

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Victor Stinga Perusco

**Značajke početnog obraštaja na odabranim vrstama plastičnog materijala
u moru**

DIPLOMSKI RAD

Dubrovnik, 2019.

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Victor Stinga Perusco

**Značajke početnog obraštaja na odabranim vrstama plastičnog materijala
u moru**

Mentor:

doc. dr. sc. Marijana Pećarević

Komentor:

dr.sc. Mirta Smodlaka Tanković

DIPLOMSKI RAD

Dubrovnik, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Marijana Pećarević i dr. sc. Mirta Smodlake Tanković u Institutu Ruđer Bošković, Centru za istraživanje mora, Laboratoriju za evolucijsku ekologiju, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Marijani Pećarević na pomoći tijekom pisanja i na ispravljanju ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem komentorici dr. sc. Mirti Smodlaka Tanković koja mi je povjerila ovakvu temu za diplomski rad, te na uloženom vremenu, ispravljanju i savjetima oko pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem mag. forenz. Nataši Kužat na pomoći pri mikroskopiranju, slikanju i određivanju svojti dijatomeja.

Zahvaljujem dr. sc. Martinu Pfannkuchenu, voditelju Laboratorija za evolucijsku ekologiju na pomoći u obradi podataka i podršci tijekom pisanja.

Također, zahvaljujem Laboratoriju za evolucijsku ekologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi. Zahvaljujem svim članovima ovog laboratorija za pomoć i podršku te nezaboravne trenutke na terenu i u laboratoriju.

Iskreno zahvaljujem svojim roditeljima, kolegama i prijateljima što ste mi bili podrška tijekom ovih godina studiranja.

SAŽETAK

Značajke početnog obraštaja na odabranim vrstama plastičnog materijala u moru

U ovom radu istraživana je početni obraštaj na četiri vrste plastičnih vrećica: polivinil klorid (PVC), polietilen visoke gustoće (HDPE), polietilen niske gustoće (LDPE) i dvije vrste biorazgradivih vrećica, jedna koja sadrži EPI aditiv (Earth Rated®) dok je druga na bazi škroba (Profissimo kompostabilna). Eksperiment je proveden tijekom ljetne i zimske sezone. Vrijeme potrebno da plastika počne tonuti je 11 dana u ljetnoj sezoni i 13 dana u zimskoj sezoni. Na pet različitih vrsta plastike je utvrđena prisutnost 38 svojiti praživotinja (od kojih 36 svojiti dijatomeja, jedna vrsta cilijata i jedna vrsta dinoflagelata). Razlika u broju svojiti i biovolumenu između sezona je zanemariva, međutim razlika u prosječnoj gustoći stanica po sezoni je 15 puta veća ljeti (20509 stanica/cm²) nego zimi (1342 stanica/cm²). Najbrojnije svojite su male dijatomeje reda Pennales. Utvrđena je statistički značajna razlika između materijala PELD i ostalih vrsta plastičnih materijala po morfologiji i biovolumenu svojiti.

Ključne riječi: obraštaj/dijatomeje/plastika/ Jadransko more

ABSTRACT

Characteristics of initial biofilm formation on selected types of plastic material in thesea

The initial biofilm formation on four types of plastic was investigated. The plastic bags used in this experiment were made from: polyvinyl chloride (PVC), high-density polyethylene (HDPE), low-density polyethylene (LDPE) and two biodegradable types, one containing an EPI additive (Earth Rated®) and the other was starch based (Profissimo compostable). The experiment was carried out during two seasons (summer and winter). The plastic started sinking after 11 days in the summer season and 13 days in the winter. On five different types of plastic 38 taxa of protozoa were identified (36 diatom taxa, one taxa of ciliate and one of dinoflagellate). The difference in the number of taxa and biovolume per season is negligible. However, the difference in total abundance per season was significant, in the summer (20509 cells/cm²) was 15 times higher than in winter (1342 cells/cm²). The most abundant species were small diatoms from Pennales order. A statistically significant difference was found between PELD and other plastic materials regarding the morphology and biovolume of the taxa.

Key words: biofilm/diatoms/plastic/ Adriatic sea

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
1.1 Korištenje plastike u akvakulturi.....	2
1.2 Obrašaj na plastičnom materijalu u moru	3
1.3 Razvoj biofilma i obrašaj	5
1.3.1 Bacillariophyceae – alge kremenjašice	8
1.4 Ciljevi.....	14
2. MATERIJALI I METODE	15
2.1 Terenski dio istraživanja	15
2.1.1 Eksperimentalni dizajn.....	15
2.1.2 Područje istraživanja.....	15
2.1.3 Istraživani materijali	16
2.2 Uzorkovanje i analiza.....	19
2.3 Statistička analiza.....	21
3. REZULTATI.....	22
3.1 Broj svojti na odabranim vrstama plastičnog materijala.....	25
3.2 Gustoća populacije na odabranim vrstama plastičnog materijala	26
3.3 Biovolumen stanica na odabranim vrstama plastičnog materijala	27
3.4 Analiza sličnosti promatrane zajednice obraštaja	28
3.5 Relativna abundancija i biovolumen svojta na odabranim vrstama plastičnog materijala.....	30
3.6 Analiza zajednice prema sezoni i vrsti plastičnog materijala	41
4. RASPRAVA	45
5. ZAKLJUČAK.....	49
6. LITERATURA	50

1. UVOD

1.1 Korištenje plastike u akvakulturi

Akvakultura je jedna od najbrže rastućih grana gospodarstva u proizvodnji hrane u posljednjih nekoliko godina. Godišnja stopa rasta proizvodnje na globalnoj razini iznosi 6-8 % što je navedeno u hrvatskom Nacionalnom strateškom planu razvoja akvakulture za razdoblje 2014.-2020. godine (Ministarstvo poljoprivrede 2015). Takav brz rast i razvoj ove industrije bio je moguć zahvaljujući mnogobrojnim tehnološkim unapređenjima i znanstvenim otkrićima. Jedna od najvažnijih tehnoloških promjena jest uvođenje plastike kao materijala za izradu velikog dijela opreme za akvakulturu. Plastika je, možda, najsvestraniji od svih poznatih materijala. Pošto je sintetička, može se prilagoditi kako bi zadovoljila specifične zahtjeve korištenja. Zahvaljujući njezinoj svestranosti i prilagodljivosti, plastika je brzo zamijenila konvencionalne materijale kao što su drvo, staklo, metal, papir u različitim segmentima poput poljoprivrede, navodnjavanja, ambalaže pa tako i akvakulture. Plastika u akvakulturi je zamijenila drvene splavi, željezne cjevovode, betonske i kamene bazene, drvene grane koje se koriste za sakupljanje mlađi školjkaša i mnoge druge alate. Najčešće vrste plastike koje se koriste u akvakulturi su: polivinil klorid (PVC) za izradu cijevi, kaveza, strukturnih dijelova kaveza, filtera u recirkulacijskim sustavima i tankova, zatim polietilen visoke gustoće (HDPE) koji se koristi za plutače, konope, mreže, cijevi, posude, kante i tankove dok se polietilen niske gustoće (LDPE) upotrebljava u izradi plastičnih plahti za prekrivanje dna ribnjaka ili na staklenicima i vrećama za hranu (Mahapatra 2011).

1.2 Obraštaj na plastičnom materijalu u moru

Čvrste površine uronjene u vodu nakon kratkog vremena oblaže sloj proteina i polisaharida, koji se naziva kondicionirajući film (Bakker i sur. 2003; Bhosle i sur. 2005; Loeb i Neihof 1975), i regulira naseljavanje organizama. U morskom okolišu, početnim obraštajem često dominiraju različite vrste dijatomeja (Cooksey, 1984), koje dalje mogu regulirati naseljavanje ličinki viših organizama kao što su npr. raci vitičari, školjkaši i mahovnjaci što dovodi do razvoja makroobraštaja (Townsin 2003).

Obraštajne zajednice su različite. Ovisno o materijalu na kojemu se razvijaju značajno se razlikuju zajednice na prirodnim i umjetnim podlogama (Hamilton i Duthie 1984; Sabater i sur. 1998; Nenadović i sur. 2015). Sastav obraštajnih zajednica varira sezonski i po dubini (Munda 2005; Totti i sur 2007) pri čemu u zoni plime i oseke sastav zajednica varira puno više nego u dubljim predjelima u kojima su uvjeti stabilniji (MacIntyre i sur. 1996).

Abundancija dijatomeja postepeno raste s vremenom, međutim postoje sezonske varijacije. Najveća raznolikost dijatomeja je u periodu najveće insolacije i temperature (Round 1972). U Jadranskom moru najveća abundancija i biomasa uočena je u periodu između veljače i listopada, dok je u periodu između siječnja i veljače abundancija i biomasa mnogo niža (Totti i sur. 2007). Isti sezonski odnos abundancije i biomase može se naći u istraživanim planktonskim zajednicama (Aubry i sur. 2004; Totti i sur. 2000). Porast broja dijatomeja pripisuje se duljini dana te naglom porastu količine dostupnih nutrijenata nakon zimskog miješanja slojeva morske vode (Marini i sur. 2002).

Kolonizacija umjetnih podloga može se podijeliti u nekoliko faza, kroz koje se mijenja sastav zajednice odnosno povećava njezina kompleksnost (Korte i Blinn 1983; Totti i sur. 2007; Tuji 2000a, 2000b). Najčešće vrste dijatomeja u biofilmu su one iz roda *Licmophora*, *Cocconeis* i *Achnanthes* (Mejdandžić i sur. 2015; Mihalić i sur. 2008; Munda 2005; Totti i sur. 2007).

Plastika je sve korišteniji materijal pa stoga i sve više prisutan u prirodi, ili kao objekt koji se koristi (npr. plutača) ili kao otpad. Plastika postaje novi supstrat za bentos organizme, odnosno novo pelagičko stanište (Reisser i sur. 2014). Ovisno o organizmima koji koloniziraju otpad u moru, može doći do porasta potrošnje kisika kad naseljeni organizmi, kao što su beskralješnjaci i bakterije, troše kisik za disanje. Međutim proizvodnja kisika se može i povećati kad supstrat nastanjuju mikroskopske alge koje obavljaju fotosintezu.

Znanstvenici su istraživali biofilmove na plastičnom otpadu u moru, makro i mikroplastici. *In situ* ekperimentima došlo se do zaključka da biofilm i obraštaj imaju ključnu ulogu u tonjenju plastike, pogotovo kod manjih komadića gdje je omjer površine i volumena veći (Fazey i Ryan 2016; Kaiser i sur. 2017; Ryan 2015). Također su istraživane različite vrste plastike kao što su stakloplastika (FRP –Fiberglass Reinforced Plastic), pleksiglas (polimetil metakrilat), polietilen tetrafalat (PET), polistiren (PS), polietilen (PE) i biorazgradiva plastika (Eich i sur. 2015; Fazey i Ryan 2016; Kaiser i sur. 2017; López-Fuerte i sur. 2017; Mejdandžić i sur. 2015; Pauli i sur. 2017; Totti i sur. 2007). Brojnost dijatomeja nakon dva tjedna na uzorcima plastike u zoni pelagijala je deset puta veća nego u bentoskoj zoni (Eich i sur.2015). Međutim, razlika u strukturi zajednica između polietilena i biorazgradive plastike je statistički značajna samo u pelagičnoj zoni, doku bentoskoj zoni razlika ne postoji (Eich i sur. 2015).

