

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Margareta Godrijan

**Istraživanje toksičnih dinoflagelata roda *Ostreopsis*
na javnoj plaži sjeverno od Rovinja**

Diplomski rad

Zagreb, 2011. godina

Ovaj rad izrađen je u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod vodstvom dr. sc. Martina Pfannkuchen-a, te vodstvom dr. sc. Petra Kružića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr. Martinu Pfannkuchen-u koji mi je pružio priliku za ovo znanstveno istraživanje. Zahvaljujem mu na svim stručnim savjetima i velikoj pomoći prilikom stvaranja ovog diplomskog rada. Najtoplije zahvaljujem i dr. Petru Kružiću na vodstvu prilikom stvaranja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem Institutu Ruđer Bošković, Centru za istraživanja mora u Rovinju što mi je dozvolio da istraživanje provedem na institutu.

Posebnu zahvalu dugujem Danieli Marić i Jeleni Godrijan za pruženu veliku pomoć prilikom uvođenja u svijet fitoplanktona. Hvala Danieli, Jeleni, Martinu i Želimiri na velikoj potpori i prijateljstvu za vrijeme mog boravka u Rovinju.

Veliko hvala mojim roditeljima te sestrama Ivani i Jeleni na beskrajnoj podršci, ljubavi i razumijevanju za vrijeme mog školovanja.

Ada, Andrea i Martina curke hvala Vam na savjetima i potpori od prvog do zadnjeg ispita na faksu.

Također veliko hvala svim mojim prijateljima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

ISTRAŽIVANJE TOKSIČNIH DINOFLAGELATA RODA *OSTREOPSIS* NA JAVNOJ PLAŽI SJEVERNO OD ROVINJA

Margareta Godrijan

Rooseveltov trg 6, Zagreb

Cilj ovog istraživanja bilo je dokazati prisutnost dinoflagelata roda *Ostreopsis* uz Istarsku obalu Jadranskog mora te ispitati njihovu toksičnost. Istraživanje smo proveli na javnoj plaži Borik sjeverno od Rovinja u razdoblju od 22. rujna 2010. do 27. listopada 2010., za vrijeme maksimalne zabilježene brojnosti roda *Ostreopsis*. Alge roda *Ostreopsis* su epifitske, one za svoje stanište zahtijevaju stabilnu podlogu jer prilikom nepovoljnih vremenskih uvjeta dolazi do odvajanja stanica sa supstrata. Svakodnevno smo pratili raspone temperature, saliniteta, vremenske uvjete te brojnost na makroalgi *Cystoseira crinita*, koja predstavlja odličan supstrat za prihvat biofilma algi roda *Ostreopsis*. Ovim istraživanjem bolje smo upoznali ekologiju roda *Ostreopsis*. Praćenje dinamike cvjetanja ukazalo je na važnost okolišnih čimbenika na razvoj i završetak cvjetanja, posebno hidrodinamičkih uvjeta poput vjetrova, valova i struja. Zabilježeni su toksini palitoksin i ovatoksin, te smo njihovom analizom pokazali su da je proizvodnja tijekom prirodnog cvjetanja bila iznimno visoka.

(49 stranica, 19 slika, 1 tablica, 60 literaturna navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici, na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Ključne riječi: toksični dinoflagelati, toksično cvjetanje, *Ostreopsis siamensis*, *Cystoseira crinita*, palitoksin, ovatoksin

Voditelj: Dr. sc. Martin Pfannkuchen

Suvoditelj: Dr. sc. Petar Kružić, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Zrinka Ljubešić, doc.

Dr. sc. Domagoj Đikić, doc.

Rad prihvaćen: 19.10.2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

INVESTIGATION OF THE MASS APPEARANCE OF TOXIC DINOFLAGELLATES FROM THE GENUS *OSTREOPSIS* ON A PUBLIC BEACH NORTH OF ROVINJ

Margareta Godrijan

Roosveltov trg 6, Zagreb

The aim of this study was to prove the presence of the dinoflagellate genus *Ostreopsis* along the Istrian coast of the Adriatic Sea and investigate its toxicity. The research was conducted at a public beach north of Rovinj, in the period from the 22nd September 2010. until the 27th October 2010., during the maximal recorded abundance of the genus *Ostreopsis*. Algae of the genus *Ostreopsis* are epiphytic. They require a stable habitat and settlement base because adverse weather conditions might cause a separation of cells from the substrate. We followed temperature, salinity, weather conditions and abundance of *Ostreopsis* sp. on the macroalgae *Cystoseira crinita*, which is a perfect substrate for the biofilm produced by the genus *Ostreopsis*. This research allowed us better insights into the ecology of this genus. Monitoring the dynamics of this bloom showed the importance of environmental factors for the development and completion of a bloom event, especially the hydrodynamic conditions such as wind, waves and currents. We recorded the toxins palytoxin and ovatoxin. Our analysis showed that their production was extremely high during this natural bloom.

(49 pages, 19 figures, 1 table, 60 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in Central biological library, Division of Biology, Faculty of Science, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Keywords: toxic dinoflagellates, toxic blooms, *Ostreopsis siamensis*, *Cystoseira crinita*, palytoxin, ovatoxin

Supervisor: Dr. Martin Pfannkuchen

Assistant supervisor: Dr. Petar Kružić, Assistant Profesor

Reviewers: Dr. Zrinka Ljubešić, Assistant Profesor

Dr. Domagoj Đikić, Assistant Profesor

Thesis accepted: 19.10.2011.

SADRŽAJ

1. UVOD	6
1.1. SJEVERNI JADRAN	7
1.2. TOKSIČNE VRSTE.....	8
1.2.1. Sindromi koje uzrokuju toksične vrste.....	10
1.2.2. Toksični događaji.....	12
1.3. DINOFLAGELATI	14
1.3.1. Toksični dinoflagelati	16
2. CILJ RADA.....	22
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Istraživano područje	23
3.2. Uzorkovanje i analiza	23
3.3. Izolacija i postavljanje kultura	24
4. REZULTATI	26
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČAK.....	43
7. LITERATURA	44

1. UVOD

Veći dio Zemljine površine prekriven je vodom, a fitobentos i fitoplankton imaju važnu ulogu u biogeokemijskim procesima u biosferi. Fitobentos i fitoplankton uključuju jednostanične i kolonijalne, autotrofne i miksotrofne mikroorganizme - alge. Bentonske makro i mikro alge postoje samo u jako plitkim vodama gdje sunčeva svjetlost dopire do dna, omogućavajući fotosintezu. Važnost fitoplanktona je u tome što je odgovoran za 95% fotosinteze u oceanima i veže 40% ugljika u biosferi, te predstavlja prvu i najvažniju kariku hranidbenog lanca u moru. Prilikom masovnog razmnožavanja alga dolazi do pojave koju nazivamo cvjetanje mora. Cvjetanje fitobentosa i fitoplanktona je brzi rast jedne ili više vrsta koje vodi povećanju biomase. Danas je u svijetu poznato oko 300 vrsta alga koje izazivaju cvjetanje mora, a približno $\frac{1}{4}$ tih vrsta imaju mogućnost proizvodnje toksina (UNESCO 2011). Prilikom masovnog razmnožavanja tih vrsta dolazi do pojave koju nazivamo toksično cvjetanje algi (eng. HAB - Harmful Algal Bloom). Ovaj pojam je prvi puta predstavljen 1974. godine na prvoj Internacionalnoj konferenciji o cvjetanju toksičnih dinoflagelata (Masó i Garcés 2006). Dugoročnim promatranjem i istraživanjem fitobentosa i fitoplanktona moguće je bolje razumijevanje prostorne i vremenske promjene tih mehanizama i njihove promjenjivosti, tj. dinamike populacija. Cvjetanja su događaji brze proizvodnje i akumulacije biomase algi kao odgovor na povoljne uvjete u određenom dijelu oceana i mora. Postoje i vrste koje proizvode toksine ali ne izazivaju cvjetanje. Također postoje vrste koje su toksične na jednom području gdje ostavljaju štetne posljedice, dok na nekom drugom području nisu štetne. Masovno razmnožavanje toksičnih vrsta može ostaviti velike posljedice na okoliš te ugroziti zdravlje biljnih i životinjskih vrsta, a isto tako i naštetiti čovjeku. Cvjetanje mora se javljalo i puno prije nego je čovjek svojom aktivnošću počeo mijenjati ekosustav, ali su zadnjih nekoliko desetljeća vidljivo uočene pojave češćeg cvjetanja mora, što možemo povezati s povećanjem ljudske aktivnosti u priobalnom području. Rasprostranjenost fitobentosa i fitoplanktona u oceanima nije jednolika, ona ovisi na primjer o fizikalnim (svjetlost, temperatura, struje), kemijskim (salinitet, koncentracija nutrijenata) i biološkim čimbenicima (interspecijski i intraspecijski odnosi). Čovjek svojom aktivnošću unosi nutrijente koji su potrebni za rast algi, stoga one imaju mogućnost bržeg razvoja. Povećanjem broja algi dolazi do smanjenja prozirnosti vode što direktno utječe na smanjenje dubine prodiranja svjetlosti potrebne za

proizvodnju kisika procesom fotosinteze. Pad koncentracije kisika i dostupnih nutrijenata u vodi uzrokuje odumiranje algi te dolazi do njihovog taloženja na dno ili plutanja po površini. Mikrobiološkom razgradnjom iscrpljuje se kisik što na kraju dovodi do stvaranja anaerobne zone. Povećava se populacija anaerobnih organizama čiji su produkti metabolizma nerijetko toksične tvari. To uzrokuje ugibanje ostalih organizama koji nisu prilagođeni takvim uvjetima. Razmnožavanjem toksičnih algi, te neznanjem čovjeka o prisutnosti tih vrsta može doći do velikih problema, što negativno utječe na ribarstvo i turizam te život ljudi u priobalnom području.

1.1. SJEVERNI JADRAN

Jadransko je more sjeverni dio Sredozemnog mora (Mediterrana), izgledom podsjeća na poluzatvoreni izduženi zaljev, te čini 4,6% od njegove ukupne površine (Cushman-Roisin i sur. 2001). Od Jonskog je mora odvojeno Otrantskim vratima (širine 70 km) i Otrantskim pragom (789 m dubokim). Površina Jadranskog mora bez otoka iznosi 135 428 km², a volumen mu je 34 836 km³. Najveća je dubina izmjerena u Južnojadranskoj kotlini (1243 m). Veći je dio Jadrana (73,9%) plići od 200 m. Uvučenost Jadranskog mora u europski kontinent odražava se na fizikalna, kemijska i biološka svojstva mora. Najveći je dio Jadrana litoralno područje, tj. plitko more do 200 m dubine. Najvažniji meteorološki čimbenici koji djeluju na hidrografiju, te posebno na razvoj i raspodjelu fitoplanktona i fitobentosa jesu: sunčeva energija, vjetrovi i količina oborina. Ti čimbenici utječu na zagrijavanje/hlađenje, morske struje (horizontalne, vertikalne i kružne), termohalina svojstva i koncentracija hranjivih tvari. Važni vjetrovi u području Jadrana su bura i jugo, koji uvjetuju stvaranje specifičnog pridnenog i površinskog strujanja (Penzar i Makjanić 1978). Raspored oborina na sjevernom Jadranu predstavlja srednjoeuropski tip, dok je za južni Jadran tipičan sredozemni raspored. Koncentracija hranjivih tvari u Jadranu je mala, te se samo lokalno mogu uočiti izvori eutrofikacije (npr. u blizini gradova, u poluzatvorenim zaljevima i estuarijima) (Franco i Michelato 1992). Rijeka Po je najveći izvor slatke vode i nutrijenata u sjevernom Jadranu. Povećana koncentracija nutrijenata u sjevernom Jadranu izaziva pojačan razvoj fitoplanktona, a koncentracija nutrijenata i količina fitoplanktona smanjuje se od sjevernog prema južnom Jadranu (Zavatarelli i sur. 2000; Mangoni i sur. 2008). Morske struje određuju raspodjelu fizikalno - kemijskih i bioloških svojstava u sjevernom Jadranu. Za cirkulaciju vode u

sjevernom Jadranu važni su vjetrovi i dotok slatke vode sjeverno-jadranskim rijekama (Zore-Armanda i sur. 2001) te ulazna struja koja uz istočnu jadransku obalu donosi oligotrofnu vodenu masu iz istočnog Sredozemlja. Glavnina ulazne struje zakreće od vrha istarskog poluotoka prema zapadu. Stvara se frontalna zona na mjestu sudara vodene mase s juga i vodene mase iz sjevernog Jadrana (Mauri i Poulain 2001). U području fronte često se pojavljuje uzdizanje dubinske vode prema površini, što stvara povoljne uvjete za razvoj fitoplanktona te kada dođe do obalnih područja također i za fitobentos, jer dolazi do miješanja različitih tipova vodenih masa i obogaćivanja površinske vode nutrijentima (Zore-Armanda i sur. 2001). Sjeverno jadranska voda istječe uz zapadnu jadransku obalu prema Otrantskim vratima, struja se naziva Zapadna jadranska struja (eng. WAC - Western adriatic current). Uz Istarsku obalu se more u proljeće i ljeto zagrijava brže nego što se hladi u jesen, a to je povezano sa širenjem vode rijeke Po. Kinetička energija vode rijeke Po, vjetrovi (bura) i struja koja uz istočnu obalu dolazi iz srednjeg i južnog Jadrana, stvaraju nekoliko tipova vrtloga u sjevernom Jadranu: ciklonalni južno od Istre i dva anticiklonalna vrtloga sjeverno od spojnice Pula – Ancona (Bignami i sur. 2007). Na taj se način najčešće nastavlja strujanje uz obale Istre prema Tršćanskom zaljevu (Supić i sur. 2002). U razdoblju slabog dotoka ulazne istočno-jadranske struje anticiklonalni vrtlog podržava stvaranje istarske protustruje koja se kreće uz istarsku obalu, od sjevera prema jugu. Prilikom cirkulacije dolazi do rasprostranjivanja fitoplanktona te također i fitobentosa kada struja dođe do obalnog područja.

