su:

- brojnost cista u jezgri sedimenta nije pokazala proporcionalan rast ili pad s dubinom jezgre, zabilježeno je nekoliko odskakanja
- maksimalna brojnost cista se povezuje sa periodima kasnog ljeta i rane jeseni
- duljina šiljaka na površini ciste pretežno ovisi o salinitetu
- s obzirom na izmjerene vrijednosti duljina šiljaka cista ovog rada zaključujemo da je područje uzorkovanja (Kaštelanski zaljev) smanjenog saliniteta (dotok rijeke Jadro)
- gubitak 76% spora prilikom pripreme uzoraka rezultat je provođenja palinološke metode, točnije faze prosijavanja i korištenja sita veličine pora 20 μm
- usporedba rezultata ovoga i drugih sličnih istraživanja pokazala je da se pristup metodi najviše razlikuje u fazi prosijavanja
- korak ka standardizaciji palinološke metode mogao bi biti korištenje sita veličine pora 15 μm , upravo zbog umanjivanja prethodno navedenih negativnih posljedica

6. LITERATURA

- Benninghoff WS. 1962. Calculation of pollen and spores density in sediments by addition of exotic pollen in known quantities. *Pollen et Spores*, 6: 332-333.
- Bravo I, Figueroa RI, Garcés E, Fraga S, Massanet A. 2010. The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: the example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep Sea Research Part II*, (57): 166-174.
- Bužančić M, Ninčević Gladan Ž, Marasović I, Kušpilić G, Grbec B, Matijević S. 2012. Population structure and abundance of phytoplankton in three bays on the eastern Adriatic coast: Šibenik Bay, Kaštela Bay and Mali Ston Bay. *Acta Adriatica*, 53(3): 413-435.
- Dale B. 1983. Dinoflagellate resting cysts: „benthic plankton“. U: Fryxell GA (ur.), *Survival strategies of algae*. Cambridge University Press, Cambridge, str. 69-136.
- DiPoi E, Kraus R, Cabrini M, Finotto S, Flander-Putrlle V, Grego M, Kužat N, Ninčević Gladan Ž, Pezzolesi L, Riccardi E, Bernardi Aubry F, Bastianini M. 2019. Dinoflagellate resting cysts from surface sediments of the Adriatic ports: Distribution and potential spreading patterns. *Marine Pollution Bulletin*, 147: 185-208.
- Ellegaard M, Godhe A, Ribeiro S. 2017. Time capsules in natural sediment archives – Tracking phytoplankton population genetic diversity and adaptation over multidecadal timescales in the face of environmental changes. *Wiley Evolutionary Applications*.
- Ellegaard M, Dale B, Mertens Kenneth N, Pospelova V, Ribeiro S. 2017. Dinoflagellate cysts as proxies for Holocene environmental change in estuaries: Diversity, abundance and morphology. U: Weckström K, Saunders K, Gell P, Skilbeck C (ur.), *Applications of Paleoenvironmental Techniques in Estuarine Studies*. Springer, Dordrecht, str. 295-312.
- Figueroa RI, Bravo I. 2005. Sexual reproduction and two different encystment strategies of *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology*, 41(2): 370-379.
- Hallett RI. 1999. Consequences of environmental change on the growth and morphology of *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) in culture. *Doktorska disertacija*, University of Westminster, 109 str.
- Head MJ. 1996. Modern dinoflagellate cysts and their biological affinities. U: Jansonius J, McGregor DC (ur.) *Palynology: principles and applications*, Dallas, str. 1197-1248.