Europski parlament izglasao je da se upotreba plastičnih vrećica limitira kako bi se smanjilo onečišćenje okoliša plastikom. Italija je 2011. godine zabranila upotrebu običnih plastičnih vrećica i zamijenila ih biorazgradivim (Accinelli i sur. 2012). I druge zemlje planiraju napraviti isti korak te će se proizvodnja biorazgradivih vrećica drastično povećati. Na taj način će se povećati i unos biorazgradive plastike u prirodu, odnosno u more pa ovaj tip plastike postaje novi supstrat i stanište za organizme. Međutim, još uvijek nema dovoljno podataka o inicijalnoj kompoziciji zajednice biofilma na biorazgradivim i konvencionalnim vrstama plastike u morskom okolišu (Eich i sur. 2015). Istraživana je razgradnja biorazgradive plastike i rezultati ukazuju da se nakon nekoliko tjedana vide male rupice i promjene na površini, međutim ni nakon 33 dana nema promjena u čvrstoći materijala (Eich i sur. 2015). Nakon 9,5 mjeseci na biorazgradivoj plastici vidljive su pukotine i ona postaje krhka, a nakon 12,5 mjeseci jako je fragmentirana. Istovremeno, kod polietilena nisu uočeni znakovi fragmentacije (Pauli i sur. 2017).

Proizvodnja biorazgradive plastike je u povećanju te se pretpostavlja da će njena upotreba u akvakulturi biti sve češća u nadolazećem razdoblju. Pretpostavlja se da će se biorazgradiva plastika koristiti za pakiranje hrane za ribu, pakiranje ribe i proizvoda te možda i u izradi uređaja za prihvat mlađi školjkaša.

Naseljavanje organizama na podloge uronjene u morski okoliš danas predstavlja svjetski problem, od obrastanja pučinskih naftnih platformi, preko trgovačkih, putničkih, ratnih brodova, do akvakulturnih postrojenja gdje se začepljuju cjevovodi, mreže na

kavezima s ribom ili mijenja plovnost plutača kao i kaveza zbog obraštaja. Obraštaj na brodovima može povećati potrošnju goriva i do 30% (de Rincon i sur. 2001), te se time povećava i cijena prijevoza, a dolazi i do otpuštanja veće količine stakleničkih plinova. Kod brodova se koriste razni premazi protiv obraštaja, a jedan koji još i danas stvara probleme jest tri-butil-kositar (TBT) koji je toksičan za organizme u obraštaju i vrlo učinkovit kao antiobraštajno sredstvo, ali nije selektivan toksin. TBT se taloži u sedimentu, a zabilježeno je da uzrokuje imposeks kod nekih vrsta morskih puževa čime sprječava njihovo razmnožavanje. Njegova upotreba je danas zabranjena i smatra se da je to najotrovniji spoj koji je čovjek namjerno ispustio u morski okoliš.

U ribarstvu i marikulturi su prisutni veliki problemi s obraštajem. Zbog obraštaja na uzgojnim instalacijama za ribe i školjkaše javljaju se ekološki problemi poput anoksije, eutrofikacije i povećanog turbiditeta, a takvi problemi mogu dovesti do pomora organizama i velikih ekonomskih gubitaka (Lewis i sur. 1997). Tako su troškovi koje izaziva obraštaj na jednom uzgajalištu lososa srednje veličine u Ujedinjenom Kraljevstvu procijenjeni na \pm 120 000 € godišnje (Willemsen 2005).

Obraštaj u marikulturi ne zahvaća samo postrojenja, kaveze i plutače nego i organizme, odnosno školjkaše koji se uzgajaju. Obraštaj na školjkašima većinom čine sedentarne životinje koje se hrane filtracijom kao i školjkaši i na taj način dolazi do kompeticije za hranom uz kompeticiju za prostor. Uzgajivači koriste metodu isušivanja obraštaja kako bi ga se povremeno riješili. Pri tome vade pergolare s kamenicama i puste da se obraštaj osuši. Novije metode su roboti koji četkama čiste pergolare kamenica i dagnji te mreže uzgojnih kaveza. No takva praksa može dovesti do povećane količine organskog otpada na morskom dnu te dovesti do hipoksičnih i anoksičnih uvjeta. Druga metoda za sprječavanje obraštaja na mrežama kaveza jest njihovo močenje u formalinu ili u slične kemikalije ili protuobraštajne premaze, no ni ova metoda nije dugotrajno učinkovita (usmeno priopćenje).

Obraštaj je tako uglavnom nepoželjan u akvakulturi, ali postoje i istraživanja u sklopu uzgoja cipla u ribnjacima. Međutim, iako je utvrđeno da su cipli koristili obraštaj za hranu, nije utvrđena razlika u rastu i masi takvih cipala i onih koji se nisu hranili obraštajem, dok je povećana ukupna produkcija ribnjaka (Richard i sur. 2010).

1.3 Razvoj biofilma i obraštaj

Biofilm je kompleksna zajednica mikroorganizma pričvršćenih za neku površinu i njihovih metabolita (Stoodley i sur. 2002; Toole i sur. 2000). U većini slučajeva naseljavanje

bakterija prethodi naseljavanju ostalih organizama (Little 1984) međutim može biti i izuzetaka (Maki i sur. 1988; Roberts i sur. 1991).

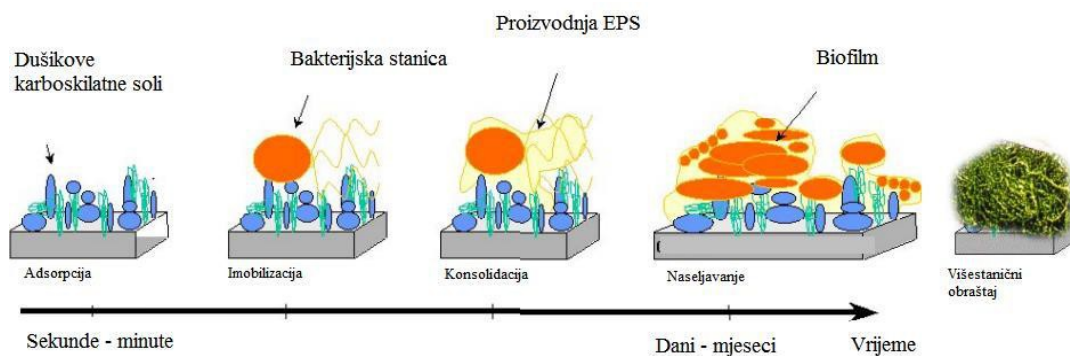
U literaturi postoji puno različitih termina s kojima možemo definirati obraštaj odnosno obraštajne organizme. Obraštajni organizmi dijele se po veličini na mikroorganizme (koji se nazivaju biofilm i/ili mikroobraštaj) i makroobraštaj (Lehaitre 2007). Bentos je zajednica organizama u vodenom okolišu, koji žive vezani uz dno. Mikrofitobentos je opisni naziv za različite skupove fotosintetskih dijatomeja, cijanobakterija, flagelata i zelenih algi koje nastanjuju površinski sloj sedimenata u morskim ekosustavima (Underwood 2001).

Termin perifiton uveden je 1928. godine, ali je drukčije definiran i opisan sa strane različitih autora. U literaturi termini kao *Nereiden*, *Aufwuchs*, *Bewuchs*, *Lasion*, *Be-lag*, i *Besatz* odnose se perifitonu i njemu sličnim organizmima (Sládečková 1962). Nakon 2000. godine termin biofilm zamijenio je njemački termin *Aufwuchs* (Kalff 2002).

Perifiton i biofilm su sinonimi te definirani su kao mikroekosustav sastavljen od kompleksnog mukopolisaharidnog matriksa u kojemu su smješteni autotrofni i heterotrofni mikroorganizmi (Sabater i sur 2007; Wu 2016)

Perifiton se dijeli na euperifiton (pričvršćeni organizmi) i pseudoperifiton (drugi organizmi koji su ostali ulovljeni ili se slobodno kreću po površini).

Razvijanje biofilma može se podijeliti u pet faza: (1) adsorpcija, (2) imobilizacija, (3) konsolidacija, (4) naseljavanje (5) makroobraštaj (Slika 1) (Lehaitre i sur. 2008).



Slika 1. Razvojne faze biofilma

(Prema: Lehaitre i sur. 2008).

Prva faza je adsorpcija i javlja se u roku par minuta od uranjanja objekta, kada započinje vezivanje organskih makromolekula (npr. egzopolimera, proteina) i/ili anorganskih molekula (npr. soli i čestice silta) koje su već prisutne u okolišu ili ih proizvode

mikroorganizmi (Baier 1972; Compère i sur. 2001). Primarni biofilm ili kondicionirajući biofilm je isprekidani sloj (Pradier i sur. 2000; Walls i sur. 1998) koji inducira promjene u karakteristikama površine (Fletcher i Pringle 1985; Zisman 1964) koje pospješuju adheziju. Adhezija bakterija provodi se u dva koraka u trajanju od par minuta do nekoliko sati nakon uranjanja (Marshall i sur.1971; Powell i Slater 1983; Robb 1984; Rubio 2002). Vezivanje bakterija za supstrat je na početku reverzibilan proces, ali postaje ireverzibilan zbog sekrecije ekstracelularnih polimera i stvaranja polimernih mostova između stanica i supstrata (Fera 1985).

Reverzibilna bakterijska adhezija naziva se imobilizacija, to je druga faza razvijanja biofilma. Stanice mikroorganizama su udaljene 3 nm od supstrata i mogu se lako ukloniti ispiranjem. Postoje dvije teorije koje opisuju i predviđaju vezivanje bakterija za površinu, prva je DVLO (nazvana po autorima: Derjaguin, Verwey, Landau, Oberbeck) teorija bazirana na elektrostatičnim interakcijama (Derjaguin 1941; Verwey i Overbeek 1948) i Van Der Waals-ovim vezama, a druga je bazirana na termodinamici odnosno na slobodnoj energiji adhezije (Bos i sur. 1999; Pethica 1980).

Ireverzibilna bakterijska adhezija je treća faza i naziva se konsolidacija. U ovu fazu uključene su visoko energetske interakcije, kao što su dipol-dipol, ion-dipol, vodikove veze, Debyeve interakcije i polimerni mostovi. Bakterijske stanice izlučuju izvanstanične polimerne tvari (EPS) koji se sastoje od polisaharida ili proteina. Pomoću EPS stvara se ireverzibilna adhezija stanice, to jest stanice su trajno priljubljene za supstrat. Površina EPS služi za zadržavanje nutrijenata, organskih i anorganskih supstanci u neposrednom okruženju (Lehaitre i sur. 2007). U biofilmu sadržaj EPS može tvoriti 95% suhe mase (Flemming i sur. 1994).

Naseljavanje je četvrta faza razvoja biofilma i odlikuje se po tome što se drugi mikroorganizmi, kao npr. jednostanične alge, naseljavaju na primarni biofilm. Razvija se kompleksna zajednica i biofilm poprima trodimenzionalnu strukturu.

Zadnja faza je faza makroobraštaja gdje se nastanjuju višestanični organizmi kao što su makroalge i beskralješnjaci poput dagnji i rakova vitičara.

Biofilm nije uniformno razvijen na površini, neki dijelovi površine mogu ostati nenaseljeni. Debljina biofilma nije homogena i može varirati od nekoliko mikrometra do par centimetara ovisno o sastavu medija, karakteristikama supstrata, zajednici u okolišu i

vremenu. Ovisno o debljini biofilma i zajednici u biofilmu ekološki uvjeti kao što su koncentracija otopljenog kisika, metalnih kationa i otopljenih iona te pH unutar biofilma mogu znatno varirati od onih u okolnom mediju (Lehaitre i sur. 2008).