1.2. TOKSIČNE VRSTE

Toksične alge uzrokuju zdravstvene i ekonomske probleme tijekom masovnih razmnožavanja diljem svijeta. Imaju veliki utjecaj na hranidbeni lanac prilikom nakupljanja, što može dovesti do trovanja morskih organizama, a posljedično i čovjeka koji se tim organizmima hrani. HAB mogu izazvati razne vrste mikroalga, zbog toga se sve veća pažnja ulaže u proučavanje te procjenu fizioloških, kemijskih i ekoloških karakteristika pojedinih vrsta. Toksični cvatovi su nepravilni i nepredvidljivi događaji. Njihov monitoring i poznavanje ekologije vrlo je bitno kako bismo lakše odredili vrste i pretpostavili vrijeme njihovog masovnog razmnožavanja, s ciljem smanjenja štetnih posljedica. Mnoge od iznimno toksičnih vrsta redovito se pojavljuju u normalnim fitoplanktonskim populacijama, a mogu biti toksične već pri vrlo niskoj brojnosti (100-1000 stanica po l⁻¹). One bi vjerojatno ostale nezamijećene kad ne bi bilo

vektorskih organizama koji ih koriste kao izvor hrane te u svojim tkivima akumuliraju toksine. Još u 16. stoljeću bilo je poznato trovanje ciguaterom, no sve do prije 50 tak godina bilo je poznato tek malo vrsta koje su toksične, tek 3 do 4 roda dinoflagelata i par vrsta cijanobakterija (Zingone i Wyatt 2005). Danas je poznato puno više toksičnih vrsta, a broj novootkrivenih vrsta i toksina stalno raste. Vrlo poznate pojave su obojane plime, postoje crvena (eng. „red tide“) i zelena (eng. „green tide“). To su prirodni fenomeni koji se javljaju prilikom izrazitog cvjetanja fitoplanktonskih vrsta, obično dinoflagelata, koje uzrokuju obojenje vode u crvenu ili zelenu ovisno o pigmentima koje sadrže alge. „Red tide“ se ponekad povezuje s cvjetanjem toksičnih vrsta, što kroz akumulaciju kroz hranidbeni lanac može utjecati i na čovjeka. Zadnjih desetljeća primijećen je porast abudancije toksičnih dinoflagelata te raste zabrinutost o trajnim posljedicama koje ti organizmi mogu ostaviti na čovjeka. Danas je poznato znatno više organizama koji uzrokuju HAB-ove. Toksične vrste nisu jednako opasne tijekom cijele godine, nego imaju jedno (ili nekoliko) manje-više predvidljivih razdoblja kada mogu uzrokovati štetne posljedice. Neki dinoflagelati su toksični za ribe i uzrokuju masovna ugibanja riba koje se njima hrane. Ta je pojava posebno izražena u kaveznom uzgoju, ali su zabilježeni i slučajevi u divljini. Primjeri za to su cvjetanja *Karenia mikimotoi* (Miyake i Kominami ex Oda, 1935) G. Hansen i Moestrup, 2000. uz sjevernu Europsku obalu (Richardson i Kullenberg 1987; Gentien 1998; McMahon i Raine 1998), *Karenia brevis* (Davis, 1948) G. Hansen i Moestrup, 2000 kod Meksika (Tester i Steidinger 1997) i *Pfisteria piscicida* Steidinger i Burkholder, 1996 duž atlantske obale SAD-a (Kiryu i sur. 2002). Isto tako, dinoflagelati mogu izazvati probleme kod čovjeka prilikom aktivnosti u vodi u kojoj cvjetaju dinoflagelati. Najčešći simptomi su gastrointestinalni, respiratorni simptomi te neurološki poremećaji (Zingone i Wyatt 2005). Ne uzrokuju samo dinoflagelati masovna ugibanja riba, javnosti su poznate i drugi uzročnici poput haptofita *Chrysochromulina polylepis* Manton i Parke, 1962 (Dahl i sur. 1989), *Prymnesium parvum* N. Carter, 1937 (Larsen i Edvardsen 1998), te rafidofita *Chattonella subsalsa* B.Biecheler, 1936, *Fibrocapsa japonica* S.Toriumi i H.Takano, 1973 (Kooistra i sur. 2001) i *Heterosigma akashiwo* (Y.Hada) Y.Hada ex Y.Hara i M.Chihara, 1967 (Nagasaki i sur. 1994). Najveću pozornost javnosti o problemu HAB-ova u Europi je izazvalo cvjetanje *Chrysochromulina polylepis* Manton i Parke, 1962 u tjesnacima Kattegat i Skagerrak u svibnju 1988. godine. Alga koja je nazvana «algom ubojicom» izazvala je masovna ugibanja riba te mnogih morskih beskralješnjaka što je izazvalo velike ekonomske gubitke u akvakulturi, a također je izazvala ugibanje drugih algi (Gjosaeter i sur. 2000). Ta vrsta je široko rasprostranjena te ju se često može pronaći u fitoplanktonu pred kraj proljeća. Visoke koncentracije te alge zabilježene su

samo u 1988. godini zbog neobične kombinacije fizikalno-kemijskih čimbenika (vrijeme, salinitet, hidrografija) (Zingone i Wyatt 2005).

1.2.1. Sindromi koje uzrokuju toksične vrste

1.2.1.1. Paralitičko trovanje školjkašima

Paralitičko trovanje školjkašima (eng. PSP - Paralytic shellfish poisoning), ovaj sindrom izazivaju dinoflagelati roda *Alexandrium*, *Gymnodinium catenatum* L.W.Graham, 1943 te *Pyrodinium bahamense* Plate, 1906, ali i cijanobakterije *Anabaena circinalis* te *Aphanizomenon flos – aquae*. Toksini koji uzrokuju ovaj sindrom mogu izravno utjecati na morske kralježnjake poput riba, kitova, morskih lavova i ptica (Landsberg i Steidinger 1998; Scholin i sur. 2000; Landsberg 2002; Cembella 2003; Shumway i sur. 2003) te također i na morske beskralježnjake (Shumway 1990). Toksini se mogu akumulirati kroz hranidbeni lanac. Neurotoksini koje te vrste sintetiziraju blokiraju živčane i mišićne NaCl kanale čime se sprječava širenje akcijskog potencijala te uzrokuju ukočenost i paralizu, a prijavljeni su i slučajevi smrti (Zingone i Wyatt 2005). Saksitoksin je jedan od toksina koji uzrokuju ovaj sindrom (Daranas i sur. 2001).

1.2.1.2. Dijaretičko trovanje školjkašima

Dijaretičko trovanje školjkašima (eng. DSP - Diarrhetic shellfish poisoning) je po život opasan sindrom s neurološkim učincima te gastrointestinalnim problemima. DSP uzrokuju nekoliko vrsta iz rodova *Dinophysis* i *Prorocentrum* koji predstavljaju toksične bentičke mikroalge te se akumulacijom kroz hranidbeni lanac sindrom prenosi na čovjeka. Stalna izloženost DSP-u može uzrokovati tumor na želucu. Taj sindrom se često javlja u obalnim područjima Europe te u Kanadi na obalnom području uz Atlantik (Zingone i Wyatt 2005). Zbog nedovoljne informiranosti simptomi se u tim područjima ne povezuju s tim sindromom,

već se smatra da su probavne smetnje posljedica nepravilne pripreme školjkaša za jelo (Montresor i Smetacek 2002).

1.2.1.3. Amnezijsko trovanje školjkašima

Amnezijsko trovanje školjkašima (eng. ASP - Amnesic shellfish poisoning) uzrokuje domoična kiselina. Prvi put je zabilježen u Kanadi 1987 (Bates i sur. 1998). Domoična kiselina je neurotoksin koji se akumulira u školjkašima – filtratorima, a pronađena je i u tkivima organizama viših trofičkih razina (morski sisavci, ptice). Uzrokuje gastrointestinalne te neurološke probleme. Neurotoksično djelovanje u ljudi pojavljuje se kao glavobolja, smetenost i gubitak pamćenja. Trajno se oštećuju neuroni u hipotalamusu i amigdalnog području zbog pretjeranog podražaja neurona. Uzrokuju ga dijatomeje iz roda *Pseudo-nitzschia*, a posebno treba obratiti pažnju na cvjetanje vrsta *P. australis* Frenguelli, 1939, *P. multiseriata* (Hasle, 1974) Hasle, 1995, i *P. pseudodelicatissima* Lundholm, Moestrup i Hasle, 2003. *Pseudo-nitzschia* je rod dijatomeja od globalnog značenja, a pronađen je gotovo u svim morskim i estuarijskim ekosustavima. Trenutno su poznate 32 vrste ovog roda, a približno 12 vrsta ima mogućnost sinteze domoične kiseline.

1.2.1.4. Trovanje ciguaterom

Trovanje ciguaterom (eng. CFP - Ciguatera fish poisoning), je vrlo raširen sindrom u tropskim područjima, na čovjeka ga prenosi tropska grebenska riba kojoj toksini ne štete. CFP je uzrokovana vrstama *Gambieridiscus toxicus* Adachi i Fukuyo, 1979, *Prorocentrum* sp. te nekim vrstama roda *Ostreopsis* sp. Uzrokuje gastrointestinalne, neuralne i kardiovaskularne probleme, a zabilježeni su i smrtni slučajevi. Toksini koji uzrokuju ovaj sindrom su ciguatoksin, gambierol, maitoksin te palitoksin (Daranas i sur. 2001). Oni se akumuliraju u biljojedima i ribama bez da im štete. U područjima u kojima se taj sindrom često javlja postoji običaj da se riba prvo testira na mačkama prije nego se konzumira. Ovo je jedan od najistraženijih sindroma dok su ostali sindromi slabo istraženi te se malo zna kako se prenose

kroz hranidbeni lanac od zooplanktona i riba do ptica i sisavaca. Do sada nema zabilježenih slučajeva trovanja ribom uzrokovanih ovim sindromom izvan tropskog područja.

1.2.1.5. Neurotoksično trovanje školjkašima

Neurotoksično trovanje školjkašima (eng. NSP - Neurotoxic shellfish poisoning) je sindrom kojeg uzrokuje dinoflagelat *Karenia brevis* (Davis, 1948) G. Hansen & Moestrup, 2000, koji često cvjeta uz obalu Floride i Meksičkom zaljevu. Sindrom ostavlja negativne posljedice na neurološki i probavni sustav, te toksičnim aerosolom također negativno utječe na respiratorni sustav izazivajući simptome nalik astmi. Toksin koji uzrokuje ovaj sindrom je brevitoksin (Daranas i sur. 2001).

1.2.2. Toksični događaji

Toksične događaje uzrokuju fitoplanktonski organizmi koji otpuštaju toksine, također ti organizmi mogu biti štetni jer se mogu razmnožiti u velikom broju te izazvati obojenje vode i cvjetanje mora. Od 4000 morskih fitoplanktonskih organizama samo 300 njih može biti štetno. Otprilike 80 vrsta, većinom dinoflagelata, ima sposobnost proizvodnje toksina (Masó i Garcés 2006). Toksični događaji ostavljaju velike posljedice na živi svijet u moru, to posebno možemo osjetiti u akvakulturi gdje su posebno pogođeni školjkaši te ribe koje akumuliraju toksine u svoj organizam. Mnoge životinjske vrste poput školjkaša i rakova se hrane fitoplanktonom filtrirajući vodu. Školjkaši su imuni na većinu toksina, ali ih zadržavaju u svom tijelu puno duže nego su toksične alge prisutne u vodi. Oni predstavljaju vektore, a neke toksine ne možemo uništiti kuhanjem. Toksični događaji posebno su izraženi u tropskom području gdje se ljudi često zaraze konzumiranjem morskih plodova i riba, a izrazito su opasni jer mogu dovesti i do smrti. Konzumiranjem otrovanih organizama čovjek lako zaradi ozbiljne zdravstvene probleme. Potrebno je pratiti sastav vrsta fitoplanktona, njihovu brojnost te vršiti kemijske analize plodova mora kako bismo unaprijed mogli spriječiti štetne posljedice. HAB-ovi uzrokuju probleme i preko aerosola, u kojem se nalaze toksične vrste, koji čovjek udiše zadržavanjem u blizini obalnog područja (Shumway 1990; Hallegraef

1993; Van Dolah 2000; Sellner i sur. 2003; Moore i sur. 2008). Ta trovanja su sve češća i u ostalim područjima svijeta pa i u umjerenj zoni. Kako do sada nije bilo poznato puno slučajeva u umjerenijim područjima zbog nedovoljne istraženosti, često ih se nije povezivalo sa toksičnim događajima te su ostali ne prijavljeni ili ne dijagnosticirani. Danas se više pažnje posvećuje tom problemu te su sve više poznati simptomi koje ti događaji uzrokuju. HAB-ovi su se javljali puno prije nego je čovjek počeo mijenjati priobalni ekosustav, ali gledajući unazad nekoliko desetljeća sve je više zaraženih područja, trovanja ljudi te ekonomskih gubitaka što ukazuje na drastični porast utjecaja HAB-ova što je sada postao vrlo rasprostranjen i opasan problem. To posebno možemo primijetiti na području sjeverne Europe zbog dostupnosti podataka o fitoplanktonu koji su prikupljeni kroz duže razdoblje, čime se uočavaju nastale promjene. Zbog povećanja ljudske aktivnosti na tom području može se primijetiti sve češće pojave eutrofikacije te povećanje brojnosti i cvjetanja fitoplanktona.

Štetni događaji imaju tri bitna uvjeta:

1. mora se dokazati postojanje toksičnih vrsta
2. moraju dosegnuti kritičnu koncentraciju
3. mora se dokazati njihova štetnost i posljedice koje ostavljaju.

Studija o toksičnim algama zahtjeva 3 glavna koraka:

1. mora se odrediti njihova rasprostranjenost
2. potrebno je upoznati dinamiku njihova cvjetanja
3. potrebno je razumjeti posljedice koje ostavljaju na okoliš.

Nemaju sva područja na svijetu negativne posljedice zbog ovog problema, ali sve je više očito opasne i toksične vrste široko su rasprostranjene. Mnoga područja su još neistražena tako da se ne zna cjelokupna rasprostranjenost, ali također područja koja su proučavana nemaju cjelovit popis vrsta koja se na tom području mogu pronaći. Na rasprostranjenost vrsta utječu klimatske promjene direktno kroz promjene temperature, oluje ili kroz katastrofalne događaje, ili, neizravno kroz periodične ili dugoročne učinke na oceanografske uvjete. Vrste se mogu prenositi na nova područja strujama, ispiranjem spora sa stopala ptica selica, balastnim vodama ili preko obraštaja, te plastičnim krhotinama, a to se odnosi na vrste koje mogu preživjeti nepovoljne uvjete u stadiju mirovanja, a među njima ima i toksičnih vrsta. Lakše se

prenose vrste koje se javljaju u većim koncentracijama te one koje žive u zaštićenim uvalama, lukama i uzgajalištima gdje su u direktnom kontaktu s čovjekom. Brojnost mikroplanktonskih vrsta varira tokom godine te ih je teško pronaći u većem dijelu godine. Što se opasnih vrsta tiče to znači da nisu podjednako štetne kroz godinu već da postoje razdoblja kada povećavaju svoj štetni utjecaj. Toksične alge se mogu pojaviti tijekom cijele godine iako se najveći incidenti javljaju u ljeto ili jesen. Također se i obojenje javlja u kasno proljeće i ljeto jer je tada vodeni stupac stabilan što omogućuje intenzivnije cvjetanje. To se odnosi na vrste čiji se štetan učinak javlja postizanjem maksimalne biomase ili one vrste koje trebaju koncentraciju od nekoliko tisuća stanica po litri ili manje da bi učinak bio štetan. Mnoge fitoplanktonske alge dio svog životnog ciklusa provode u stanju mirovanja, vrste koje žive u obalnom području formiraju ciste koje se smjeste na dno i tako osiguraju povoljne uvjete za opstanak vrste. Iz toga možemo također saznati povijesne podatke o prisutnosti vrsta na području gdje ih pronađemo te rekonstruirati prošle klimatske uvjete pomoću sedimenta kao što se to radi peludom na kopnu (Zingone i Wyatt 2005).