- Keafer BA, Churchill JH, Anderson DM. 2005. Blooms of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium fundyense*, in the Casco Bay region of the western Gulf of Maine: Advection from offshore source populations and interactions with the Kennebec River plume. *Deep Sea Research*, II(52): 2631-2655.
- Kokinos JP, Anderson DM. 1995. Morphological development of resting cysts in cultures of the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* (=L. *machaerophorum*). *Palynology*, 19(1): 143-166.
- Lassus P, Chomérat N, Hess P, Nézan E. 2016. Toxic and harmful microalgae of the World Ocean. International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC), Copenhagen, str. 523.
- Lewis J, Tett P, Dodge JD. 1985. The cyst-theca cycle of *Gonyaulax polyedra* (*Lingulodinium machaerophorum*) in Creran, a Scottish west coast Sea-Loch. U: Anderson DM, White AW, Baden DG (ur.). *Toxic dinoflagellates*, Elsevier Science Publishing, str. 85-90.
- Lewis J, Hallett R. 1997. *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*) a blooming dinoflagellate. U: Ansell AD, Gibson RN, Barnes M (ur.), *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 35, UCL Press, London, str. 97-161.
- Lignum J, Jarvis I, Pearce MA. 2008. A critical assessment of standard processing methods for the preparation of palynological samples. *Elsevier, Review of Palaeobotany and Palynology*, 149: 133-149.
- Marasović I. 1990. Udio dinoflagelata u fitoplanktonskoj zajednici srednjeg Jadrana s posebnim osvrtom na toksične i „red tide“ vrste. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 120 str.
- Marasović I, Gačić M, Kovačević V, Krstulović N, Kušpilić G, Pucher-Petković T, Odžak N, Šolić M. 1991. Development of the red tide in the Kaštela Bay (Adriatic Sea). *Marine Chemistry*, 32: 375-385.
- Marasović I, Ninčević Ž, Odžak N. 1995. The effect of temperature on blooms of *Lingulodinium polyedra* and *Alexandrium minutum* in Kaštela Bay. U: Lassus P, Arzul G, Gentien P, Marcaillou C (ur.), *Harmful marine algal blooms: Technique and documentation*, Paris Lavoisier, str. 187-192.
- Mertens KN, Verhoeven K, Verleye T, Louwye S, Amorim A, Ribeiro S, Deaf AS, Harding IC, Schepper S De, González C, Kodrans-Nsiah M, De Vernal A, Henry M, Radi T, Dybkjaer K, Poulsen NE, Feist-Burkhardt S, Chitolie J, Heilmann-Clausen C, Londeix L, Turon JL, Marret F, Matthiessen J, McCarthy FMG, Prasad V, Pospelova V, Kyffin

- Hughes JE, Riding JB, Rochon A, Sangiorgi F, Welters N, Sinclair N, Thun C, Soliman A, Van Nieuwenhove N, Vink A, Young M. 2009. Determining the absolute abundance of dinoflagellate cysts in recent marine sediments: The *Lycopodium* marker-grain method put to the test. *Elsevier, Review of Palaeobotany and Palynology*, 157: 238-252.
- Ninčević Gladan Ž, Marasović I, Grbec B, Skejić S, Bužančić M, Kušpilić G, Matijević S, Matić F. 2009. Inter-decadal variability in phytoplankton community in the Middle Adriatic (Kaštela Bay) in relation to the North Atlantic oscillation. *Estuaries and Coasts* 33(2): 376-383.
- Ninčević Gladan Ž, Ujević I, Milandri A, Marasović I, Ceredi A, Pigozzi S, Arapov J, Skejić S, Orhanović S, Isajlović I. 2010. Is yessotoxin the main phycotoxin in Croatian waters? *Marine Drugs*, 8: 460-470.
- Paz B, Riobo P, Fernandez ML, Fraga S, Franco JM. 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Prorocentrum reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon*, 44(3): 251-258.
- Paz B, Daranas AH, Norte M, Riobo P, Franco JM, Fernandez JJ. 2008. Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Marine Drugs*, 6: 73-102.
- Peña-Manjarrez JL, Helenes J, Gaxiola-Castro G, Orellano-Cepeda E. 2005. Dinoflagellate cysts and bloom events at Todos Santos Bay, Baja California, México, 1999–2000. *Continental Shelf Research*, 25: 1375–1393.
- Pfiester LA, Anderson DM. 1987. Dinoflagellate reproduction. U: Taylor FJR (ur.), *The Biology of Dinoflagellates*, Botanical Monographs 21, Blackwell Scientific Publications, Oxford, str. 611-648.
- Roy S, Morse D, Letourneau L. 2013. Cold-induced cysts of the photosynthetic dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* have an arrested circadian bioluminescence rhythm and lower levels of protein phosphorylation. *Plant Physiology*, 164(2): 966-977.
- Wall D, Dale B, Harada K. 1973. Description of new fossil dinoflagellates from the Late Quaternary of the Black Sea. *Micropaleontology*, 19: 18-31.
- Zonneveld KAF, Meier S, Esper O, Siggelkow D, Wendler I, Willems H. 2005. The (palaeo-) environmental significance of modern calcareous dinoflagellate cysts: a review. *Palaontologische Zeitschrift*, 79(1): 61-77.
- Zonneveld KAF, Pospelova V. 2015. A determination key for modern dinoflagellate cysts. *Palynology*, 39: 387-409.