1.3.1 Bacillariophyceae – alge kremenjašice

Alge kremenjašice ili dijatomeje su fotosintetski jednostanični eukariotski mikroorganizmi, pripadaju odjelu Chrysophyta, u carstvu Protista (Viličić, 2002). Kozmopolitski su rasprostranjene i nastanjuju kopnene, slatkovodne i morske ekosustave. Žive pojedinačno ili u kolonijama. Postoje planktonski oblici koji lebde u vodi te ovise o gibanju vodenih masa, te bentoski oblici koji žive na supstratu ili su za njega pričvršćeni. S obzirom na simetriju stanice razlikuju se dijatomeje s radijalnom simetrijom – centrice (Centrales) koje prevladavaju u planktonu i one s bilateralnom simetrijom – penate (Pennales) koje prevladavaju u bentosu (Slika 2.) (Viličić 2002).

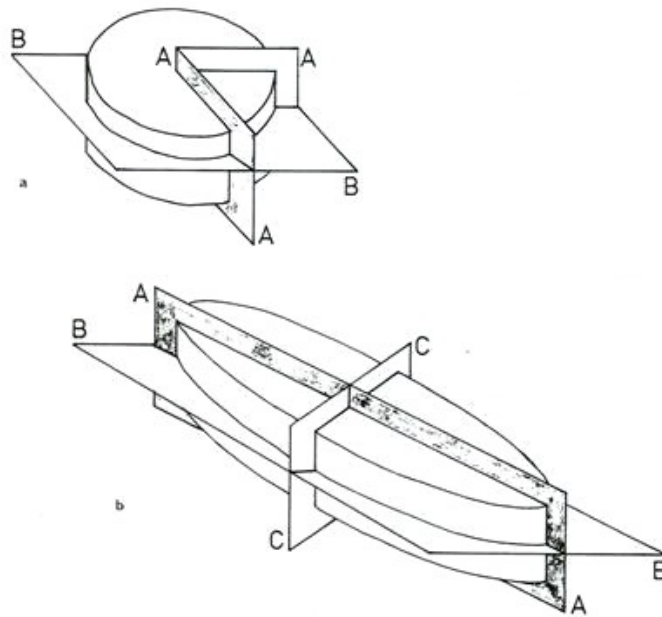
Dijatomeje su odgovorne za oko 25% svjetske primarne proizvodnje (Smetacek 1999). Stanice dijatomeja nemaju staničnu stjenku, već su obavijene silikatnim ljušturicama koje su karakteristične za ove organizme. Ta posebna stijenka građena od organskog matriksa i silicija naziva se frustula, a sastoji se od dvije polovice, veće gornje polovice koja se naziva epiteka i pokriva kao poklopac manju donju polovicu koja se naziva hipoteka. Svaka teka sastoji se od ljušturice (*epivalvae*, *hypoalvae*) koje su bočno su spojene pojasom (Slika 3. i 4.). Gornji i donji dijelovi ljušturice imaju pleure koje stvaraju pojas i pričvršćuju se za njih, a nazivaju se "girdle" (Von Stosch 1975) te spajaju ljušturice pektinoznim filmom. Stanice dijatomeja imaju valvalni i pleuralni položaj koji su važni u taksonomskoj identifikaciji jer se sve morfološke karakteristike ne mogu vidjeti samo iz jedne perspektive (Slika 3. i 4.) (Viličić 2002).

Neke penatne dijatomeje imaju prorez u teki koji prati apikalnu os, takozvanu pukotinu ili raf. S obzirom na rafu dijele se na vrste s rafom na samo jednoj ljušturici (*monorafidale*), na obje ljušturice (*birafidale*) ili vrste bez rafe (*arafidale*). Rafa je otvor iz kojeg izlaze ljepljive niti sluzi koja povezuje staničnu citoplazmu i supstrat kroz silikatnu ljušturicu.

Kod naseljavanja površine, rafa prva sjeda na supstrat te se stanica reorijentira i pokreće jedinstvenim kretnjama zvanim klizanje (Edgar i Pickett-Heaps 1984; Wetherbee i sur. 1998). Klizanjem dijatomeja po površini, sluzave niti koje se pričvršćuju za supstrat se

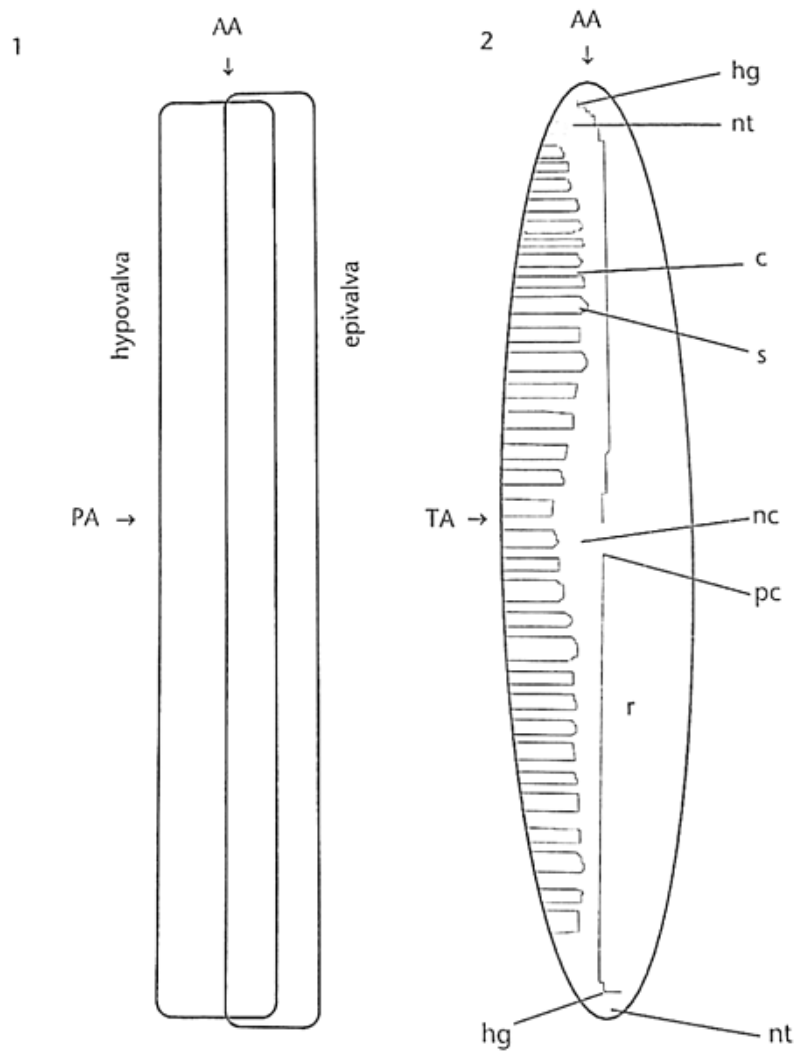
odlijepe sa stanice i ostaju za dijatomejama kao tragovi koji se akumuliraju i tvore komponentu biofilma (Edgar i Pickett-Heaps 1984; Higgins i sur. 2000)

Na silikatnoj ljušturici dijatomeja postoje dva tipa perforacija: jednostavne rupe ili pore i kompleksnije lokule ili areole (Hendey 1964; Ross i Sims 1972). Pore ili areole mogu biti u jednom, dva ili više redova (*stria, pl. striae*). Ljušturica je s unutarnje strane često pojačana rebrima (*costae*). Morfološka analiza ornamentacije ljušturica služi kao taksonomski kriterij u identifikaciji dijatomeja (Not i sur. 2012) (Slika 3. i 4.).



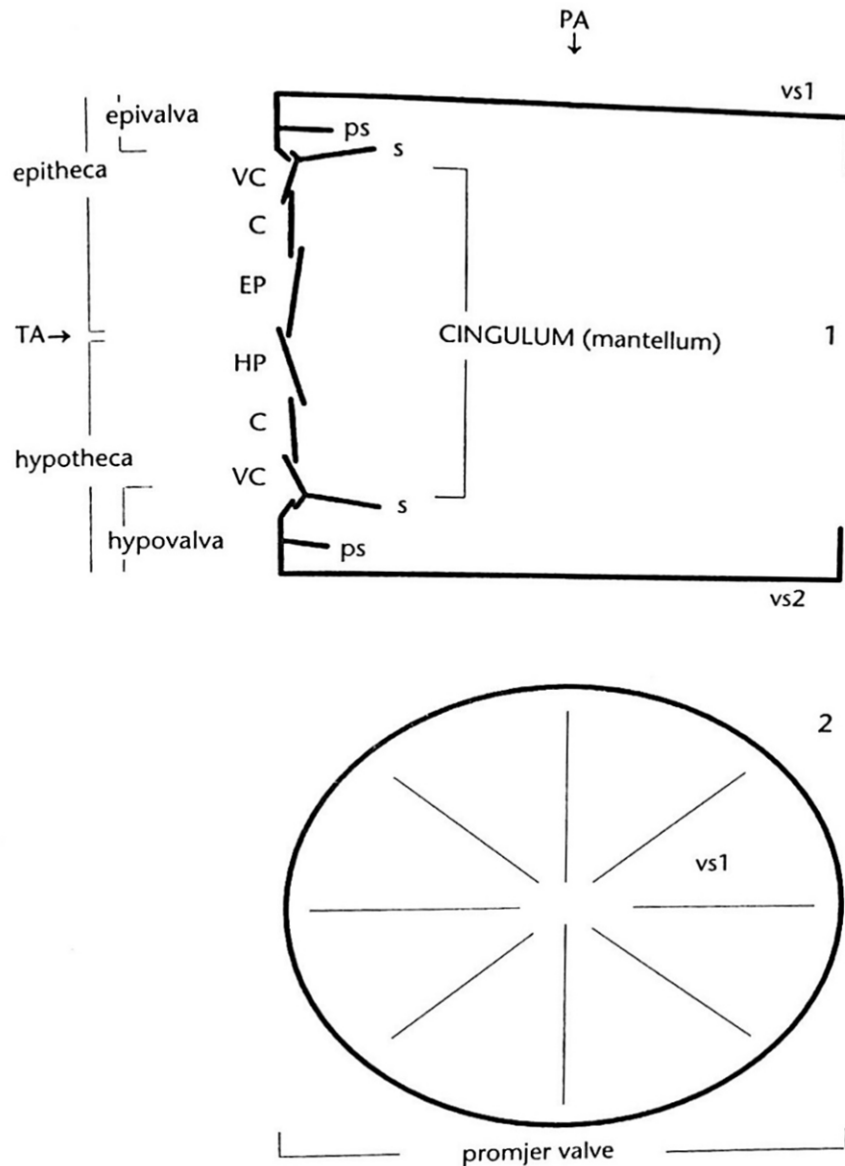
Slika 2. Ravnine u dijatomeja s radijalnom simetrijom (a) centrična dijatomeja: AA-radijalna ravnina, BB-valvalna ravnina; i bilateralnom simetrijom (b) pennatna dijatomeja: AA-apikalna ravnina; BB-valvalna ravnina; CC-transapikalna ravnina

(Izvor:http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/biodiversity/sahyadri_news/newsletter/issue26/article1/c_hap3.htm)



Slika 3. Glavne morfološke karakteristike ljušturice penatnih dijatomeja: 1-stanica u pleuralnom položaju, 2-stanica u valvalnom položaju, AA-apikalna os, PA-pervalvalna os, TA-transapikalna os, nt-nodus terminalis, nc-nodus centralis, r-rapha, pc-porus centralis, hg-helictoglossum, c-costa, s-stria s areolama