1.3. DINOFLAGELATI

Dinoflagelati su podijeljeni na jedan razred i osam redova, a poznato je oko 2000 vrsta. Naseljavaju morsku i slatku vodu te se katkad masovno razvijaju zbog brze reprodukcije te u određenim uvjetima mogu uzrokovati cvjetanje u moru i slatkim vodama. Osim planktonskih postoje i bentonske, epifitske, parazitske i simbiotske vrste. Stanice dinoflagelata nemaju staničnu stjenku, nego se na površini nalazi amfijezma, kao modifikacija periplasta. Ako je amfijezma tvrda, nalikuje na staničnu stjenku i često se naziva oklopom ili tekom. Teku nemaju svi dinoflagelati već samo neke vrste pa ih nazivamo tekatnim vrstama, dok se stanice koje nemaju teku nazivaju netekatne ili gole. Površina mladih stanica se sastoji od plazmaleme koja se nalazi s vanjske strane; i plosnatih vezikula ispod plazmaleme, u kojima se kod tekatnih vrsta stvaraju celulozne ploče. Postoje dvije brazde s ventralne strane: uzdužna brazda (sulcus) i poprečna brazda (cingulum). Tamo gdje se sulcus i cingulum presijecaju izlaze bičevi. Uzdužni bič je ispružen i aktivniji prilikom plivanja, tjera stanicu prema naprijed, a poprečni koji se nalazi duž poprečne brazde rotira stanicu oko uzdužne osi. Stanica tekatnih vrsta dinoflagelata je podijeljena na prednji ili gornji dio stanice i stražnji ili donji dio stanice pomoću poprečne brazde. Gornji dio se naziva epiteka, a donji dio hipoteka.

Gornji vrh stanice se zove apeks i u tekatnih vrsta sadrži apikalnu poru, dok se donji kraj stanice zove antapeks. Celulozne ploče tekatnih vrsta su međusobno spojene šavovima (suturae) a njihov raspored i oblik su važni za sistematiku. Najpouzdanija metoda za determinaciju pojedine vrste dinoflagelata je pomoću elektronskog mikroskopa. Kod nekih netekatnih vrsta plazmalema je prekrivena ljuskama. Dinoflagelati posjeduju trihociste, vakuoliziranu citoplazmu, veliku jezgru (dinokarion) s trajno kondenziranim kromosomima, pirenoide, kromatofore te ostale stanične organele. Kao hranu proizvode škrob ili lipidne kapljice. Od pigmenata važni su klorofil *a*, klorofil *c* te karotenoidi od kojih su najvažniji peridinin, dinoksantin i diadinoksantin.

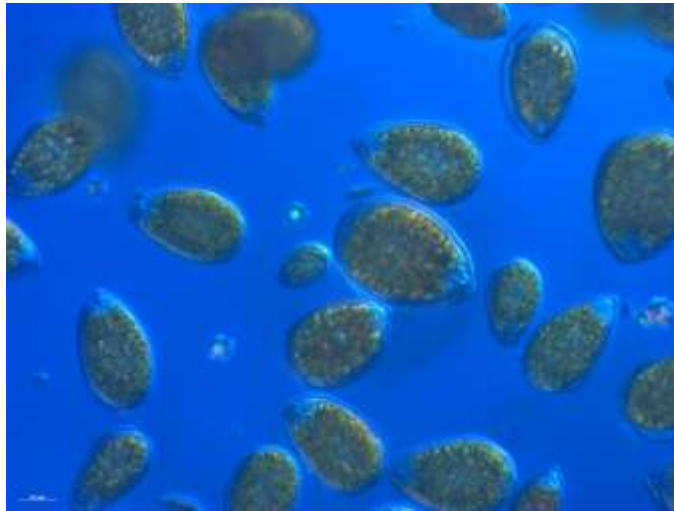
Razmnožavaju se uzdužnom diobom, a često i vegetativnim razmnožavanjem pomoću nepokretnih spora, tako da stanični protoplast stvori pojedinačnu aplanosporu. Klijanje aplanospore potiče promjena intenziteta svjetlosti i temperature.

Za dinoflagelate je još poznato da postoje i toksične vrste koje sintetiziraju neproteinske toksine čije su molekule topive u vodi ili su lipofilne.

Dinoflagelati migriraju vertikalno ovisno o intenzitetu svjetlosti. Danju se gibaju prema svjetlosti koristeći svjetlosnu energiju za fotosintezu, a noću prema dnu gdje ima dovoljno hranjivih soli (Viličić 2002).

1.3.1. Toksični dinoflagelati

1.3.1.1. Rod *Ostreopsis* Schmidt, 1902



Slika 1. *Ostreopsis siamensis* iz prirodnog uzorka.

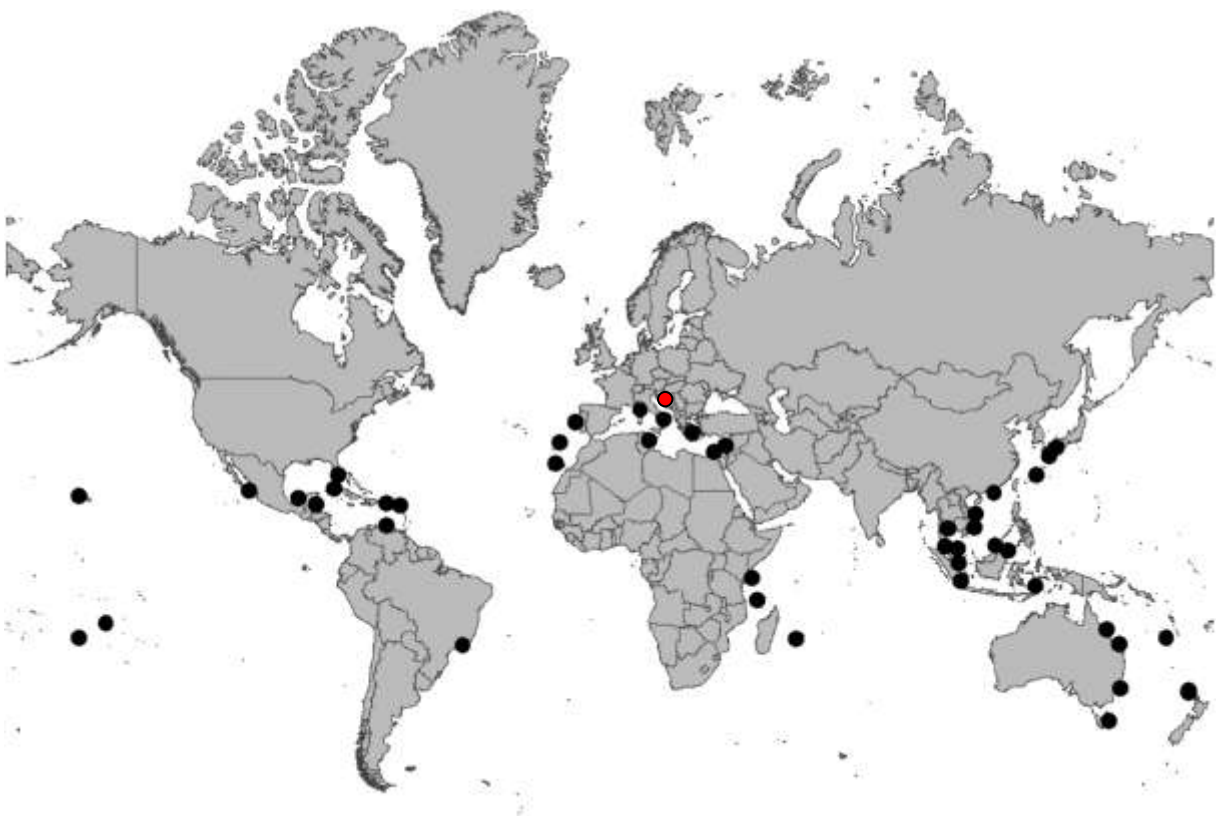
Nadcarstvo: Eucaryota
Carstvo: Protozoa
Odjel: Dinophyta (sin. Pyrrhophyta)
Razred: Dinophyceae (sin. Peridineae)
Red: Gonyaulacales
Porodica: Ostreopsidaceae
Rod: *Ostreopsis* Schmidt

Rod: *Coolia* Meunier

Vrste:
Ostreopsis belizeanus Faust, 1999
Ostreopsis ovata Fukuyo, 1981
Ostreopsis siamensis Schmidt, 1902
Ostreopsis mascarenensis Quod, 1994
Ostreopsis lenticularis Fukuyo, 1981
Ostreopsis marinus Faust, 1999
Ostreopsis labens Faust et Morton, 1995
Ostreopsis heptagona Norris et al., 1985
Ostreopsis caribbeanus Faust, 1999

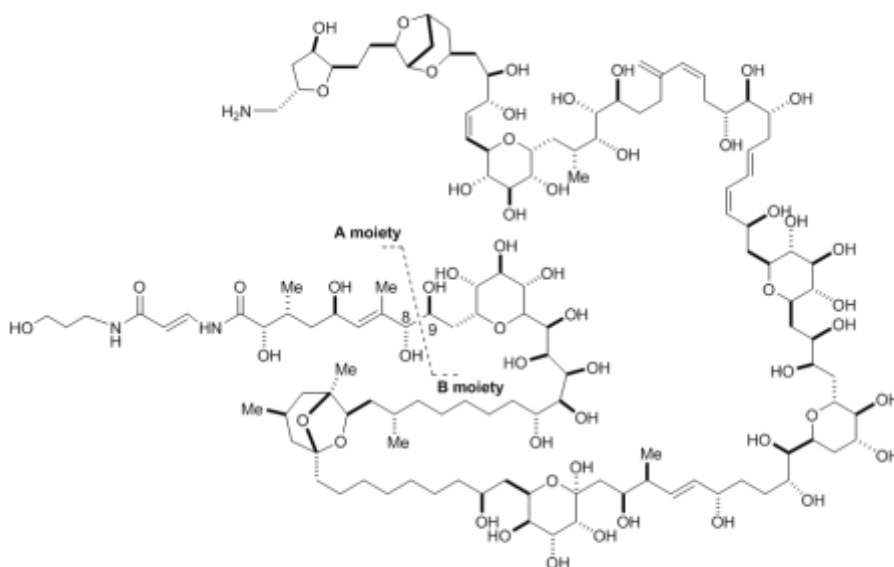
Vrsta:
Coolia monotis

Rod *Ostreopsis* Schmidt jedan je od dva roda koji spadaju u porodicu Ostreopsidaceae Lindeman. Drugi rod je *Coolia* Meunier. Vrste roda *Ostreopsis* su epifitske i potencijalno toksične, a mogu se pronaći pričvršćene na makroalgama, koraljima te u vodenom stupcu (Faust i sur. 1996) (Slika 1). Prva zabilježena vrsta je *Ostreopsis siamensis* koju je pronašao Schmidt 1901 (Fukuyo 1981). Do sada je opisano devet vrsta, a šest od njih su toksične. Taksonomija roda *Ostreopsis* temelji se na morfološkim karakteristikama. Tekalne ploče prilično su slične u većine vrsta pa ih je međusobno teško razlikovati pod svjetlosnim mikroskopom osobito kada se više različitih vrsta nalazi u prirodnim uzorcima. Za točnu identifikaciju vrsta prvo je potrebno odrediti morfologiju i dimenzije (visina i širina stanice), ali su zatim potrebne i molekularne metode kao na primjer sekvencioniranje marker gena (Penna i sur. 2005). Unutar roda *Ostreopsis* pronađene su vrste koje su toksične te uzrokuju zdravstvene probleme kod čovjeka. To je tropska alga koja je kozmopolitski rasprostranjena, a možemo ju pronaći od tropskih do umjerenih voda (Slika 2) (Rhodes 2011).



Slika 2. Rasprostranjenost roda *Ostreopsis*, preuzeto iz Rhodes (2011). Crvena točka prikazuje lokaciju na kojoj su provedena istraživanja i na kojoj je zabilježena visoka koncentracija roda *Ostreopsis*.

Rod *Ostreopsis* također je pronađen uz obale Sredozemnog mora gdje ostavlja velike posljedice na ljudsko zdravlje (Aligizaki i Nikolaidis 2006; Brescianini i sur. 2006; Ciminiello i sur. 2006; Monti i sur. 2007; Barroso García i sur. 2008; Ciminiello i sur. 2008; Mangialajo i sur. 2008; Tichadou i sur. 2010; Totti i sur. 2010; Ungano i sur. 2010; Mangialajo i sur. 2011), a u Hrvatskoj je prvi put zabilježen 2006 (Monti i sur. 2007). U Sredozemnom moru je toksičnost dokazana jedino za vrste roda *Ostreopsis*, dok za vrstu *Coolia monotis* koja se često pojavljuje uz *Ostreopsis* nije zabilježena toksičnost (Aligizaki i Nikolaidis 2006). Cvjetanje roda *Ostreopsis* povezuje se sa respiratornim problemima i iritacijom kože kod čovjeka te masovnim ugibanjem beskralježnjaka, dok se u tropskom području može pronaći zajedno sa rodovima *Gambierdiscus*, *Coolia* i *Prorocentrum* koji uzrokuju CFP (Monti i sur. 2007). U području Mediterana i Jadranskog mora veća brojnost se može pronaći tijekom toplijeg razdoblja. Veća koncentracija stanica se javlja sredinom ljeta (krajem srpnja) u sjeverno-zapadnom djelu Mediteranskog mora, dok se u sjevernom djelu Jadranskog mora javlja u ranu jesen (krajem rujna) (Mangialajo i sur. 2011). Na stanice u vodenom stupcu direktno utječe hidrodinamika (valovi, brodski promet), ljudska aktivnost (gaženje) posebno u vrijeme turističke sezone te vertikalna migracija. Neka su područja sklonija razvoju roda *Ostreopsis* od drugih iako su opća obilježja mjesta (npr. tip stijena, struktura obale, zajednica makroalgi, valovi) usporediva (Mangialajo i sur. 2011). Kod roda *Ostreopsis* možemo pronaći toksine palitoksin, i ovatoksin (Slika 3, Tablica 1) (Tichadou i sur. 2010).



Slika 3. Kemijska struktura palitoksina.

Tablica 1. Molekularna formula (M) palitoksina i ovatoksina.

Toksin	M	A polovica	B polovica	[M+2H-H ₂ O] ²⁺	[M+2H+K] ³⁺
Palitoksin	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₄	C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₆	C ₁₁₃ H ₁₉₅ NO ₄₈	1331.7436	906.8167
Ovatoksin-a	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂	C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₆	C ₁₁₃ H ₁₉₅ NO ₄₆	1315.7498	896.1572
Ovatoksin-b	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₃	C ₁₈ H ₃₂ N ₂ O ₇	C ₁₁₃ H ₁₉₅ NO ₄₆	1337.7623	910.8318
Ovatoksin-c	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₄	C ₁₈ H ₃₂ N ₂ O ₇	C ₁₁₃ H ₁₉₅ NO ₄₇	1345.7584	916.1628
Ovatoksin-d	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃	C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₆	C ₁₁₃ H ₁₉₅ NO ₄₇	1323.7456	901.4884
Ovatoksin-e	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃	C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₇	C ₁₁₃ H ₁₉₅ NO ₄₆	1323.7456	901.4884

Palitoksin je jedan od najtoksičnijih prirodnih spojeva koji se akumulira kroz hranidbeni lanac. Prvi put je pronađen u tropskom koralju roda *Palythoa* ali se smatra da izvorno potječe od roda *Ostreopsis* (Aligizaki i sur. 2008). Toksičan je za sisavce u većim koncentracijama prilikom akumulacije kroz hranidbeni lanac, ali toksičnost nije dokazana za niže morske organizme iako je pronađen u raznim ribama i ostalim morskim beskralježnjacima (Aligizaki i sur. 2008). U Sredozemlju su pronađene vrste *Ostreopsis ovata* i *O. siamensis* te je za obje vrste dokazano da proizvode palitoksin (Penna i sur. 2005; Rhodes 2011). Nisu zabilježena trovanja ljudi tim toksinom, ali je pronađen akumuliran u dagnjama i ježincima u blizini područja cvjetanja roda *Ostreopsis* prilikom istraživanja provedenih u Grčkoj (Tichadou i sur. 2010). U talijanskim vodama problemi vezani uz cvjetanje roda *Ostreopsis* su vrlo česti te uzrokuju velike probleme, a prvi dokazi o prisustvu roda *Ostreopsis* u Hrvatskim vodama možemo pronaći u radu Monti i sur. (2007). Najpoznatiji slučajevi intoksikacije bili su u Italiji 2001 i 2005 te u Španjolskoj 2004 i 2006 kada je svaki put bilo prijavljeno više od 200 ljudi svaki put od plivača, šetača do lokalnog stanovništva (Brescianini i sur. 2006; Barroso García i sur. 2008; Mangialajo i sur. 2011). U Italiji su zabilježeni problemi obojenja vode duž obala Toskane (Sjeverno Tirensko more), zatim respiratorni problemi, konjuktivitis te groznica kod ljudi koji su se kupali na području gdje je trajalo cvjetanje roda *Ostreopsis*. 18. srpnja 2005 godine više od 100 ljudi se prijavilo u bolnice zbog respiratornih problema, groznice i visoke koncentracije bijelih krvnih stanica nakon sunčanja ili kupanja u gradu Genovi (Ligurija, Sjeverno Tirensko more) za vrijeme cvjetanja vrste *Ostreopsis ovata* (Zingone i sur. 2006).

2. CILJ RADA

Ovo istraživanje je bilo potaknuto slučajnim pronalaskom dinoflagelata iz roda *Ostreopsis* na makrofitskoj smeđoj algi *Cystoseira* sp. na lokaciji sjeverno od Rovinja. Cilj ovog istraživanja je da prikazemo prisutnost potencijalno toksičnih dinoflagelata uz Istarsku obalu Jadranskog mora. Pratili smo cvjetanje vrsta roda *Ostreopsis* i vrste *Coolia monotis*. Svakodnevno smo uzimali uzorke, te pratili raspone temperature, saliniteta, vremenske uvjete te promjene staništa na kojem smo provodili istraživanje. Pratili smo brojnost stanica u stupcu vode te stanica na makroalgi *Cystoseira crinita* Duby kako bismo mogli prikazati utjecaj okolišnih čimbenika na rasprostranjenost stanica. Sve to nam je bilo potrebno kako bismo bolje upoznali ekologiju roda *Ostreopsis*, dokazali prisutnost toksina te uočili kakve posljedice ostavlja na okoliš i čovjeka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Istraživano područje

Istraživanje smo proveli na području sjevernog Jadrana na javnoj plaži Borik sjeverno od Rovinja (45°6.018N – 13°37.704E). Stanište predstavlja stjenovit litoral sa šljunkovitom podlogom, koji čini odličnu podlogu za razvoj makroalga. Na tom području prevladava populacija smeđe makroalge *Cystoseira crinita*. Nakon dubine od 5m stanište prelazi u pjeskovito područje te populaciju zamjenjuje morska cvjetica *Zostera* sp. L. (1753.)

3.2. Uzorkovanje i analiza

Uzorci makroalge *Cystoseira crinita* i sedimenta su pažljivo skupljeni ronjenjem na dah pomoću maske i dihalice na dubini između 1 do 4 m oko podne. Uzorkovali smo po 3 uzorka makroalge *C. crinita* svaki dan u razdoblju od 22. rujna 2010. do 27. listopada 2010. te po jedan uzorak okolne vode.

Roneći na dah pažljivo smo uzeli uzorak alge *C. crinita* i smjestili je u plastičnu bocu volumena 1 l zaštićenu od prodiranja svjetlosti pazeći kako ne bismo uzorak prilikom smještanja u bocu protresli kako bismo spriječili epifitske alge od otpuštanja s makrofitama. Također smo uzeli po jedan uzorak okolne vode kojim smo napunili plastičnu bocu volumena 1.5 l na dubini od 1.5 m.

Uzorke smo u najkraćem roku prenijeli do Centra za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković, Rovinj gdje smo nastavili s fiksacijom uzorka. Svaki uzorak smo jako protresli 10-tak sekundi kako bi se epifitske mikroalge odvojile od svoje podloge koju je činila *C. crinita* te kako bi se također odvojili od ruba boce za koji su se mogli pričvrstiti prilikom transporta do laboratorija. Prije fiksiranja protresli smo i bocu u kojoj se nalazila okolna voda. Odvojili smo po 250 ml morske vode i fiksirali je s 5 ml 36% formalina da bismo dobili finalnu koncentraciju od 4% formalina u vodi (Kemika, Ltd., Zagreb, Hrvatska. 36% otopina). Bocu fiksiranog uzorka smo homogenizirali laganim miješanjem te stavili sedimentirati u komorice

od 10 ml po 3 poduzorka za svaki uzorak vode sa *Cystoseirom* te jedan uzorak od 50 ml za okolnu vodu. Uzorke smo ostavili sedimentirati 24 h te smo ih nakon toga prebrojali pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa Invertoskop D (Zeiss, Oberkochen, Njemačka) koristeći Utermöhl metodu (Utermöhl 1958). Brojali smo područje od 14.3 mm² sve dok nismo prebrojali barem 100 stanica roda *Ostreopsis* ili *Coolia*. Brojanje smo ponavljali sve dok se prosjek stanica više nije mijenjao.

Nakon što smo izvadili *C. crinitu* iz uzorka morske vode odnijeli smo je na vaganje te izvagali njenu mokru težinu pomoću vage Sartorius L420D (Sartorius AG, Goettingen, Njemačka). Postupak smo ponavljali svaki dan u razdoblju uzorkovanja.

Fiksirani uzorci u formalinu obojeni su kalkofluorom (Sigma- Aldrich Chemie GmbH Buchs, Švicarska) u skladu s uputama proizvođača. Te su zatim analizirani na Zeiss Axioimager fluorescencijskom mikroskopu.

Svaki dan u razdoblju od 28. rujna 2010. do 7. listopada 2010. kada su zabilježene visoke koncentracije *Ostreopsis ovata* u vodi te svaki drugi dan u razdoblju od 15. listopada 2010 do 19. listopada 2010. pred kraj cvjetanja, upotrijebili smo 300 ili 600 ml okolne morske vode nakon mućkanja iz uzorka gdje se nalazila *C. crinita* te smo je filtrirali kroz stakleni filter promjera pora 0.22 µm. Te smo filtre s talogom prenijeli u 60% otopinu metanola (Kemika) i vode i pohranili ih na -20°C do slanja na daljnju analizu. Za otkrivanje prisutnosti palitoksina i ovatoksina primijenjena je metoda tekuće kromatografije (eng. HR LC-MS High resolution Liquid chromatography - mass spectrometry) na Zavodu za kemiju prirodnih uzoraka, Sveučilišta u Napulju Federico II, Via Domenico Montesano 49, 80131, Napulj, Italija.

Također smo svakodnevno mjerili salinitet i temperaturu *in situ* na dubini uzorkovanog područja pomoću ručne sonde Multiline F Set-3 (WTW, Weinheim, Njemačka). Dok nam je meteorološke i hidrometeorološke podatke ljubazno omogućio Hrvatski meteorološki zavod.

3.3. Izolacija i postavljanje kultura

Živi uzorak smo stavili u komoricu i mikropipetom smo izolirali po jednu stanicu rodova *Ostreopsis* ili *Coolia* ispod invertnog mikroskopa te započeli monoklonalne kulture. Kulture smo smjestili uz prozor na zaštićenom mjestu od sunca na sobnoj temperaturi (20° C) te ih

tamo držali do idućeg pročišćavanja sve dok nismo dobili čiste kulture koje su nam poslužile za daljnje analize.

4. REZULTATI

U ovom radu istraživali smo cvjetanje dinoflagelata roda *Ostreopsis*. Istraživanje smo proveli na stjenovitom litoralnom području na javnoj plaži sjeverno od Rovinja. Plaža se nalazi u otvorenoj uvali koja je izložena jakom utjecaju valova (Slika 6). Uzorkovali smo na plitkom stjenovitom području. Od 0 do 2 m dubine podlogu čini stjenovito dno (vapnenačke stijene) gusto prekriveno makroalgom *Cistoseira crinita* te drugim manjim makrofitima (Slika 7). Ovo područje se protezalo oko 40 m od obale. U kasnijim dubljim područjima pronašli smo pjeskovito dno prekriveno morskom cvjetnicom *Zostera* sp. Naši uzorci su sakupljeni na prosječno 1 m ispod linije oseke (eulitoral). Na makroalgi *C. crinita* smo pronašli dinoflagelate roda *Ostreopsis*, što se često moglo zamijetiti i golim okom često u obliku gustog biofilma (Slika 8, Slika 9).

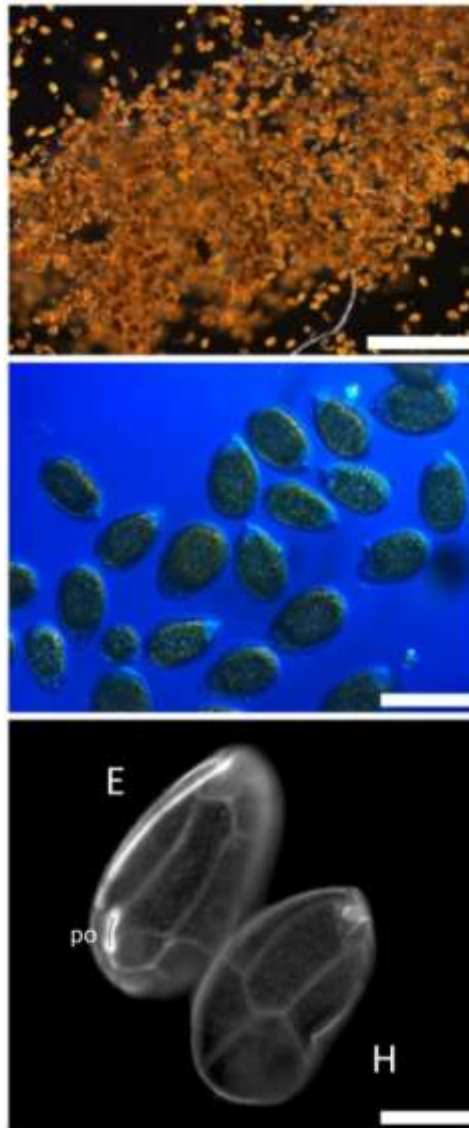


Slika 6. Stanište; A=lijeva strana obale; B, C=prema otvorenom moru; D=desna strana obale.



Slika 7. Stanište na kojem prevladava *Cistoseira crinita*.

Pratili smo cvjetanje vrsta *Ostreopsis siemensis* i *O. ovata* te vrste *Coolia monotis*. Dominantna vrsta je bila *Ostreopsis ovata* (Slika 8) dok su ostale vrste zastupljene s manje od 10% u ukupnoj brojnosti. U uzorcima koje smo prebrojavali uz *Ostreopsis* i *Coolia monotis* pronašli smo i dijatomeje koje su bile zastupljene oko 1%. Oko 16. listopada 2010 se promijenila zastupljenost vrsta, jer je tada već bio kraj cvjetanja te su dominantnost preuzele dijatomeje. Među dijatomejama je pronađen rod *Actinocyclus* C. G. Ehrenberg 1837.



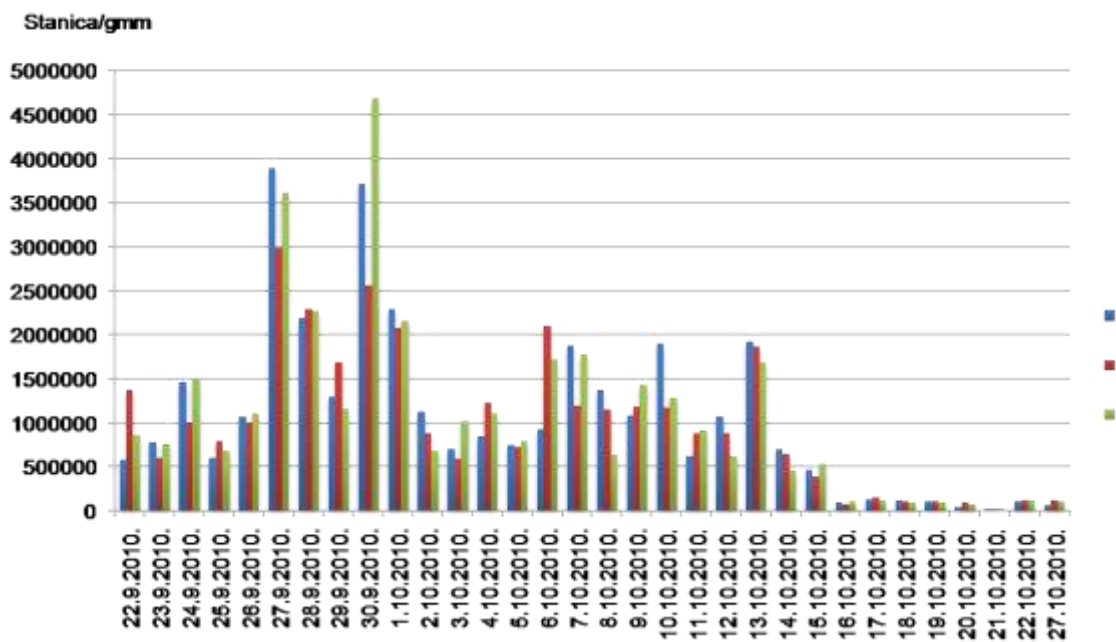
Slika 8. *Ostreopsis ovata* biofilm (A); DIC (Differential interference contrast) *Ostreopsis ovata* biofilm (B); Obojenje kalkofluorom da bi se naglasila karakteristična struktura ploča *Ostreopsis ovata* (C), E=epiteka, H=hipoteka. Skala je 5 μm .

Razdoblje istraživanja je trajalo od 22. rujna 2010. do 27. listopada 2010. Uzorkovali smo po 3 uzorka svaki dan (Slike 10 - 12), osim 22. rujna 2010. kada smo uzorkovali samo jedan uzorak (Slika 10). Slike 10-12 prikazuju grafički prikaz za točnost brojanja roda *Ostreopsis*. Prvo uzorkovanje je bilo 22. rujna 2010. kada smo pronašli u prosjeku 20 981 stanica/gmm (stanica po gramu mokre mase makroalge) *Ostreopsis* sp. Dok je zadnje uzorkovanje bilo 27. listopada 2010. kada smo pronašli u prosjeku 4 385 stanica/gmm (Slika 13). Od svakog uzorka smo koristili po 3 poduzorka kako bismo mogli što točnije odrediti brojnost vrsta u uzorku.