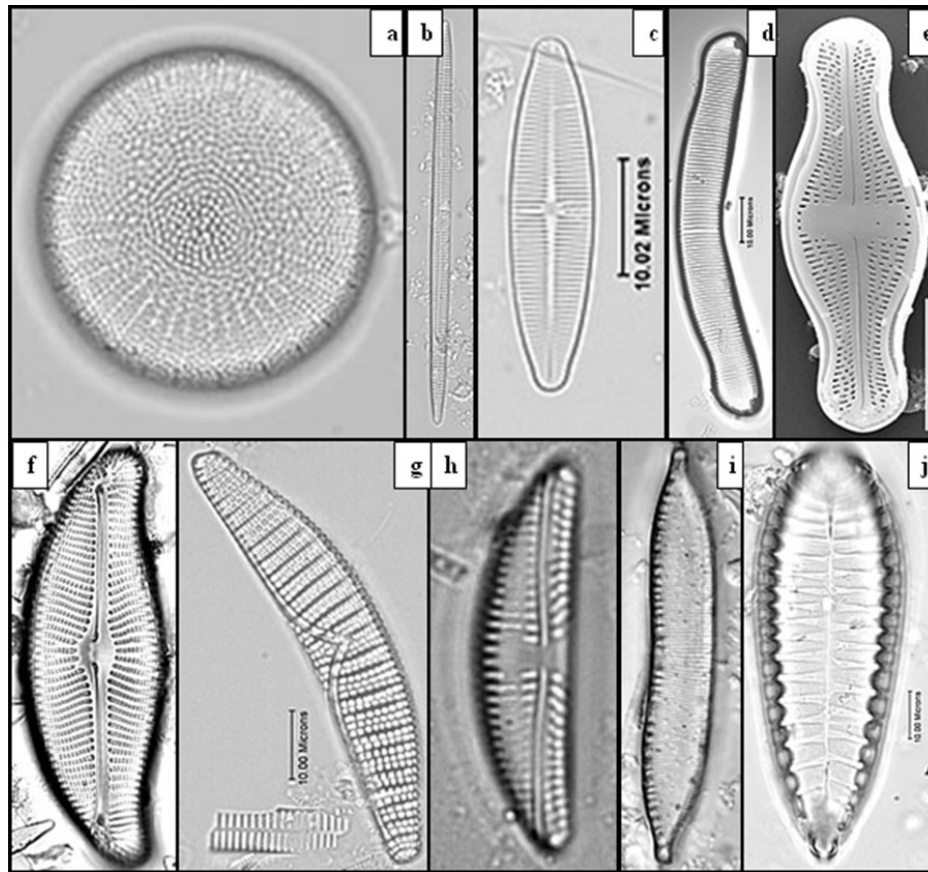
(Izvor: Viličić 2002)



Slika 4. Glavne morfološke karakteristike ljušturice centričnih dijatomeja: 1-transapikalni presjek kroz stanicu, 2-stanica u valvalnom položaju, PA-pervalvalna os, TA-transapikalna os, VC-valvocopula, C-copula, EP-epipleura, HP-hypopleura, s-septum, ps-pseudoseptum, vs1-epivalva, vs2-hypoalva

(Izvor: Viličić 2002)

Dijatomeje se mogu podijeliti u deset dogovorenih grupa prema morfološkim i karakteristikama građe: centrične, araphidne, monoraphidne, eunotoidne, naviculoidne, cymbelloidne, epithemioidne, amphoroidne, nitzschioidne i surirelloidne dijatomeje (Spaulding i sur. 2018) (Slika 5.).



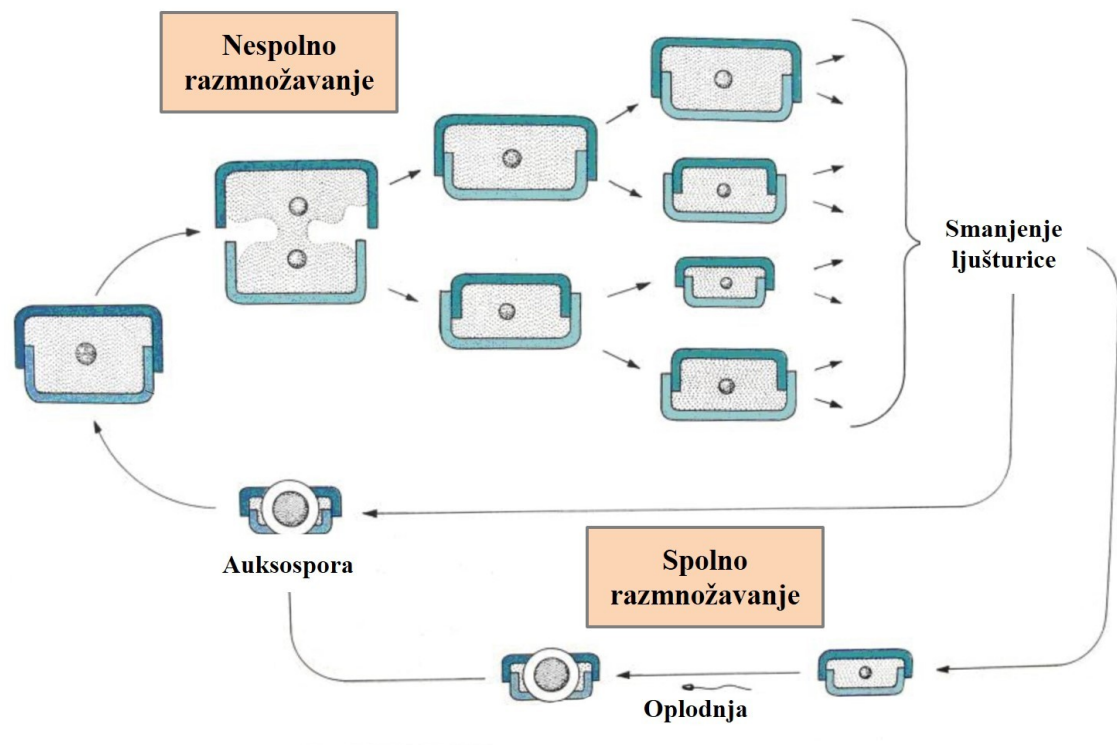
Slika 5. Morfološke grupe dijatomeja: a) centrične, b) araphidne, c) monoraphidne, d) eunotioidne, e) naviculoidne, f) cymbelloidne, g) epithemioidne, h) amphoroidne, i) nitzschioidne, j) surirelloidne

(preuzeto [shttp://huey.colorado.edu/diatoms/morphology/index.php](http://huey.colorado.edu/diatoms/morphology/index.php)).

Bentoske dijatomeje se mogu podijeliti u različite forme obzirom na njihov rast (Round 1981): uspravne (*erect*, prvenstveno arafidne vrste pričvršćene za supstrat pomoću sluzavih jastučića ili stapka), dobro pričvršćene (*adnate*, prvenstveno monorafidne vrste pričvršćene za supstrat pomoću rafe, te neke birafidne vrste kao npr. *Amphora* spp.), pokretne (*motile*, birafidne vrste koje se slobodno kreću po supstratu), dijatomeje koje formiraju sluzavi omotač (*tube-dwelling*, navikuloidni i nitzchoidni oblici koji žive u sluzavim omotačima koje su same proizvele), plokon (*placon*, mikroorganizmi koji su slabo pričvršćeni za supstrat kao što su centrice i cijanobakterije) i planktonske vrste (prave planktonske vrste koje su smjestile na supstrat iz vodenog stupca te nastavljaju sa procesima fotosinteze).

Pokretne vrste dijatomeja nastanjuju podloge uronjene u more tijekom cijele godine, a broj uspravnih vrsta dijatomeja povećava se tijekom proljeća i kasnog proljeća te opada ljeti. Dobro pričvršćene dijatomeje povećavaju svoju brojnost ljeti, dok vrste koje stvaraju sluzavi omotač svoj maksimum dosežu u proljeće (Totti i sur. 2007). Prisutnost pokrova i planktonskih vrsta je zanemariv, osim zimi zbog klasičnog zimskog cvjetanja fitoplanktona u sjevernom Jadranu (Aubry i sur. 2004). Dominacija pokretnih vrsta može se pripisati njihovoj sposobnosti da se slobodnije kreću u zreom obraštaju, što ih čini superiornijim kompetitorima za nutrijente i svjetlost od ostalih dijatomeja (DeNicola i McIntyre 1990).

Razmnožavanje dijatomeja može biti spolno i nespolno. Kod diobe stanice svaka nova stanica zadržava jednu polovicu ljušturice stanice majke, koja postane epiteka u novoj stanici kćeri, a *de novo* izgrađuje hipoteku. Nespolno razmnožavanje traje od 10 do 20 minuta, a tijekom dana mogu se podijeliti 1 do 8 puta. Stanice kćeri nisu jednake po veličini, jedna je veličine epiteke, a druga hipoteke stanice majke. Posljedično ovom načinu razmnožavanja dolazi do postepenog smanjenja veličine stanica (Slika 6).



Slika 6. Životni ciklus penatne dijatomeje

(Prema: <http://www.bio.vu.nl/thb/deb/>)

Kada se veličina stanica smanji na polovinu ili trećinu stanice majke aktivira se gen koji zaustavi daljnju diobu stanice te slijedi spolno razmnožavanje. Razvija se auksospora koja počne klijati te višestruko naraste i nastaje nova frustula stanice majke. U nepovoljnim uvjetima ili nakon nespornog razmnožavanja dijatomeje prelaze u statospore, koje će proklijati u povoljnim uvjetima. Nesporno razmnožavanje je ograničeno količinom otopljenog silicija (Richter 1906; Lewin 1962).

Dijatomeje su odlični ekološki indikatori jer su prisutne u svim vodenim staništima i reagiraju velikim promjenama u biomasi na male ekološke promjene. Koriste se kao ekološki indikator vode za pH, salinitet i hranjive soli (Anderson 1990; Battarbee i sur. 1990; Battarbee i sur. 1999; Bennion i sur. 2000; Charles i Smol 1990; Cumming 1993; Engstrom i sur. 1985; Fritz 1990; Juggins 1992; Smol i sur. 1983; Smol i Cumming 2000; Whitmore 1989).

1.4 Ciljevi

Ciljevi ovog istraživanja su:

- (i) ustanoviti vrijeme potrebno da se naseli obraštaj i plastika potone,
- (ii) karakterizirati početni obraštaj na pet odabranih vrsta plastičnih podloga (odrediti postoji li razlika u morfologiji zajednica prema vrsti plastike, odrediti brojnost i kvalitativni sastav dijatomeja na plastičnom materijalu.),
- (iii) ustanoviti na kojoj vrsti plastike se stvara najviše obraštaja.

2. MATERIJALI I METODE

2.1 Terenski dio istraživanja

2.1.1 Eksperimentalni dizajn

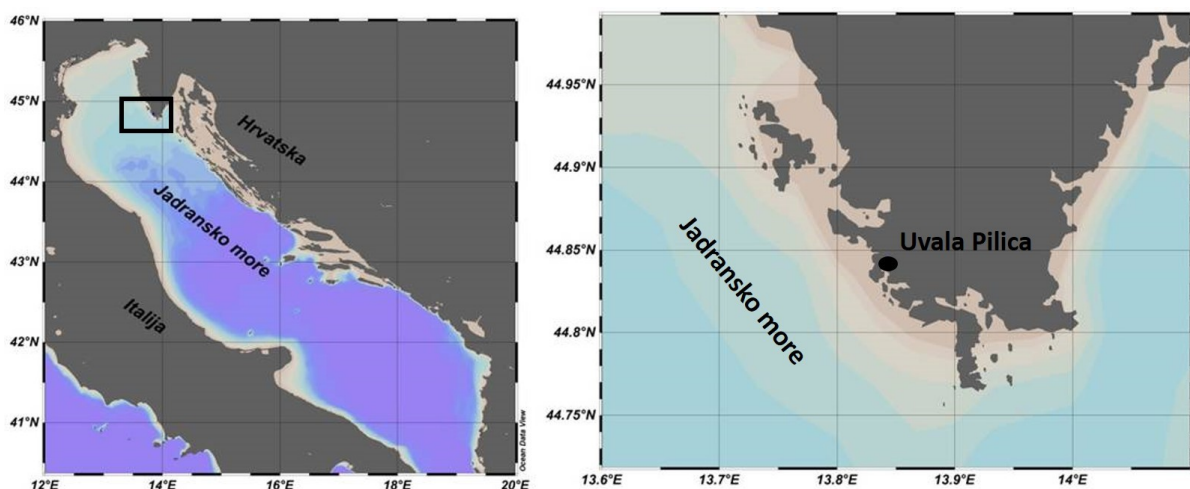
Eksperiment je postavljen tako da su plastični listovi iste veličine (15 x 15 cm) izrezani iz vrećica. Svaki plastični list pričvršćen je jednim krajem za tanki konop pomoću plastičnih vezica. Konop je pričvršćen na bambusovu trsku kako bi se održali svi listovi na površini i u istoj razini. Nastajanjem biofilma listovi mogu slobodno tonuti. Trska s plastičnim listovima zavezana je tankim konopom za gat (Slika 7). Eksperiment se obavljao u triplikatu i ponovljen je tijekom dvije sezone.



Slika 7. Eksperiment *in situ*, (a) plastika pluta, (b) plastika je potonula

2.1.2 Područje istraživanja

Istraživanje i uzorkovanje provedeno je u uvali Pilica u Puli u ljetnom i zimskom periodu (rujan 2017. i prosinac 2017.- siječanj 2018.) (Slika 8.). Uvala Pilica je relativno plitka, 4 do 5 m dubine. Sediment je pretežno muljeviti pijesak.



Slika 8. Lokacija uzorkovanja

Tijekom uzorkovanja ljeti i zimi, vremenski su uvjeti bili nestabilni, a velika količina oborina sigurno je imala utjecaj na eksperiment i na strukturu i formiranje biofilma na plastičnim listovima.

2.1.3 Istraživani materijali

U ovom eksperimentu korišteno je pet vrsta plastičnih vrećica: polivinil klorid, polietilen niske gustoće, polietilen visoke gustoće i dvije vrste biorazgradivih vrećica, jedna sadrži EPI aditive (EarthRated®) dok je druga na bazi škroba (Profissimo kompostabilna).

Značajke plastike određene su njezinim kemijskim sastavom i vrstom molekularne strukture (molekularna formacija: kristalna ili amorfna struktura).

Polivinil klorid (PVC) ima amorfnu strukturu s polarnim atomima klora u molekularnoj strukturi. Takve karakteristike su nerazdvojno povezane. Kemijska kompozicija monomera je ($\text{CH}_2=\text{CHCl}$). U čistoj formi to je lagana i čvrsta plastika, ali može se proizvesti i u fleksibilnoj "plastificiranoj" formi (Encyclopedia britannica 2016). Karakteristike polivinil-klorida su izvrsna prozirnost, tvrdoća i krutoća, ali fleksibilnost kad je plastificiran, dobra otpornost na kemikalije i vremenske neprilike, dugotrajna stabilnost, odnosno stabilna električna svojstva i niska propusnost plina. Upotrebljava se za izradu kreditnih kartica, okvira za prozore i vrata, cijevi za vodovod, folija za pakiranje, vrećica za krv i infuziju te za proizvodnju sintetičke kože (SPI 1988).

Polietilen (PE) ima parcijalno kristalnu strukturu i kemijska kompozicija monomera je $\text{CH}_2=\text{CH}_2$. Takav monomer može se proizvesti u linearnim i razgranatim oblicima, razgranate inačice su polietilen niske gustoće LDPE/PELD i linearni polietilen niske gustoće (LLDPE), linearni oblici su polietilen visoke gustoće (HDPE/PEHD) i polietilen ultrazvučne mase (UHMWPE) (Encyclopedia britannica 2016).

LDPE ima kratke i duge grane na lancima i takva razgranatost sprječava pakiranje polietilenskih molekula u čvrstu kristalnu strukturu, te je zato jako fleksibilan materijal (Encyclopedia britannica 2016). Njegove karakteristike su da je čvrst i fleksibilan, ima voštanu površinu, mekan je i lako se ogrebe, proziran je, ima nisku točku topljenja, stabilna električna svojstva i dobra svojstva barijere protiv vlage. Najčešće se upotrebljava kao folija za pakiranje, vrećice za smeće i kupovinu, izolaciju žica i kablova, kao i za izradu štrcaljka (*squeezebottles*), igračaka i kućnih potrepština (SPI, 1988).

HDPE nema razgranatu strukturu i zato se lanci mogu gušće pakirati, što rezultira gustim, visoko kristalnim materijalom visoke čvrstoće i umjerene krutosti. Ima višu točku topivosti, zbog toga se može sterilizirati. Svojstva uključuju dobru barijeru za vlagu i otpornost na kemikalije, tvrd je do polufleksibilan i čvrst, ima mekanu i voštanu površinu, propušta plinove i šušlav je. Koristi se za izradu boca za deterdžente, izbjeljivače i omekšivače za tkanine; kutija za hranu, boca za mlijeko i negazirana pića, igračaka, kanta, čvrstih cijevi, umjetnog drva, kutija za kompostiranje, vrećica za kupovinu i čepova.

EarthRated® zelene vrećice su na bazi plastike i sadrže EPI aditiv koji pomaže u njihovom raspadanju (Epi global, 2018; Earthrated, 2018). Točni sastav nije poznat jer je zaštićen od proizvođača. Deklarirane su da se raspadaju tijekom godinu dana u odlagalištu/smetlištu. Tvrtka EPI koristi potpuno razgradive aditive plastici TDPA® (Totally Degradable Plastic Additives®), koji se dodaju plastici (polietilenu, polipropilenu i poliestirenu) u količini od 2 do 3% tijekom izgradnje gotovih proizvoda. Takvi aditivi utječu na raspadanje kad su izloženi fotičkom termalnom i/ili mehaničkom stresu.

Profissimo kompostabilne vrećice za smeće su na bazi škroba. Točni sastav nije poznat jer ga je proizvođač je zaštitio

Navedeni istraživani materijali podijeljeni su prema njihovim specifičnim karakteristikama u Tablici 1.

U daljnjem tekstu i grafovima korištene su kratice za ime uzorka, prema opisu u Tablici 2.

Tablica 1. Podjela istraživanih materijala prema tipu površine i razgradivosti

Istraživani materijal	Tip površine	Razgradivost
PVC	glatka	ne biorazgradiva
PEHD	glatka	ne biorazgradiva
PELD	hrapava/šušakava	ne biorazgradiva
EarthRated®	hrapava/šušakava	biorazgradiva
Profissimo kompostabilne	hrapava/šušakava	biorazgradiva

Tablica 2. Skraćenice za uzorke: P-plastika, S-ljeto, W-zima i brojevi za vrstu plastike

Skraćenica	Vrsta plastike	Sezona
PS1	PVC	ljeto
PS2	PEHD	ljeto
PS3	PELD	ljeto
PS4	EarthRated®	ljeto
PS5	Profissimo kompostabilne	ljeto
PW1	PVC	zima
PW2	PEHD	zima
PW3	PELD	zima
PW4	EarthRated®	zima
PW5	Profissimo kompostabilne	zima

2.2 Uzorkovanje i analiza

Na početku eksperimenta plastični listovi su plutali, a kako se biofilm (obraštaj) formirao na njihovoj površini, specifična težina se povećavala te su plastični listovi počeli tonuti. Kako bi se potvrdilo da list tone zbog biofilma, na svakom uzorku je biofilm uklonjen te je testirana plovnost u morskoj vodi. Nakon što su plastični listovi potpuno potonuli, prikupljeni su i fiksirani u 4% formalinu. Iz svakog lista odrezan je jedan komad, biofilm je sastrugan pomoću četkice s obje strane (Slika 9.) te ispran s prethodno profiltriranom morskom vodom kroz filter promjera oka 0.22 μm (Millipore Membrane Filter). Uzorci su isprani s različitim volumenom profiltrirane morske vode, ovisno o količini potrebnoj za skidanje kompletnog obraštaja, te je volumen utvrđen naknadno. Površina svakog komadića plastičnog lista izmjerena je preko slike pomoću programa ImageJ.



Slika 9. Skidanje obraštaja s plastike

Za kvalitativnu i kvantitativnu analiza obraštaja korištena je Sedgewick-Rafter komorica (Slika 10.). Komorica je bila veličine 50 x 20 x 1 mm (= 1 cm³ = 1 ml) te označena mrežom (*grid*) od 1mm², na taj način 1ml se dijeli na 1000 μl . Nakon laganog miješanja preokretanjem tubice, izliveno je 1 ml uzorka u Sedgewick-Rafter komorici, zatvoreno pokrovnicom te se postavljeno na sedimentaciju. Utvrđen je broj svojti

Stanice su brojane po 1 μ l u analiziranom volumenu te se pomoću formule izračunavala gustoća populacije (stanica po jedinici volumena).

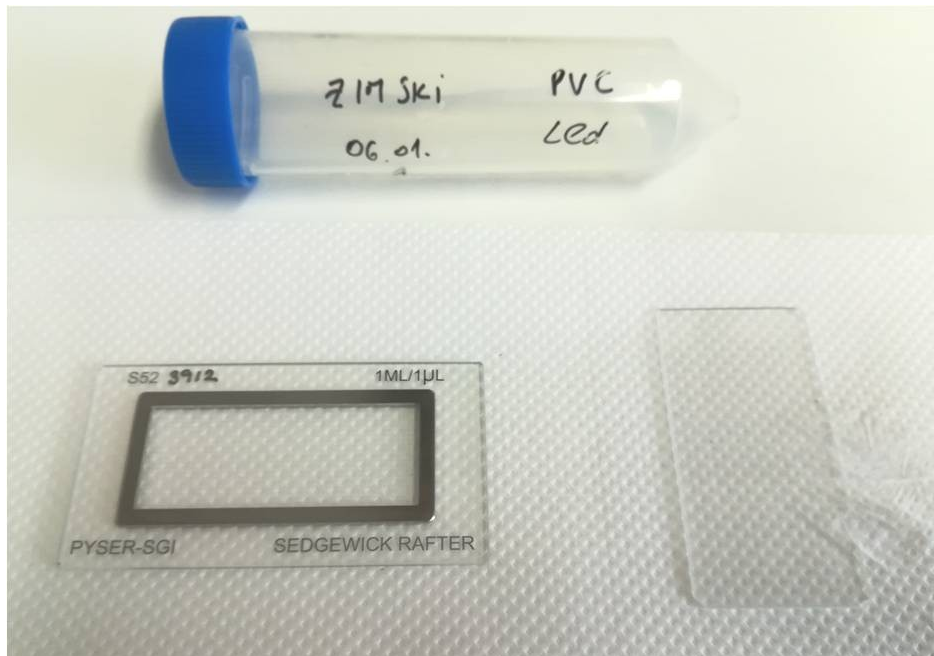
$$d = N \times 1,000 / A$$

d-gustoća

N-broj izbrojenih stanica

A- broj izbrojenih μ l

Zatim se poznati volumen uzorka dijelio s poznatom površinom komadića plastične vrećice i izračunala gustoća stanica po jedinici površine. Izračunata je relativna abundancija (%) to jest gustoća stanica u postotku kako bi se bolje grafički prikazalo.



Slika 10. Sedgewick-Rafter komorica s pokrovnicom

Pronađeni organizmi determinirani su do najniže moguće taksonomske razine po Viličić (2002) i Riedl (1991). Svoje su podijeljene u morfološke grupe prema Sun i Liu (2003). Pomoću programa Axiovision izmjerene su dužina, širina i visina stanica, i izračunate su prosječne vrijednosti. Navedene vrijednosti uvrštene su u formule za biovolumen specifične za svaku morfološku grupu. Za analizu je korišten invertni mikroskop AxioVert 200, Zeiss GmbH (Oberkochen, Germany), a za slikanje AxioCamMR5, Zeiss GmbH (Oberkochen, Germany).