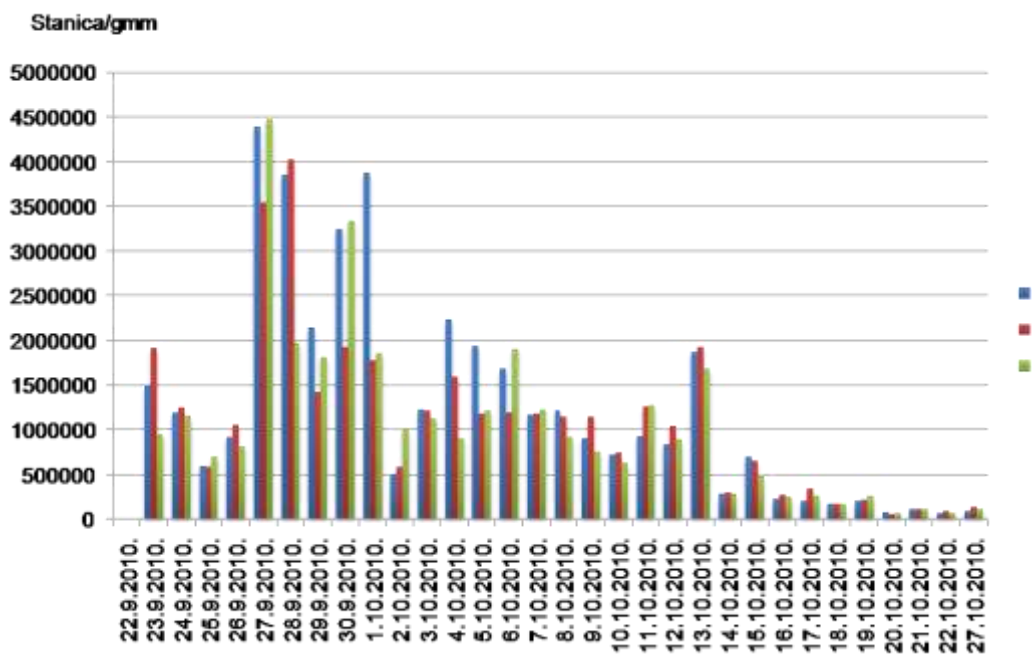


Slika 9. Biofilm *Ostreopsis* sp. na makroalgi *Cystoseira crinita*; strelica pokazuje gusti biofilm *Ostreopsis* sp..

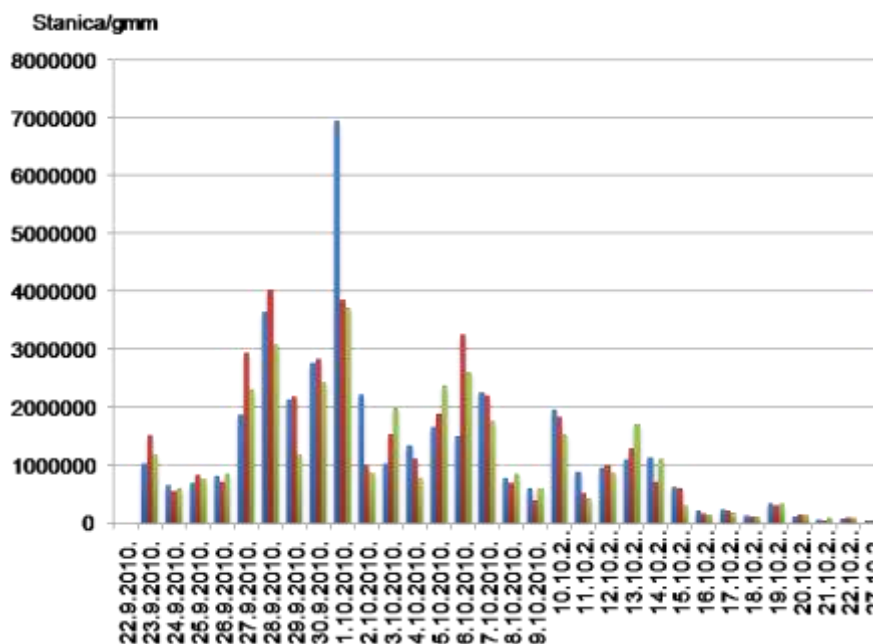
Iz grafova možemo vidjeti da se rezultati tri poduzorka poprilično poklapaju (Slika 13). Razlike u rezultatima pojedinih uzoraka pokazuju da se stanice roda *Ostreopsis* ne prihvaćaju ravnomjerno na svaku makroalgu. To je prikazano na grafu gdje nam standardne devijacije prikazuju pogrešku prilikom uzimanja srednje vrijednosti od sva tri uzorka, što se posebno može primijetiti na grafu za datume 3., 6. i 13. listopada 2010. kratko vrijeme nakon razdoblja kada su vremenski uvjeti bili nepovoljni. (Slike 13 - 15). Primijetili smo da *Ostreopsis* stvara više biofilma na makroalgi ako je habitus alge razgranatiji (Slika 9).



Slika 10. Brojnosti stanica/gmm u uzorku 1 s poduzorcima 1 (plavo), 2 (crveno) i 3 (zeleno).



Slika 11. Brojnosti stanica/gmm u uzorku 2 s poduzorcima 1 (plavo), 2 (crveno) i 3 (zeleno).

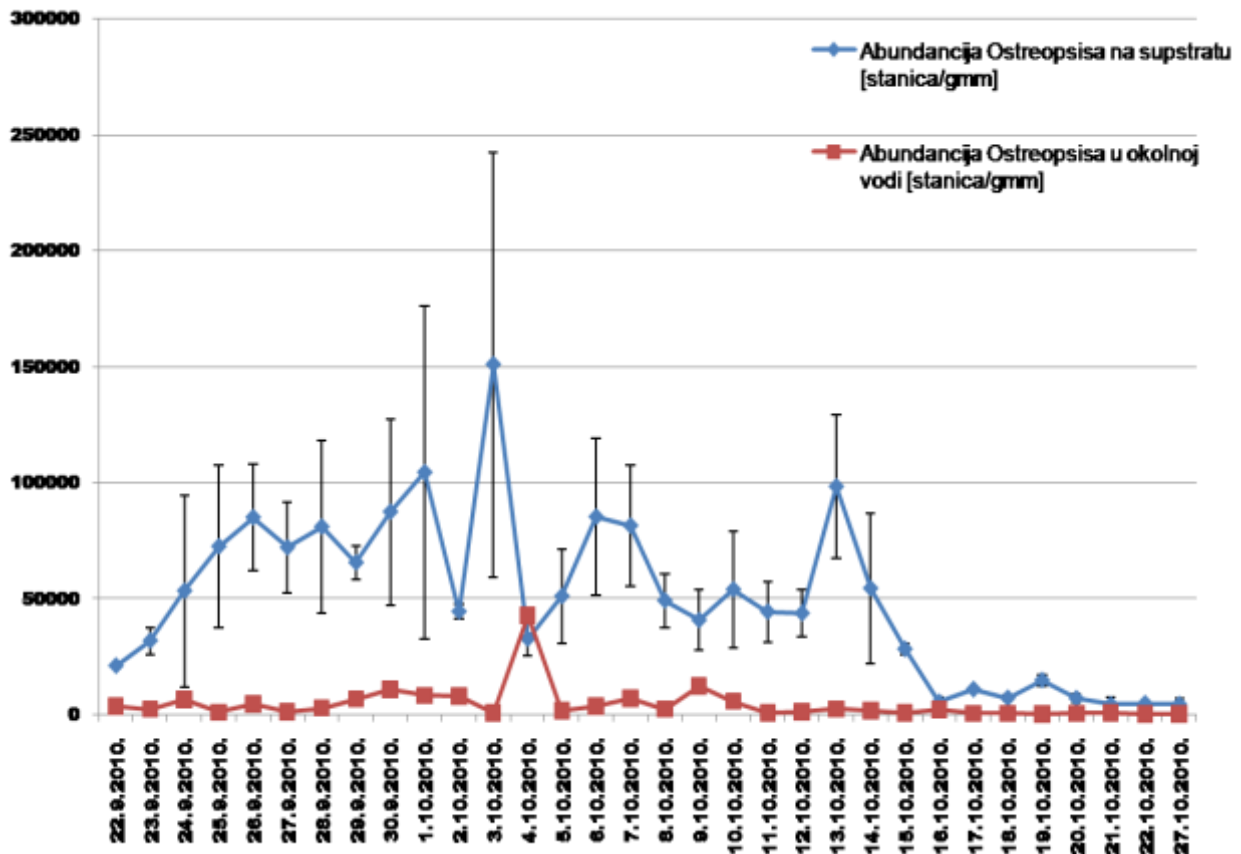


Slika 12. Brojnosti stanica/gmm u uzorku 3 s poduzorcima

1 (plavo), 2 (crveno) i 3 (zeleno).

Od 22. rujna 2010. koncentracija stanica roda *Ostreopsis* je znatno rasla do 26. rujna 2010. kada smo pronašli u prosjeku 84 967 stanica/gmm (Slika 13) dok je najveća zabilježena vrijednost tog dana bila 119 494 stanica/gmm (Slika 15). U tom su periodu vremenski uvjeti bili malo nestabilniji (Slika 14), more je bilo valovito te je broj stanica u uzorcima sa supstrata koje smo prikupili neznatno pao što možemo povezati sa otpuštanjem stanica *Ostreopsis* sp. s makroalge *C. crinita*. Također možemo primijetiti kako se koncentracija roda *Ostreopsis* u uzorcima okolne morske vode povećala. Vremenski uvjeti su se smirili te je broj stanica u uzorcima nastavio rasti. Najveća zabilježena koncentracija je bila 3. listopada 2010. od 334 305 stanica/gmm kada je cvjetanje postiglo svoj maksimum (Slika 13). Dana 4. listopada 2010. puhalo je jako jugo sa valovima visine 1 m popraćeno jakom kišom, te je drastično pao broj stanica u uzorcima do 32 602 stanica/gmm što možemo vidjeti na grafu (Slika 14, Slika 15). U uzorcima okolne vode se broj stanica znatno povećao na 42 600 stanica/gmm. Vremenski uvjeti su se idućih dana ustabilili te je i broj stanica u uzorcima počeo ponovo rasti. 13. listopada 2010. je bio treći maksimum sa 134 665 stanica/gmm. 12. listopada 2010. je temperatura pala ispod 20°C što je utjecalo na kraj cvjetanja. U poslijepodnevnom satima 13. listopada 2010. vremenski uvjeti su se pogoršali popraćeni jakim vjetrom, valovima nešto manjim od 1m te olujom. Nakon toga je drastično pao broj stanica, te smo proglasili kraj cvjetanja 17. listopada 2010. Nastavili smo pratiti koncentraciju stanica u uzorcima sve do

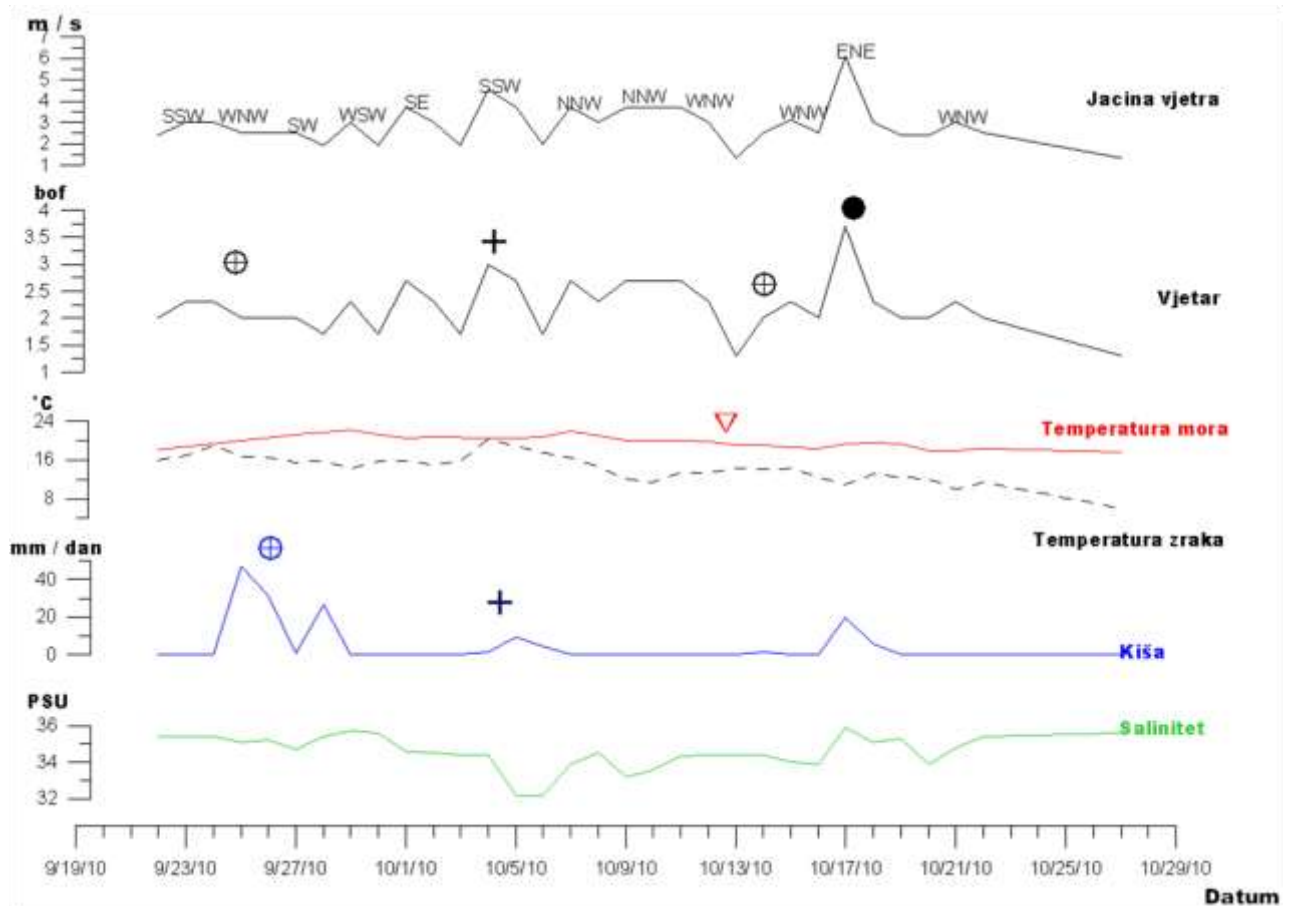
studenog 2010. te smo primijetili da se broj stanica nije povećao. Nakon oborina smo primijetili pad saliniteta, ali se vrijednost uglavnom kretala oko 35.0 psu (Slika 14).



Slika 13. Grafički prikaz srednjih vrijednosti brojnosti *Ostreopsis* sp. na supstratu i u okolnoj vodi.