2.3 Statistička analiza

Za obradu i grafički prikaz podataka korišteni su programi Microsoft Excel (Microsoft 2007) i R statistics. Za grafički prikaz karata područja istraživanja korišten je Ocean Data View.

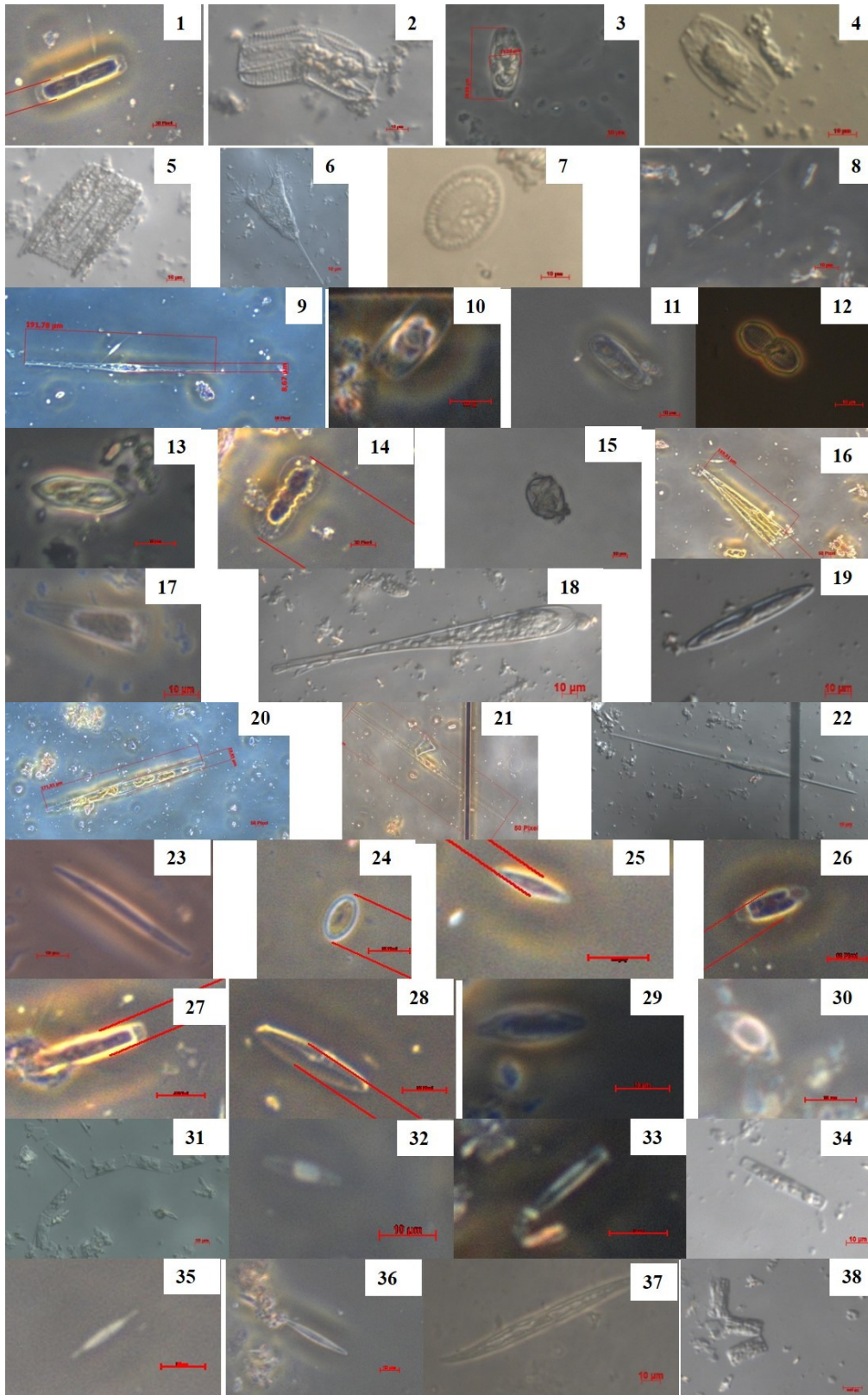
3. REZULTATI

Tijekom eksperimenta utvrđeno je da je za potonuće plastičnih listova u ljetnoj sezoni potrebno 11 dana, a u zimskoj 13 dana. Zabilježeno je 38 svojti mikroorganizama na 5 različitih vrsta plastike tijekom dvije sezone. Od toga je 36 svojti pripadalo dijatomejama, a prisutna je bila i jedna vrsta cilijata te jedna vrsta dinoflagelata. Svojte su determinirane do najniže prepoznatljive taksonomske razine (Tablica 3. i Slika 11.).

Tablica 3. Popis determiniranih svojti (broj ukazuje na sliku svojte, Slika 11.)

Broj	Ime Svojte
1	Achnanthes sp.
2	Achnanthes sp.1
3	Auricula sp.
4	Auricula/Amphora
5	Baccilaria paxilifera
6	Ciliophora
7	Coconeis sp.
8	"Cylindrotheca closterium/Nitzschia longissima"
9	Pennate 14
10	Diatom indet 1
11	Diatom indet 2
12	Diploneis bombus
13	Diploneis sp.
14	Entomoneis sp.
15	Gymnodinium sp.
16	Licmophora sp. 1
17	Licmophora sp. 2
18	Licmophora sp. 3
19	Nitzschia sp. 1

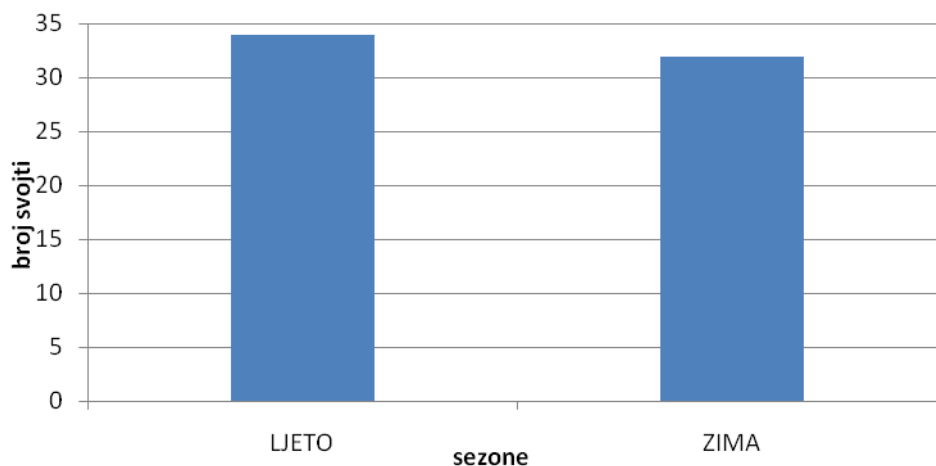
Broj	Ime Svojte
20	Nitzschia sp. 2
21	Nitzschia sp. 3
22	Nitzschia sp. 4
23	Nitzschia sp. 5
24	Pennate 1
25	Pennate 2
26	Pennate 3
27	Pennate 4
28	Pennate 5
29	Pennate 6
30	Pennate 7
31	Pennate 8
32	Pennate 9
33	Pennate 10
34	Pennate 11
35	Pennate 12
36	Pennate 13
37	Pleurosigma sp.
38	Tabellaria sp.



Slika 11. Tipičan oblik determinirane svojte (brojevi označuju svojtu-Tablica 3.)

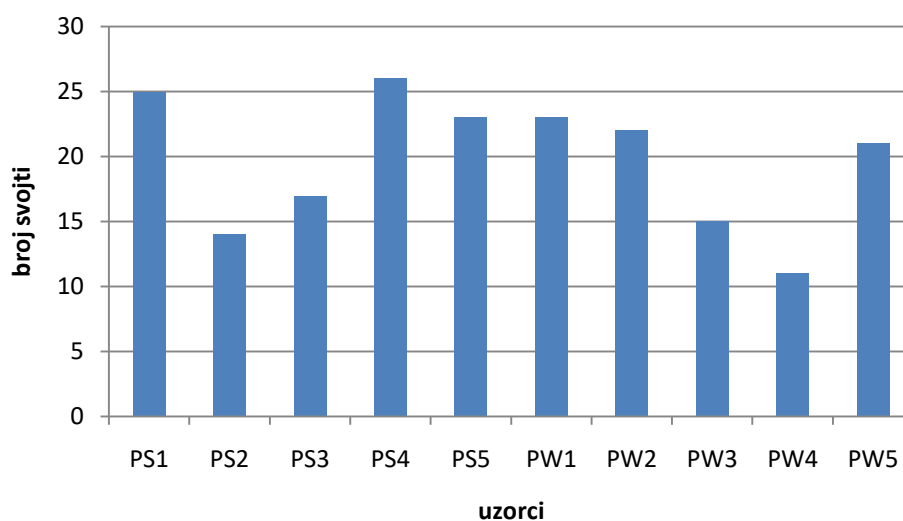
3.1 Broj svojti na odabranim vrstama plastičnog materijala

U ljetnom uzorku bile su prisutne 34 svojte, a u zimskom 32 svojte (Slika 13.).



Slika 43. Ukupni broj svojti po sezoni

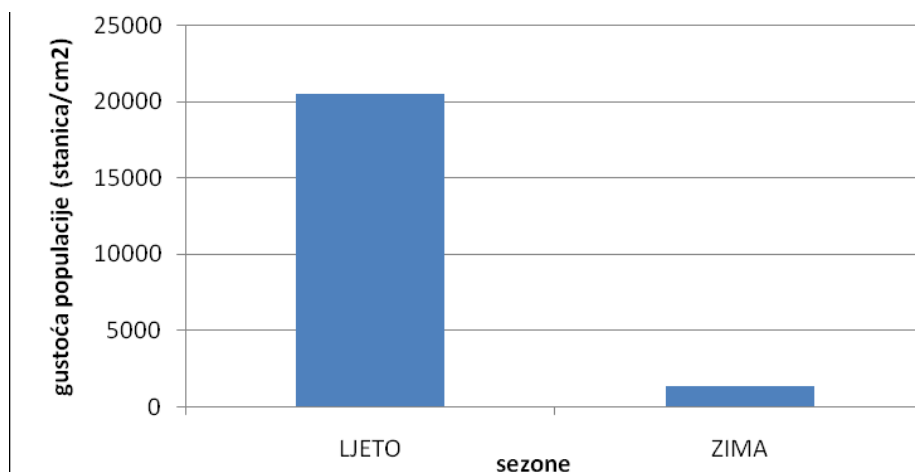
U ljetnom eksperimentu na uzorku PS1 pronađeno je 25 svojti, na PS2 14 svojti, na PS3 17 svojti, na PS4 26 svojti i na PS5 23 svojte. U zimskom eksperimentu na uzorku PW1 pronađene su 23 svojte, na PW2 22 svojte, na PW3 15 svojti, PW4 11 svojti i na PW5 21 svojta (Slika 14.).