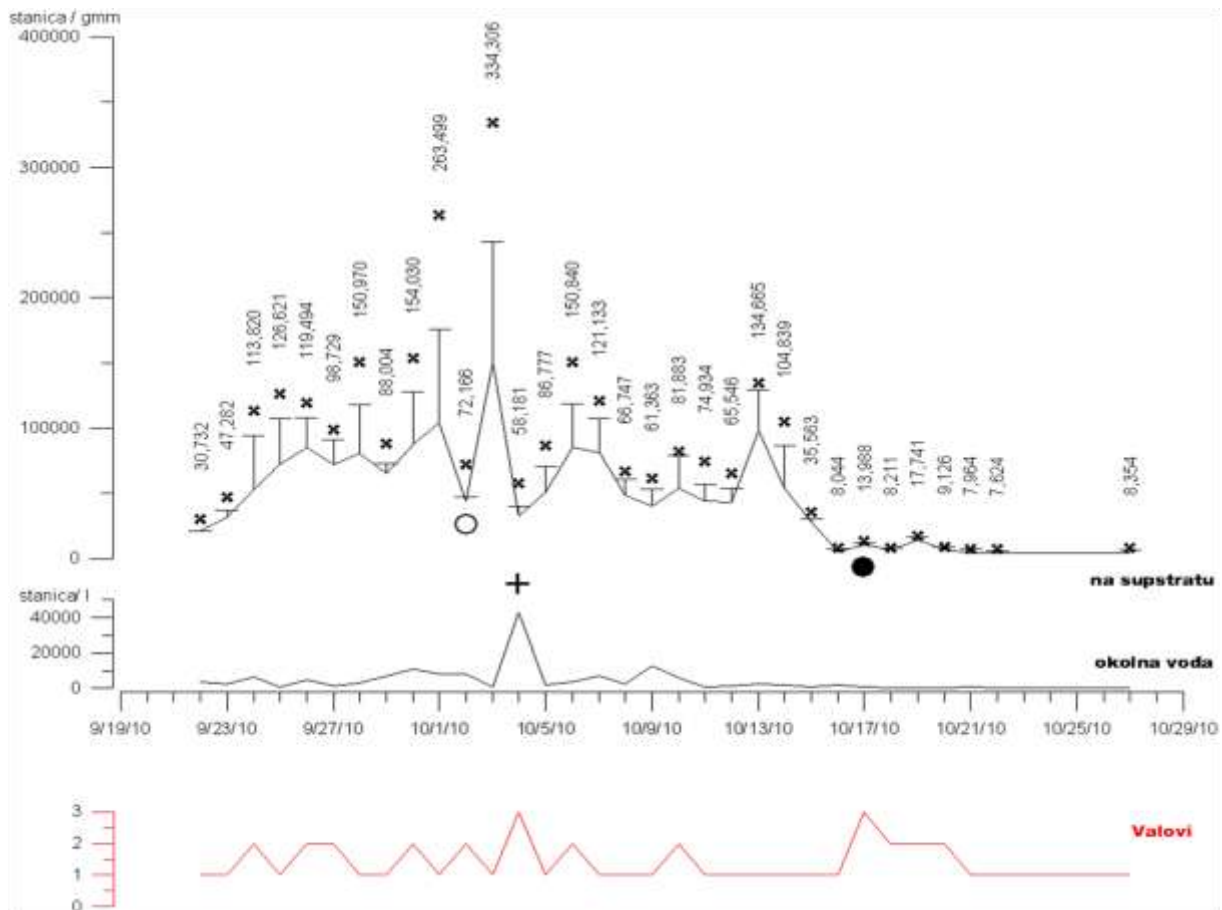
Na grafičkom prikazu odnosa između korelacije stanica u vodenom stupcu i broja stanica/ g mokre mase na *C. crinita* (Slika 16) vidimo da distribucija stanica u vodenom stupcu i na substratu nije uvijek ista.

Slika 17 prikazuje grafički prikaz rezultata analize HR LC-MS metode za otkrivanje prisutnosti palitoksina i ovatoksina (a-e). Praćena je koncentracija toksina za vrijeme maksimuma cvjetanja te pred kraj cvjetanja. U razdoblju kada je cvjetanje postiglo maksimum možemo primijetiti da je koncentracija toksina bila poprilično konstantna, a pred kraj cvjetanja posebno na dan 19. listopada 2010. koncentracija je bila izrazito visoka.

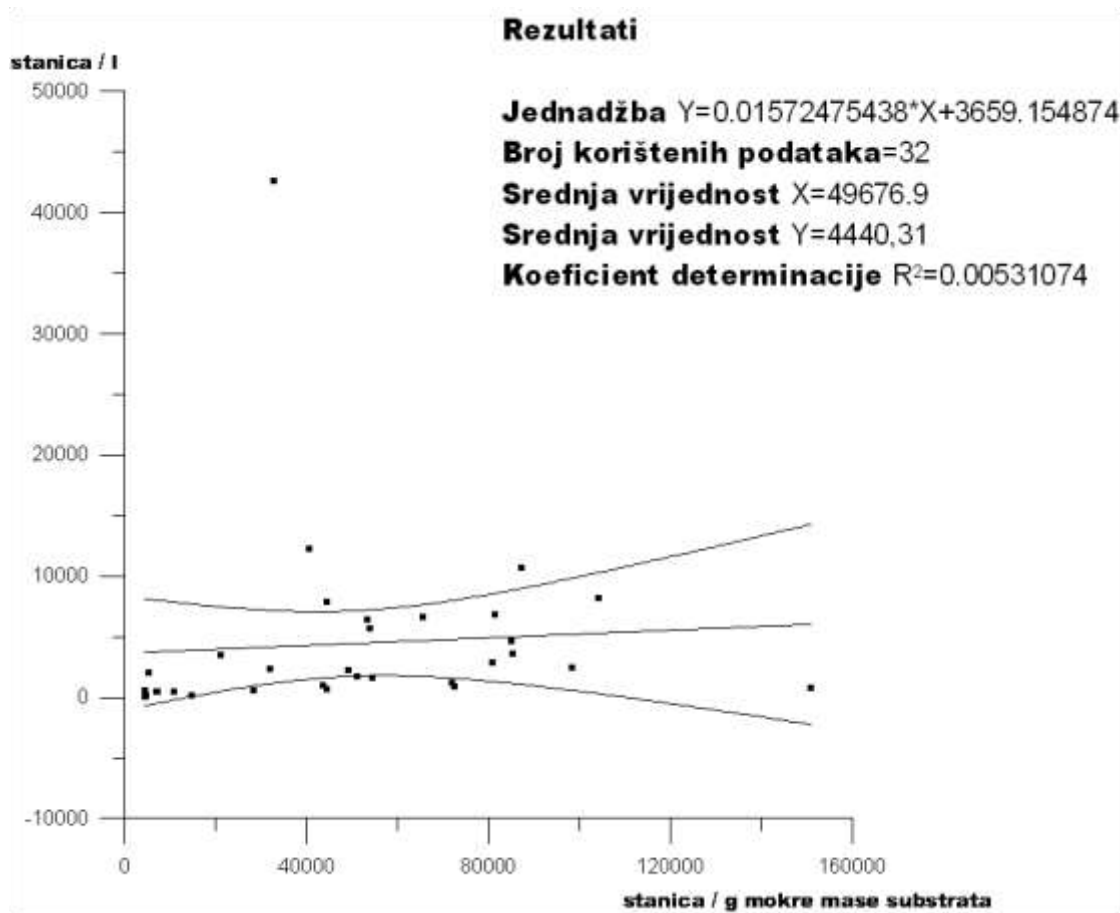


Slika 14. Prikaz okolišnih uvjeta; krug s križem u sredini prikazuje nestabilne vremenske uvjete, križ predstavlja jaki jugo popraćen jakom kišom; trokut prema dolje prikazuje pad temperature. Ispunjeni krug prikazuje dan sa zadnjom olujom.

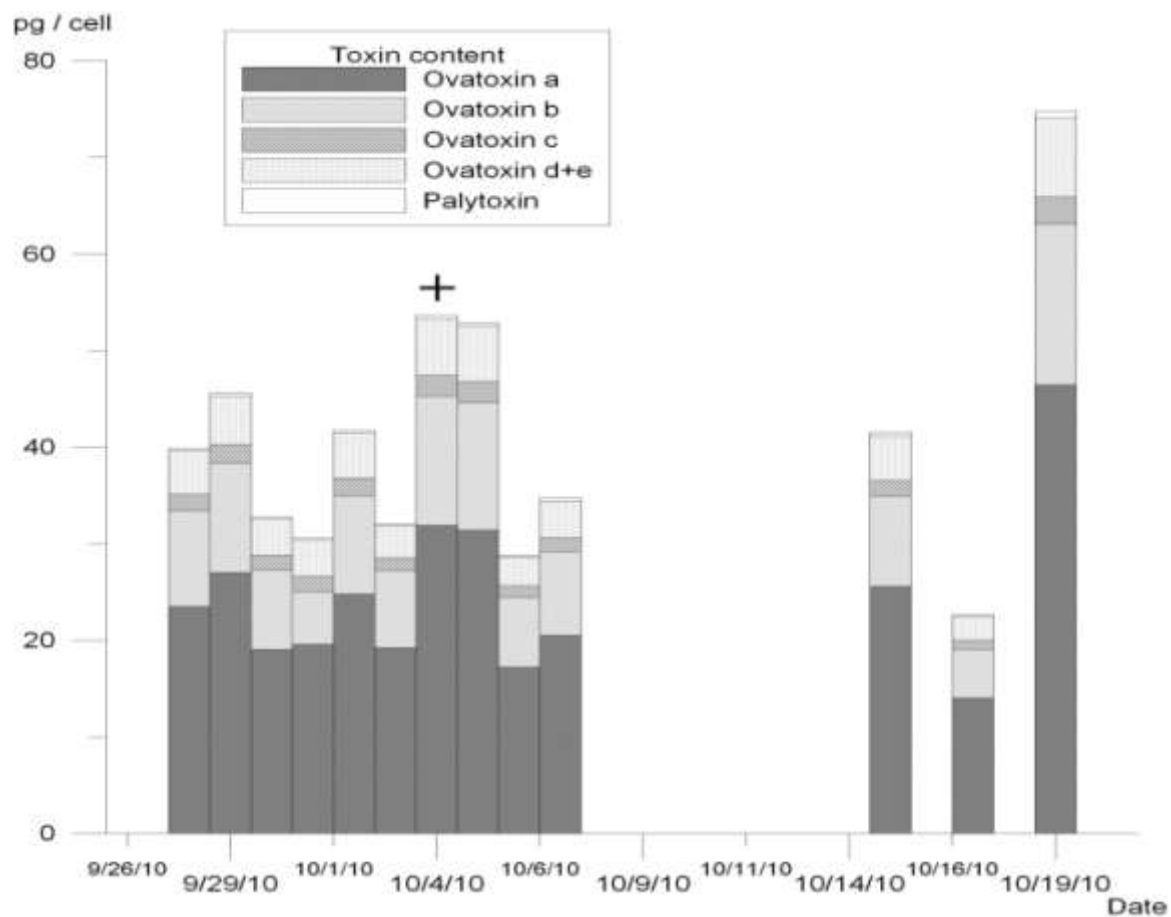
Također smo prilikom vađenja uzoraka primijetili da *Ostreopsis* stvara smeđi biofilm na makroalgama *C. crinita* te na stijenama i većem kamenju dok se na šljunku ne zadržava (Slika 18). Za vrijeme nepovoljnih vremenskih uvjeta biofilm je bio izraženiji na razgranatijim habitusima *C. crinita* posebno za vrijeme maksimuma dok je na osamljenim makroalgama sa siromašnim habitusom te krupnijem kamenju i sedimentu nestajao. Za vrijeme nepovoljnih vremenskih uvjeta uočili smo nakupine biofilma kako plutaju po površini (Slika 19). Plutanje po površini je bilo posebno izraženo 1. listopada 2010. kada su naslage biofilma bile dugačke i do 15 cm. Ubrzo nakon što su se vremenski uvjeti smirili biofilm se obnovio na sedimentu. Također smo pratili razvoj u kulturama te smo uočili kako stanice roda *Ostreopsis* stvaraju sluzavu tvar prilikom razmnožavanja *in vivo* stvarajući gusti biofilm (Slika 8). Stanice se ne drže samo dna posude u kojoj je kultura rasla već stvaranjem sluzave tvari plutaju.



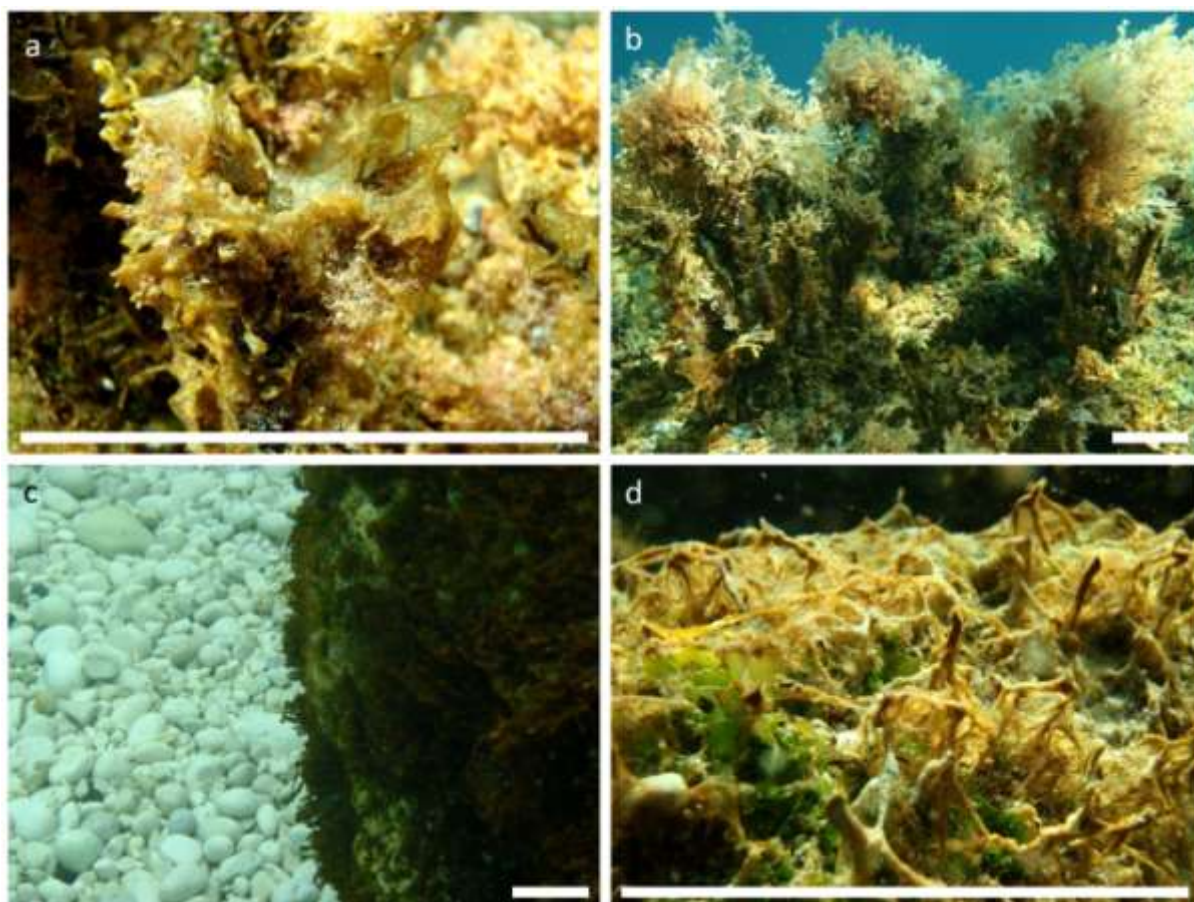
Slika 15. Prosječna brojnost *Ostreopsis* sp. (3 uzorka sa 3 poduzorka svaki) na supstratu *Cystoseira crinita* i u okolnoj vodi, te visina valova. Stupci pogrešaka prikazuju standardne devijacije, mali križevi i brojevi prikazuju najvišu dosegnutu brojnost u uzorcima. Veliki križ prikazuje dan kada je bio najveći utjecaj valova. Ispunjeni krug prikazuje dan sa zadnjom olujom i krajem cvjetanja. Prazni krug prikazuje razdoblje sa slabijim utjecajem valova i vjetra kada je došlo do odvajanja stanica od podloge i kada su se pojavile plutajuće nakupine na površini vode.



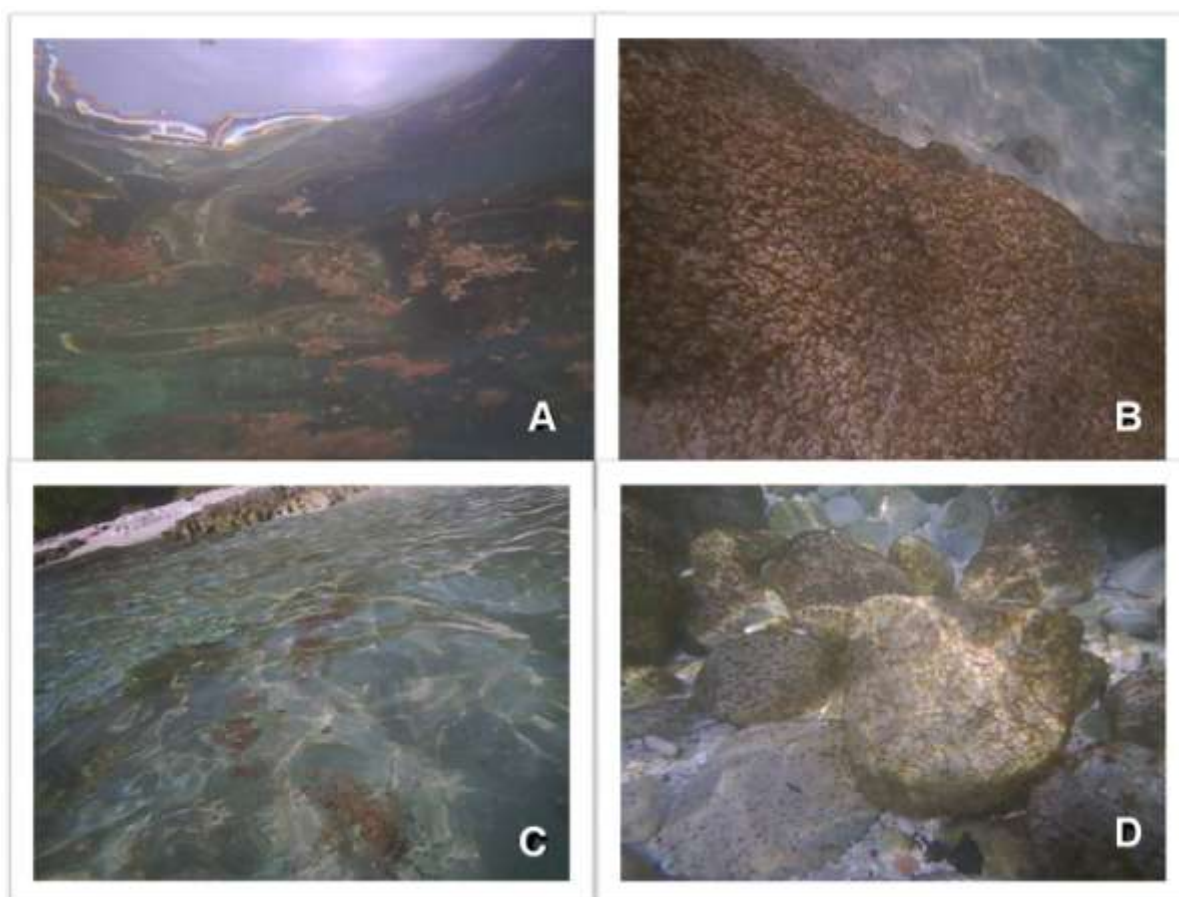
Slika 16. Grafički prikaz odnosa između korelacije broja stanica u vodenom stupcu (X os) i broja stanica/ g mokre mase na *Cistoseira crinita* (Y os).



Slika 17. Sadržaj toksina izražen u piko gramima (pg) po stanici na osnovi 5950 g *C. crinita* po m². Različiti toksini su prikazani različitim nijansama sive boje. Križ prikazuje dan kada je bio najveći utjecaj valova.



Slika 18. Biofilm *Ostreopsis* sp. na *Cystoseira crinita* (a,b,d) i većem kamenju (c) dok se na šljunku (c) ne vidi biofilm. Na svakoj slici skala je 5 cm.



Slika 19. Biofilm *Ostreopsis pluta* na površini vode (A,C); biofilm istaložen na sedimentu.

5. RASPRAVA

Glavni cilj ovog rada je bio upoznati dinamiku cvjetanja dinoflagelata roda *Ostreopsis* te dokazati prisutnost toksina. Istraživanje roda *Ostreopsis* je važno jer spada u toksične epifitske dinoflagelate, što smo i dokazali u ovom radu. To je kozmopolitski rasprostranjen rod kojeg nalazimo u obalnom području tropskih do umjerenih voda. Njegova rasprostranjenost je svakim danom sve veća, a toksične vrste su zabilježene u svim područjima gdje je rod pronađen. Do sada je prisutnost roda *Ostreopsis* dokazana u vodama Australije i Tihog oceana, Istočne i Jugoistočne Azije, Afrike i Indijskog oceana, Atlantskog oceana te na području Mediterana (Penna i sur. 2005; Aligizaki i Nikolaidis 2006; Brescianini i sur. 2006; Ciminiello i sur. 2006; Monti i sur. 2007; Barroso García i sur. 2008; Ciminiello i sur. 2008; Mangialajo i sur. 2008; Tichadou i sur. 2010; Totti i sur. 2010; Ungano i sur. 2010; Mangialajo i sur. 2011; Rhodes 2011). U Jadranskom moru zabilježena je prisutnost dvije vrste *Ostreopsis siamensis* i *Ostreopsis ovata* (Penna i sur. 2005; Monti i sur. 2007) koje smo potvrdili i tijekom ovog istraživanja.

Dosadašnja su istraživanja vršena sakupljanjem uzoraka jednom do nekoliko puta mjesečno, te uzorkovanjem na različitim postajama ili pak istraživanjima kultura stanica vrsta iz roda *Ostreopsis* (Penna i sur. 2005; Aligizaki i Nikolaidis 2006; Monti i sur. 2007; Mangialajo i sur. 2008; Guerrini i sur. 2010). Ovo istraživanje je važno jer je svakodnevno praćena dinamika cvjetanja stanica roda *Ostreopsis* u razdoblju od 22. rujna 2010. do 27. listopada 2010. na jednom staništu, te je dokazano kako okolišni čimbenici utječu na dinamiku cvjetanja *in situ*. Ovo istraživanje je provedeno na stjenovitom litoralnom području, otvorenoj uvali sjeverno od Rovinja koja je izložena utjecaju valova. *Ostreopsis* je pronađen prihvaćen na makroalgi *Cystoseira crinita* te također na manjim makroalgama koje rastu na većem kamenju, dok na manjem kamenju te šljunku na kojem se obraštaj nije nalazio nismo pronašli *Ostreopsis* (Slika 18). *Ostreopsis* spada u epifitske alge te mu je potrebno stabilnije stanište gdje bi se mogao prihvatiti, jer prilikom nepovoljnijih vremenskih uvjeta te jakog utjecaja valova dolazi do odvajanja stanica od substrata. *C. crinita* predstavlja dovoljno stabilnu podlogu za prihvata epifitskih mikroalga roda *Ostreopsis*, a također je i dovoljno elastična da se odupre jakoj energiji koju uzrokuju valovi u plićem području te tako sprječava da se biofilm roda *Ostreopsis* zbog utjecaja valova odvoji od podloge.

Slike 10 - 12 prikazuju grafički prikaz brojnosti stanica/gmm u uzorcima s poduzorcima te vidimo da se rezultati za svaki poduzorak preklapaju, što nam pokazuje da su uzorci bili homogenog sastava. Slike 13 i 15 prikazuju grafički prikaz srednje vrijednosti brojnosti roda *Ostreopsis* na supstratu i u okolnoj vodi te možemo vidjeti da se stanice roda *Ostreopsis* ne prihvaćaju ravnomjerno na svaku makroalgu. Nakon razdoblja nepovoljnih vremenskih uvjeta popraćenih visokim valovima uzorci na makroalgama su imali različit broj stanica. Standardne devijacije na grafičkom prikazu (Slike 13 i 15) nam prikazuju pogrešku prilikom uzimanja srednje vrijednosti od sva tri uzorka, što se posebno može primijetiti na slici 15 kratko vrijeme nakon razdoblja kada su vremenski uvjeti bili nepovoljni. Ako su standardne devijacije prikazane s većim rasponom znači da su se stanice nejednoliko rasporedile na pojedine makroalge koje smo koristili u uzorcima. Na to također utječe i mjesto na kojem smo uzorkovali. Ako je mjesto uzorkovanja bilo bliže i broj stanica u tim uzorcima je sličniji pa su također i standardne devijacije manje. Primijetili smo da *Ostreopsis* ima mogućnost stvaranja više biofilma na makroalgi ako je habitus alge razgranatiji, čime se stanice teže odvoje od supstrata prilikom utjecaja jakih valova (Slike 9 i 18). Ako je habitus makroalge elastičniji prilikom jakih strujanja vode lakše se savija te tako sluzavi biofilm roda *Ostreopsis* ostaje više pričvršćen za makroalgu, različito od makroalgi s krutijim habitusom. Primijećeno je izrazitije lučenje sluzave tvari biofilma za lošeg vremena i jakih valova kao obrana od odvajanja sa supstrata. Dok smo uspoređivali biofilm roda *Ostreopsis* na većem i manjem kamenju primijećeno je da manje kamenje i šljunak, koji su bili bez obraštaja, nisu na sebi imali biofilm roda *Ostreopsis* zbog toga što su pod direktnim utjecajem sile valova i predstavljaju nestabilnu podlogu za prihvatanje stanica roda *Ostreopsis*. Za vrijeme nepovoljnih vremenskih uvjeta stanice roda *Ostreopsis* se otpuštaju s makroalgi te se u slobodnoj vodi može primijetiti veća koncentracija stanica nego inače (Slika 16). Time smo dokazali da je *Ostreopsis* epifitska alga koja obitava pričvršćena na drugim makrofitskim algama i supstratu jer se u slobodnoj vodi nalazi kada je pod utjecajem valova, struja ili gaženjem čovjeka po staništu odvoji od supstrata. Čini se da se sve stanice roda *Ostreopsis* koje se nalaze u stupcu vode nisu uspjele smjestiti na supstrat zbog nestabilnih vremenskih uvjeta te zbog toga nije postignuto maksimalno zasićenje supstrata stanicama roda *Ostreopsis*. Naši rezultati pokazuju da uvijek postoji mali broj stanica *Ostreopsis* u okolnoj vodi, ali taj broj nije u korelaciji sa stanicama pričvršćenim za supstrat. To znači da je manji i veći broj stanica dobro pričvršćen za supstrat, a veći broj stanica na supstratu ne znači da će se automatski veći broj stanica odvojiti sa supstrata prilikom utjecaja valova. Elastična podloga makroalge *C. crinita*

predstavlja bolju podlogu za prihvata biofilma roda *Ostreopsis* od podloge koju su promatrali u radu Mangialajo i sur. 2008.

Za vrijeme nestabilnih uvjeta primijećene su nakupine biofilma duge i do 15 cm na površini vode. Te nakupine predstavljaju povoljan način za rasprostranjivanje na druga područja jer se mogu prihvatiti za plutajuće drveće ili za plastiku te se tako prenositi na veće udaljenosti, gdje ako im okolišni uvjeti budu povoljni mogu ponovo stvoriti novu koloniju (Masó i sur. 2003). Zbog posebnih uvjeta koji vladaju u sjevernom Jadranu te specifičnih strujnih gibanja postoji mogućnost da je na taj način *Ostreopsis* opstao u području Rovinja, posebno ako uzmemo u obzir da su ga ranije već zabilježili Monti i sur. (2007). Osim toga postoji mogućnost da je rod i proširio svoje stanište jer je ranije pronađen nekoliko kilometara južnije.

Iz prethodno spomenutih rezultata primijetili smo da je na kraj cvjetanja utjecala oluja 13. listopada 2010. kada je osim visokih valova i kiše na smanjenje brojnosti roda *Ostreopsis* utjecalo i pad temperature ispod 20°C. U radovima Mangialajo i sur. (2008; 2011) spominju da je temperatura jedan od ključnih faktora u cvjetanju roda *Ostreopsis*, što je bitno naglasiti zbog mogućeg utjecaja globalnog zagrijavanja na rasprostranjenost roda *Ostreopsis*. U radovima Mangialajo i sur. (2008; 2011) je zabilježena visoka koncentracija stanica pri temperaturama višim od 26°C, a na nekim lokalitetima i pri 20°C, ali zbog nedovoljno podataka se ne može vidjeti da li temperatura utječe na kraj cvjetanja što smo mi u ovom radu dokazali.

Primijećeno je da su nakon pada temperature dominantnost preuzele dijatomeje koje su iskoristile nepovoljne uvjete za *Ostreopsis*, a povoljnije uvjete za svoje cvjetanje. Dijatomeje su se prihvatile za supstrat i zauzele prostor na kojem se *Ostreopsis* prethodno prihvaćao te su tako svojom dominantnošću smanjile životni prostor na kojem je *Ostreopsis* obitavao. Uz sve te nepovoljne uvjete došlo do kraja cvjetanja roda *Ostreopsis*.

Grafički prikaz 17 prikazuje rezultate analize HR LC-MS metode za otkrivanje prisutnosti palitoksina i ovatoksina. Ti su rezultati izuzetno važni jer prikazuju *in situ* dinamiku proizvodnje toksina tijekom cvjetanja roda *Ostreopsis*. Rezultati o koncentracijama toksina u stanicama, u do sada objavljenim radovima, dobiveni su istraživanjima provedenim na kulturama stanica roda *Ostreopsis* (Guerrini i sur. 2010). Uz to, ovdje zabilježene koncentracije toksina najviše su do sada. Rezultati prikupljeni ovim istraživanjem stoga ukazuju na veliku važnost praćenja cvjetanja dinoflagelata roda *Ostreopsis* duž cijele obale Jadrana kako bi se spriječio negativan utjecaj na ljudsko zdravlje i trovanje ljudi toksinima.

Rezultati pokazuju da je u razdoblju kada je cvjetanje postiglo maksimum, koncentracija toksina bila poprilično konstantna, a pred kraj cvjetanja posebno na dan 19. listopada 2010. koncentracija je bila izrazito visoka. Pretpostavljamo da je tada lučenje toksina bilo posebno jako zbog pokušaja izbijanja dijatomeja koje su zauzele prostor na kojem se *Ostreopsis* prihvaćao.

Rod *Ostreopsis* spada u toksične dinoflagelate te prilikom cvjetanja ostavlja negativne posljedice na morske organizme i čovjeka (Brescianini i sur. 2006; Ciminiello i sur. 2006; Guerrini i sur. 2010). Prilikom duljeg izlaganja morskom aerosolu u vrijeme rekreativnih i radnih aktivnosti na plaži ili šetnici uz obalu primijećeni su simptomi poput iritacije kože te respiratorni problemi poput kašlja, kihanja te otežanog disanja. Ti su simptomi bili izraženiji prilikom maksimuma cvjetanja roda *Ostreopsis*, dok su nestajali kako se brojnost stanica u morskoj vodi smanjivala.

Što se tiče promjena saliniteta uz sve ostale stresne uvjete nije primijećena uloga tih promjena na tijek cvjetanja roda *Ostreopsis*.