Slika 14. Broj svojti po uzorku

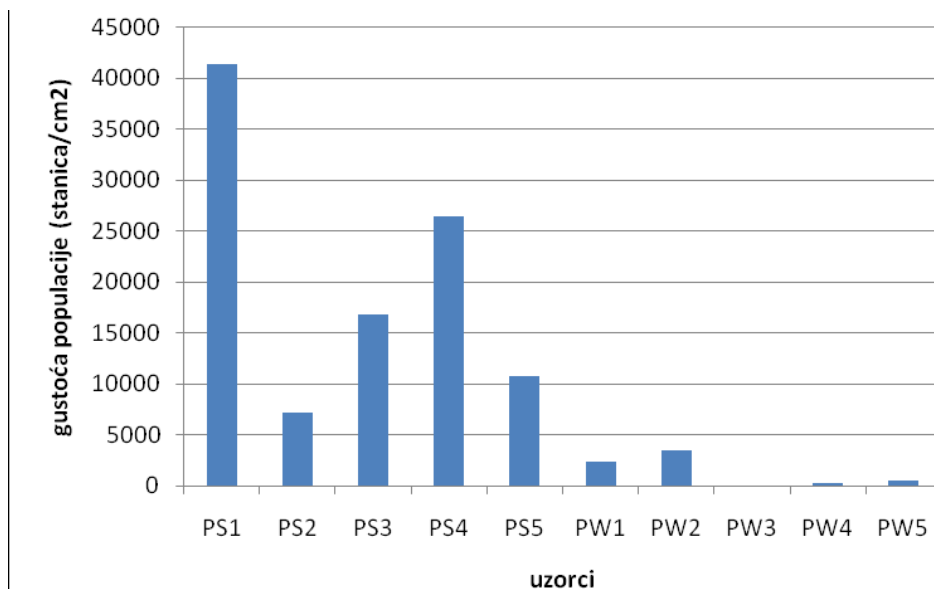
3.2 Gustoća populacije na odabranim vrstama plastičnog materijala

Gustoća populacije u ljetnoj sezoni je 20509 stanica/cm², a u zimskoj sezoni je 1342 stanica/cm² (Slika 15.).



Slika 15. Prosječna gustoća stanica po sezoni

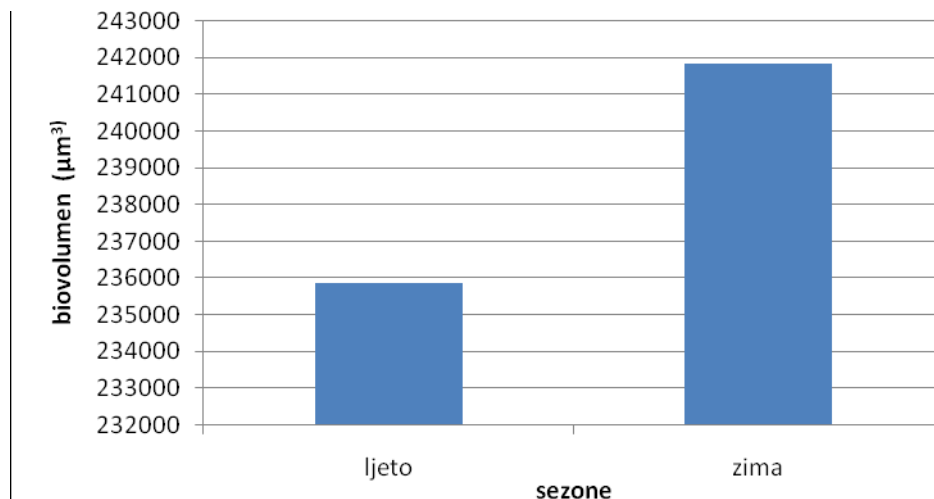
U ljetnom eksperimentu gustoća populacije na uzorku PS1 bila je 41361 stanica/cm², na PS2 7230 stanica/cm², na PS3 16829 stanica/cm², na PS4 26411 stanica/cm² i na PS5 10719 stanica/cm². U zimskom eksperimentu na uzorku PW1 bilo je 2319 stanica/cm², na PW2 3509 stanica/cm², na PW3 16 stanica/cm², PW4 322 stanica/cm² i na PW5 546 stanica/cm² (Slika 16.).



Slika 56. Gustoća stanica po uzorku

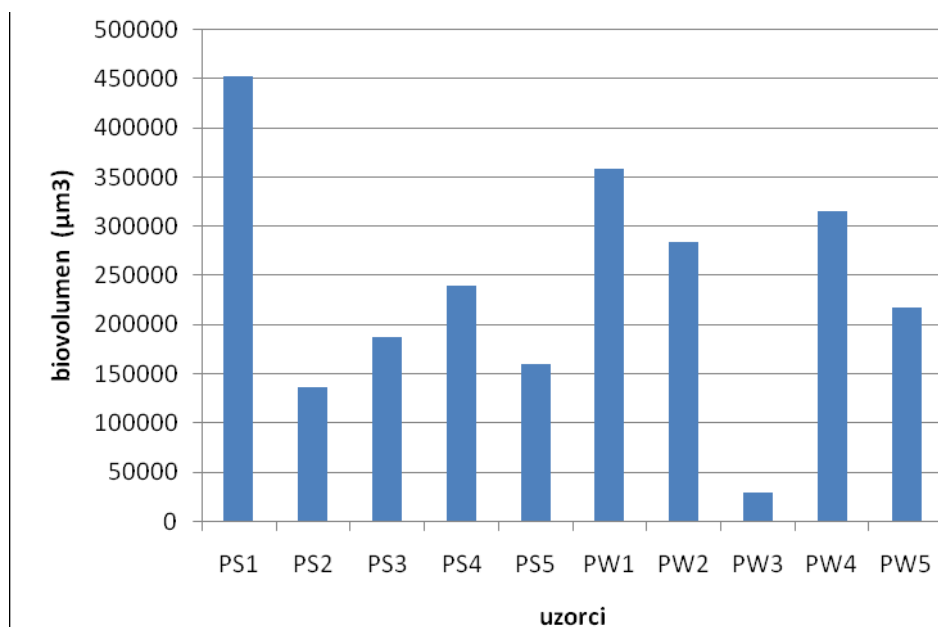
3.3 Biovolumen stanica na odabranim vrstama plastičnog materijala

Prosječni biovolumen u ljetnoj sezoni bio je $235872 \mu\text{m}^3$, a u zimskoj sezoni $241855 \mu\text{m}^3$ (Slika 17.).



Slika 17. Prosječni biovolumen po sezoni

U ljetnom eksperimentu biovolumen na uzorku PS1 bio je $452784 \mu\text{m}^3$, na PS2 $136994 \mu\text{m}^3$, na PS3 $188340 \mu\text{m}^3$, na PS4 $240552 \mu\text{m}^3$ i na PS5 $160691 \mu\text{m}^3$. U zimskom eksperimentu na uzorku PW1 bilo je $359438 \mu\text{m}^3$, na PW2 $284559 \mu\text{m}^3$, na PW3 $30272 \mu\text{m}^3$, PW4 $316423 \mu\text{m}^3$ i na PW5 $218581 \mu\text{m}^3$ (Slika 18.).

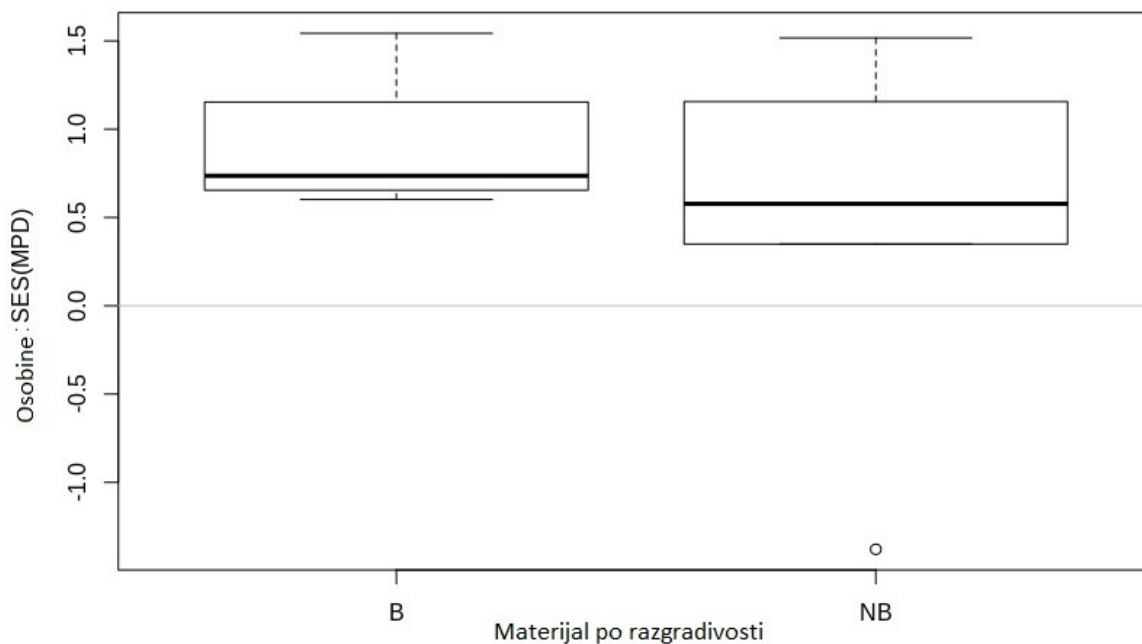


Slika 18. Biovolumen po uzorku

3.4 Analiza sličnosti promatrane zajednice obraštaja

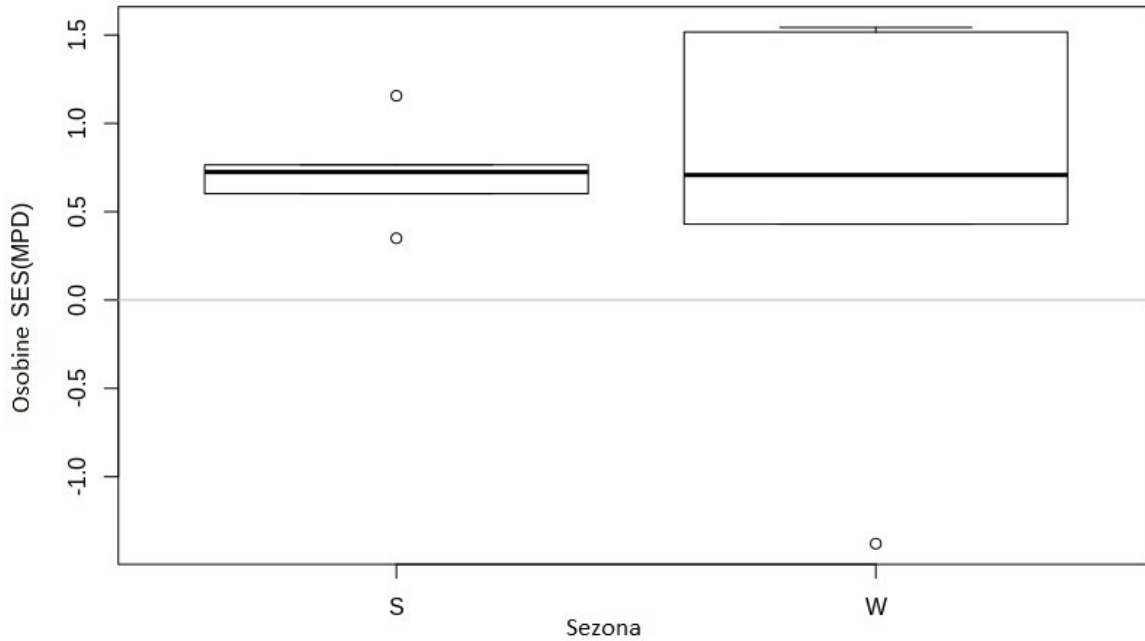
Grafovima je prikazana razlika procijenjene standardizirane filogenetske raznolikosti (SES-MPD) zajednica prema razgradivosti materijala, glatkoći površine materijala, sezoni, morfotipu i biovolumenu.

Između razgradivih i ne biorazgradivih materijala nije nađena statistički značajna razlika procijenjene standardizirane filogenetske raznolikosti ($p < 0,05$) (Slika 19.).