Prilikom rasta roda *Ostreopsis* u kulturama primijetili smo da stanice izlučuju sluzavu tvar kojom se međusobno povezuju u niti te na taj način stvaraju biofilm koji smo primijetili da ga stvaraju na makroalgama. Pomoću tih niti nisu ograničeni samo za podlogu već se mogu međusobno povezani kretati plivajući u slobodnoj vodi a da su istodobno prihvaćeni za podlogu.

6. ZAKLJUČAK

1. Praćenjem dinamike cvjetanja roda *Osteropsis* u sjevernom Jadranu u prirodnim populacijama zabilježena je visoke brojnost među najvećim do sada zabilježenim u literaturi.
2. Analize toksina su pokazale da je proizvodnja toksina tijekom prirodnog cvjetanja bila visoka. Detektirani su toksini palitoksin i ovatoksin. Posebno je značajno da je do sada ovo najviša zabilježena koncentracija toksina u literaturi što ukazuje na veliku važnost praćenja cvjetanja dinoflagelata roda *Ostreopsis* duž cijele obale Jadrana kako bi se spriječio negativan utjecaj na ljudsko zdravlje i trovanje toksinima.
3. Praćenje dinamike cvjetanja ukazalo je na važnost okolišnih čimbenika na razvoj i završetak cvjetanja. Za rasprostranjenost i cvjetanje roda *Ostreopsis* važni su hidrodinamički uvjeti poput vjetra, valova i struja.
4. Ukazujemo na važnost budućih proučavanja mehanizama koji utječu na inicijaciju početka te kraja cvjetanja.
5. Primijećeno je da stanice koje smo promatrali nisu sve striktno epifitske već su nađene i u vodenom stupcu.
6. Primijećen je biofilm na površini vode kako pluta pričvršćen na plastiku i drveće. Time ukazujemo na jednu od mogućnosti kojom se rod *Ostreopsis* može rasprostraniti na veće udaljenosti.
7. Dokazano je da fleksibilnost habitusa makroalge *Cystoseira crinita* predstavlja odličan supstrat za prihvat biofilma roda *Ostreopsis*. Suprotno tome dokazano je da mobilna podloga poput šljunka i manjeg kamenja ne predstavlja pogodnu podlogu za cvjetanje roda *Ostreopsis*. Takva mobilna podloga mogla bi biti jedno od rješenja za sigurnu zaštitu od toksičnih cvjetanja roda *Ostreopsis* za opskrbu plaža koje su namijenjene isključivo u turističke i rekreativne svrhe.

7. LITERATURA

1. Aligizaki, K., P. Katikou, G. Nikolaidis i A. Panou (2008). "First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece)." *Toxicon* 51: 418-427.
2. Aligizaki, K. i G. Nikolaidis (2006). "The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece." *Harmful Algae* 5: 717-730.
3. Barroso García, P., P. R. de la Puerta, T. Parrón Carreño, P. Marín Martínez i J. Guillén Enríquez (2008). "An epidemic outbreak with respiratory symptoms in the province of Almeria [Spain] due to toxic microalgae exposure." *Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición a microalgas tóxicas* 22: 578-584.
4. Bates, S. S., D. L. Garrison i R. A. Horner (1998). Bloom dynamics and physiology of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. D. M. Anderson, A. D. Cembella and G. M. Hallegraeff. Heidelberg, Springer-Verlag: 267–292.
5. Bignami, F., R. Sciarra, S. Carniel i R. Santoleri (2007). "Variability of Adriatic Sea coastal turbid waters from SeaWiFS imagery." *Journal of Geophysical Research* 112: C03S10.
6. Brescianini, C., C. Grillo, N. Melchiorre, R. Bertolotto, A. Ferrari, B. Vivaldi, G. Icardi, L. Gramaccioni, E. Funari i S. Scardala (2006). "*Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006." *Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 11.
7. Cembella, A. D. (2003). "Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems." *Phycologia* 42: 420-447.
8. Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G. S. Magno, L. Tartaglione, C. Grillo i N. Melchiorre (2006). "The Genoa 2005 outbreak.

- Determination of putative palytoxin in mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method." *Analytical Chemistry* 78: 6153-6159.
9. Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, C. Grillo i N. Melchiorre (2008). "Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19: 111-120.
 10. Cushman-Roisin, B., M. Gačić, P. M. Poulain i A. Artegiani (2001). *Physical oceanography of the Adriatic Sea: Past, present and future*. New York, Springer.
 11. Dahl, E., O. Lindahl, E. Paasche i J. Thronsen (1989). The *Chrysochromulina polylepis* bloom in Scandinavian waters. *Novel Phytoplankton Blooms*. E. M. Coper, V. M. Bricelj and E. J. Carpenter. Berlin, Springer-Verlag: 384-405.
 12. Daranas, A. H., M. Norte i J. J. Fernández (2001). "Toxic marine microalgae." *Toxicon* 39: 1101-1132.
 13. Faust, M. A., S. L. Morton i J. P. Quod (1996). "Further sem study of marine dinoflagellates: The genus *Ostreopsis* (Dinophyceae)." *Journal of Phycology* 32: 1053-1065.
 14. Franco, P. i A. Michelato (1992). Northern Adriatic Sea: Oceanography of the basin proper and of the western coastal zone. Marine costal eutrophication. The response of marine transitional systems to human impact: Problems and perspectives for restoration. Bologna, Italy, *Science of the Total Environment*. SUP (2 p. 1/2): 35-62.
 15. Gentien, P. (1998). Bloom dynamics and ecophysiology of the *Gymnodinium mikimotoi* species complex. *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. D. M. Anderson, A. D. Cembella and G. M. Hallegraeff. Berlin, Springer-Verlag: 155-173.
 16. Gjosaeter, J., K. Lekve, N. C. Stenseth, H. P. Leinaas, H. Christie, E. Dahl, D. S. Danielssen, B. Edvardsen, F. Olsgard, E. Oug i E. Paasche (2000). "A long-term perspective on the *Chrysochromulina* bloom on the Norwegian Skagerrak coast 1988: a catastrophe or an innocent incident?" *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 207: 201-218.
 17. Guerrini, F., L. Pezzolesi, A. Feller, M. Riccardi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, E. D. Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino i R. Pistocchi (2010). "Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas." *Toxicon* 55: 211-220.
 18. Hallegraeff, G. M. (1993). "A review of harmful algal blooms and their apparent global increase." *Phycologia* 32: 79-99.

19. Kiryu, Y., J. , W. Shields i Z. D. Vogelbein (2002). "Induction of skin ulcers in Atlantic menhaden by injection and water-borne exposure to the zoospores of *Aphanomyces invadans*." J. Aquat. Anim. Health for All Series 14: 11-24.
20. Kooistra, W. H. C. F., M. K. de Boer, E. G. Vrieling, L. B. Connell i W. W. C. Gieskes (2001). "Variation along ITS markers across strains of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) suggests hybridisation events and recent range expansion." Journal of Sea Research 46: 213-222.
21. Landsberg, J. H. (2002). "The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms." Reviews in Fisheries Science 10: 113-390.
22. Landsberg, J. H. i K. A. Steidinger (1998). A historical review of *Gymnodinium breve* red tides implicated in mass mortalities of the manatee (*Thrichechus manatus latirostris*) in Florida, USA. Harmful Algae. B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández and T. Wyatt. Santiago de Compostela, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: 97-103.
23. Larsen, A. i B. Edvardsen (1998). "Relative ploidy levels in *Prymnesium parvum* and *P. patelliferum* (Haptophyta) analyzed by flow cytometry." Phycologia 37: 412-424.
24. Mangialajo, L., R. Bertolotto, R. Cattaneo-Vietti, M. Chiantore, C. Grillo, R. Lemee, N. Melchiorre, P. Moretto, P. Povero i N. Ruggieri (2008). "The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy." Marine Pollution Bulletin 56: 1209-1214.
25. Mangialajo, L., N. Ganzin, S. Accoroni, V. Asnaghi, A. Blanfuné, M. Cabrini, R. Cattaneo-Vietti, F. Chavanon, M. Chiantore, S. Cohu, E. Costa, D. Fornasaro, H. Grosseil, F. Marco-Miralles, M. Masó, A. Reñé, A. M. Rossi, M. M. Sala, T. Thibaut, C. Totti, M. Vila i R. Lemée (2011). "Trends in *Ostreopsis* proliferation along the northern Mediterranean coasts." Toxicon.
26. Mangoni, O., M. Modigh, P. Mozetic, A. Bergamasco, P. Rivaro i V. Saggiomo (2008). "Structure and photosynthetic properties of phytoplankton assemblages in a highly dynamic system, the Northern Adriatic Sea." Estuarine Coastal and Shelf Science 77: 633–644.
27. Masó, M. i E. Garcés (2006). "Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them." Marine Pollution Bulletin 53: 620-630.
28. Masó, M., E. Garcés, F. Pagès i J. Camp (2003). "Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species." Los plásticos flotantes

- son potenciales vectores de dispersión de especies formadoras de proliferaciones algales nocivas 67: 107-111.
29. Mauri, E. i P.-M. Poulain (2001). "Northern Adriatic Sea surface circulation and temperature/pigment fields in September and October 1997." *Journal of Marine Systems* 29: 51–67.
 30. McMahon, T. i R. Raine (1998). Oceanographic control of harmful phytoplankton blooms around southwestern Ireland. *Harmful Algae*. B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández and T. Wyatt. Santiago de Compostela, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: 128-130.
 31. Monti, M., M. Minocci, A. Beran i L. Iveša (2007). "First record of *Ostreopsis* cfr. *ovata* on macroalgae in the northern Adriatic Sea." *Marine Pollution Bulletin* 54: 598-601.
 32. Montresor, M. i V. Smetacek (2002). The impact of harmful algal blooms in natural and human-modified systems of Northern Europe. *Climate development and history of the North Atlantic realm*. G. Werfer, W. Berger, K.-E. Behre and E. Jansen. Berlin, Springer-Verlag: 457-471.
 33. Moore, S. K., V. L. Trainer, N. J. Mantua, M. S. Parker, E. A. Laws, L. C. Backer i L. E. Fleming (2008). "Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health." *Environmental Health: A Global Access Science Source* 7(SUPPL. 2).
 34. Nagasaki, K., M. Ando, S. Itakura, S. Imai i Y. Ishida (1994). "Viral mortality in the final stage of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) red tide." *Journal of Plankton Research* 16: 1595-1599.
 35. Penna, A., M. Vila, S. Fraga, M. G. Giacobbe, F. Andreoni, P. Riobó i C. Vernesi (2005). "Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences." *Journal of Phycology* 41: 212–225.
 36. Penna, A., M. Vila, S. Fraga, M. G. Giacobbe, A. Francesco, P. Riobó i C. Vernesi (2005). "Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8s rDNA sequences." *Journal of Phycology* 41: 212-225.
 37. Penzar, B. i B. Makjanić (1978). *Uvod u opću klimatologiju*. Zagreb, Sveučilišna naklada Liber.

38. Rhodes, L. (2011). "World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt." *Toxicon* 57: 400-407.
39. Rhodes, L. (2011). "World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt." *Toxicon*.
40. Richardson, K. i G. Kullenberg (1987). "Physical and biological interactions leading to phytoplankton blooms: a review of *Gyrodinium aureolum* blooms in Scandinavian waters." *Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer.* 187: 19-26.
41. Scholin, C. A., F. Gulland, G. J. Doucette, S. Benson, M. Busman, F. P. Chavez, J. Cordaro, R. DeLong, A. D. Vogetaere, J. Harvey, M. Haulena, K. Lefebvre, T. Lipscomb, S. Loscutoff, L. J. Lowenstine, R. M. III, P. E. Miller, W. A. McLellan, P. D. R. Moeller, C. L. Powell, T. Rowles, P. Silvagni, M. Silver, T. Spraker, V. Trainer i F. M. V. Dolah (2000). "Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom." *Nature* 403: 80-84.
42. Sellner, K. G., G. J. Doucette i G. J. Kirkpatrick (2003). "Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 383-406.
43. Shumway, S. E. (1990). "A Review of the Effects of Algal Blooms on Shellfish and Aquaculture." *Journal of the World Aquaculture Society* 21: 65-104.
44. Shumway, S. E. (1990). "A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture." *Journal of the World Aquaculture Society* 21: 65-104.
45. Shumway, S. E., S. M. Allen i P. D. Boersma (2003). "Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported events? ." *Harmful Algae News* 2: 1-17.
46. Supić, N., M. Orlić, D. Degobbis, T. Djakovac, V. Krajcar i R. Precali (2002). "Occurrence of the Istrian Coastal Countercurrent in 2000, a year with a mucilage event." *GEOFIZIKA* 18: 45-57.
47. Tester, P. A. i K. A. Steidinger (1997). "*Gymnodinium breve* red tide blooms: initiation, transport, and consequences of surface circulation." *Limnol. Oceanogr.* 42: 1039-1051.
48. Tichadou, L., M. Glaizal, A. Armengaud, H. Grossel, R. Lemée, R. Kantin, J. L. Lasalle, G. Drouet, L. Rambaud, P. Malfait i L. De Haro (2010). "Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: Experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009." *Clinical Toxicology* 48: 839-844.

49. Totti, C., S. Accoroni, F. Cerino, E. Cucchiari i T. Romagnoli (2010). "*Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata." *Harmful Algae* 9: 233-239.
50. UNESCO, I. O. C. o. (2011), Harmful Algal Bloom Programme <http://www.ioc-unesco.org/hab/>, preuzeto: 02.08.2011.
51. Ungano, N., G. Assennato, M. Blonda, B. Cudillo, M. R. Petruzzelli, M. Mariani, A. M. Pastorelli, M. R. Aliquò, A. D'Angela, C. Aiello i S. Ranieri (2010). "Occurrence of the potentially toxic dinoflagellate *ostreopsis ovata* along the apulian coastal areas (Southern Italy) and relationship with anthropogenic pollution." *Fresenius Environmental Bulletin* 19: 1813-1821.
52. Utermöhl, H. (1958). "Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik." *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie Komitee für Limnologische Methoden* 9: 1-40.
53. Van Dolah, F. M. (2000). "Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence." *Environmental Health Perspectives* 108(SUPPL. 1): 133-141.
54. Viličić, D. (2002). *Fitoplankton Jadranskoga mora. Biologija i taksonomija*. Zagreb, Školska knjiga.
55. Viličić, D. (2003). *Fitoplankton u ekološkom sustavu mora*. Zagreb, Školska knjiga.
56. Zavatarelli, M., J. W. Baretta, J. G. Baretta-Bekker i N. Pinardi (2000). "The dynamics of the Adriatic Sea ecosystem. An idealized model study." *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 47: 937-970.
57. Zingone, A., R. Siano, D. D'Alelio i D. Sarno (2006). "Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea)." *Harmful Algae* 5: 321-337.
58. Zingone, A. i T. Wyatt (2005). *Harmful algal blooms: keys to the understanding of the phytoplankton ecology*. The Sea. A. R. Robinson and K. H. Brink. Harvard, Harvard University Press. Volume 13. *The Global Coastal Ocean: Multiscale Interdisciplinary Processes.*: 867-926.
59. Zore-Armanda, M. (1969). "Water exchange between the Adriatic and the Eastern Mediterranean." *Deep-Sea Research and Oceanographic Abstracts* 16: 171-178.
60. Zore-Armanda, M., M. Morović i P. L. A. Violette (2001). "Divergence in the current field in the North Adriatic." *Acta Adriatica* 42: 5-13.