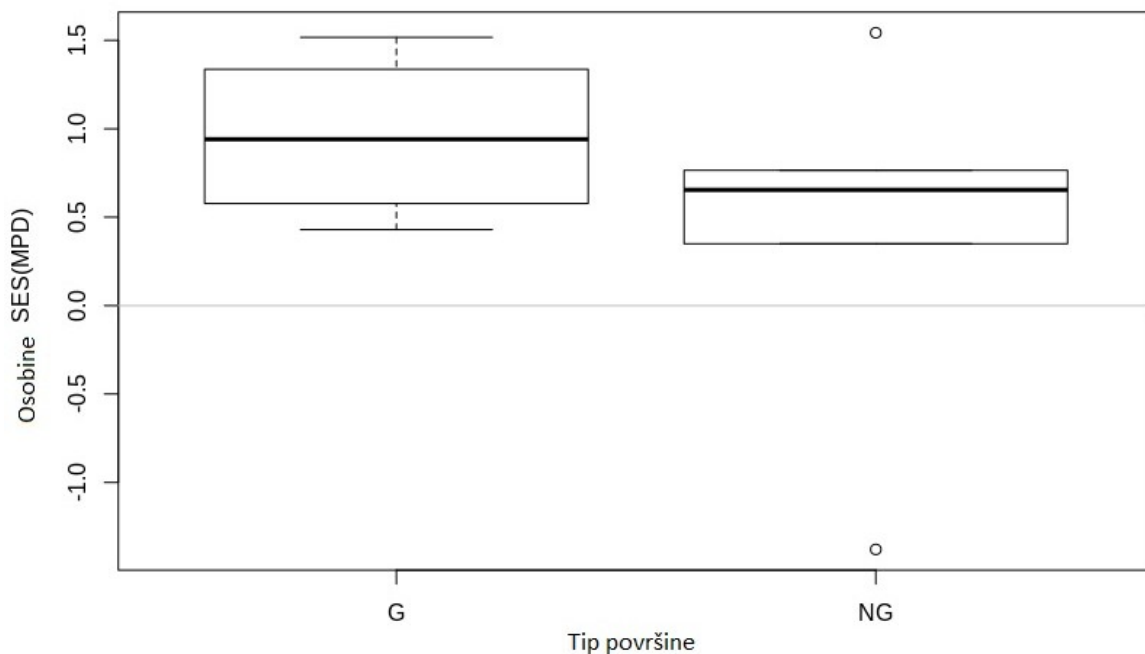
Slika 19. Usporedba procijenjene standardizirane filogenetske raznolikosti zajednica naseljenih na biorazgradive (B) i ne biorazgradive (NB) tipove plastike (MPD $P < 0.05$)

Naseljavanje za vrijeme različitih sezona, također nije rezultiralo značajnim razlikama u procijenjenoj standardiziranoj filogenetskoj raznolikosti zajednice ($p < 0,05$) (Slika 20.).



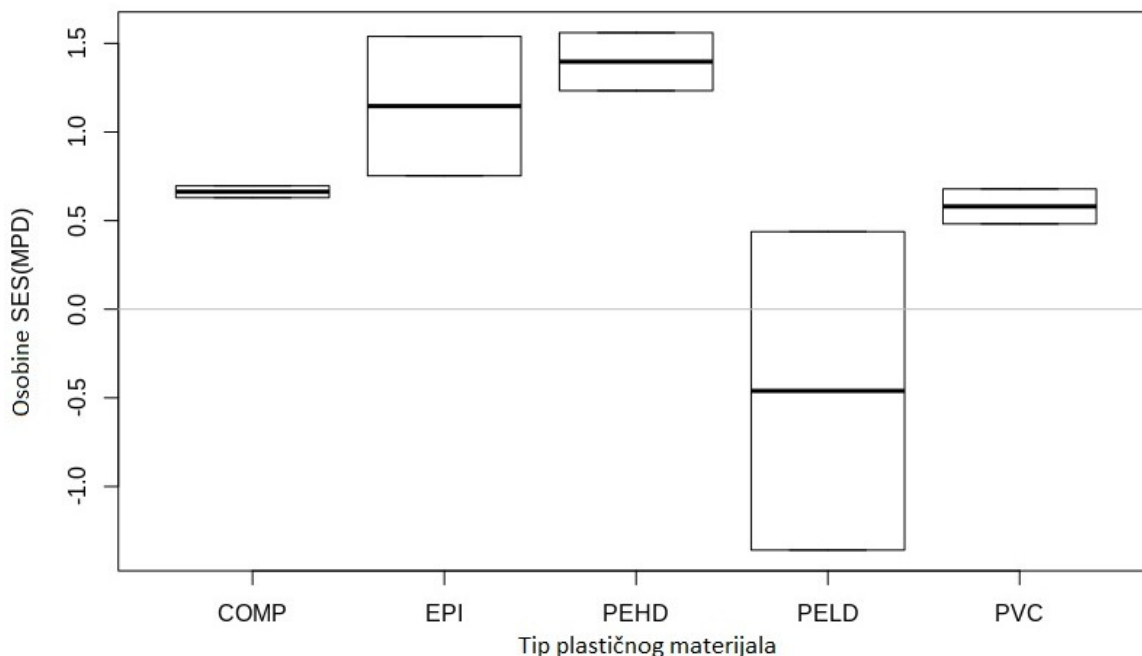
Slika 20. Usporedba procijenjene standardizirane filogenetske raznolikosti naseljenih zajednica između ljetne (S) i zimske (W) sezone (MPD $P < 0.05$)

Između glatkih (PEHD i PVC) i hrapavih površina (PELD, Profissimo kompostabilna i EarthRated®) nije bilo značajnih razlika u procijenjenoj standardiziranoj filogenetskoj raznolikosti zajednice ($p < 0,05$) (Slika 21.).



Slika 21. Usporedba procijenjene standardizirane filogenetske raznolikosti naseljenih zajednica između glatkih (G) i hrapavih/šušakavih (NG) tipova plastike (MPD $P < 0.05$)

Međutim statističkim testom (*standard effect size analysis of mean pairwise distances*) utvrđeno je da postoji mala, ali statistički značajna razlika u procijenjenoj standardiziranoj filogenetskoj raznolikosti zajednice između PELD i ostalih plastičnih materijala (Slika 22.), ljeti P-vrijednost je 0.049, a zimi 0.041.

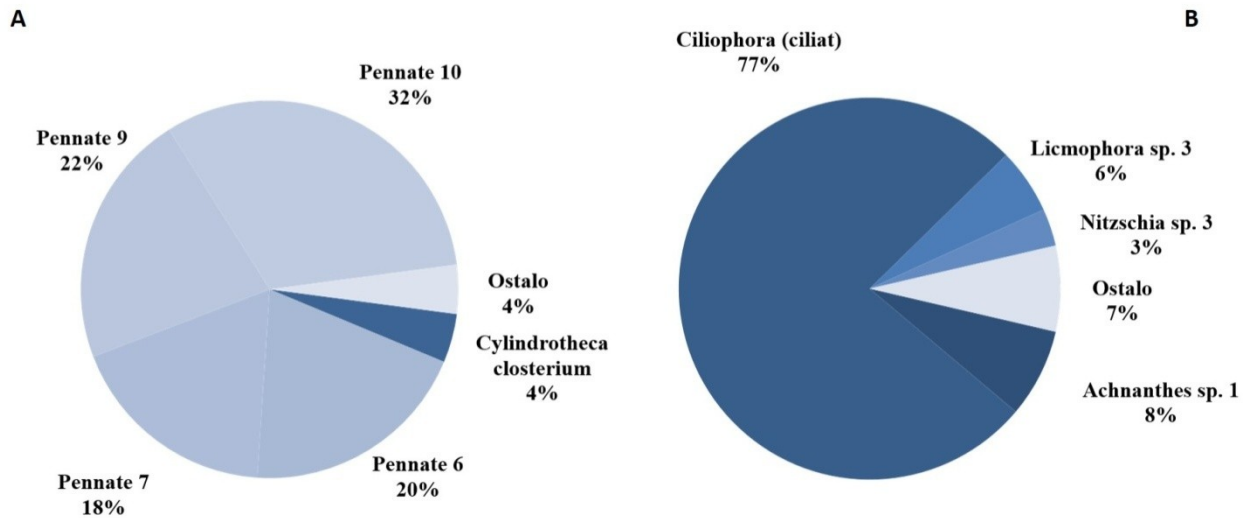


Slika 22. Usporedba procijenjene standardizirane filogenetske raznolikosti naseljenih zajednica između različitih tipova plastike: Profissimo kompostabilna (COMP), EarthRated® biorazgradiva (EPI), polietilen visoke gustoće (PEHD), polietilen niske gustoće (PELD) i polivinilklorid (PVC) (MPD $P < 0.05$)

3.5 Relativna abundancija i biovolumen svojta na odabranim vrstama plastičnog materijala

U uzorku PS1 najbrojnije su bile Pennate 10 s 32% ukupne abundancije, zatim slijede Pennate 9 s 22% i Pennate 6 s 20% ukupne abundancije (Slika 23. a). Najveći biovolumen analizirane zajednice, 77% od ukupnog biovolumena, zabilježen je u uzorku PS1 i pripada svojti Ciliophora, slijede *Achnanthes sp. 1* s 8% i *Licmophora sp. 3* sa 6% od ukupnog biovolumena (Slika 23. b).

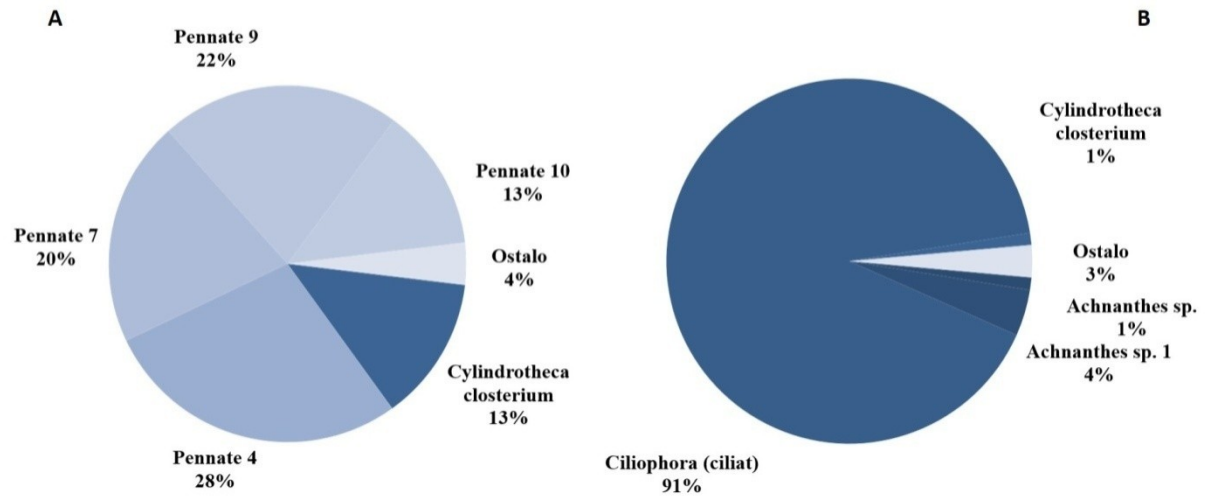
PS 1



Slika 23. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PS1(a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom

U uzorku PS2 najbrojnije su bile Pennate 4 s 28% ukupne abundancije, zatim slijede Pennate 9 s 22% i Pennate 7 s 20% ukupne abundancije (Slika 24. a). Najveći biovolumen analizirane zajednice zabilježen u uzorku PS2 pripada svojti Ciliophora s 91% od ukupnog biovolumena, a slijede *Achnanthes sp. 1* s 4% te *Achnanthes sp.* i *Cylindrotheca closterium* oba s po 1% od ukupnog biovolumena (Slika 24. b).

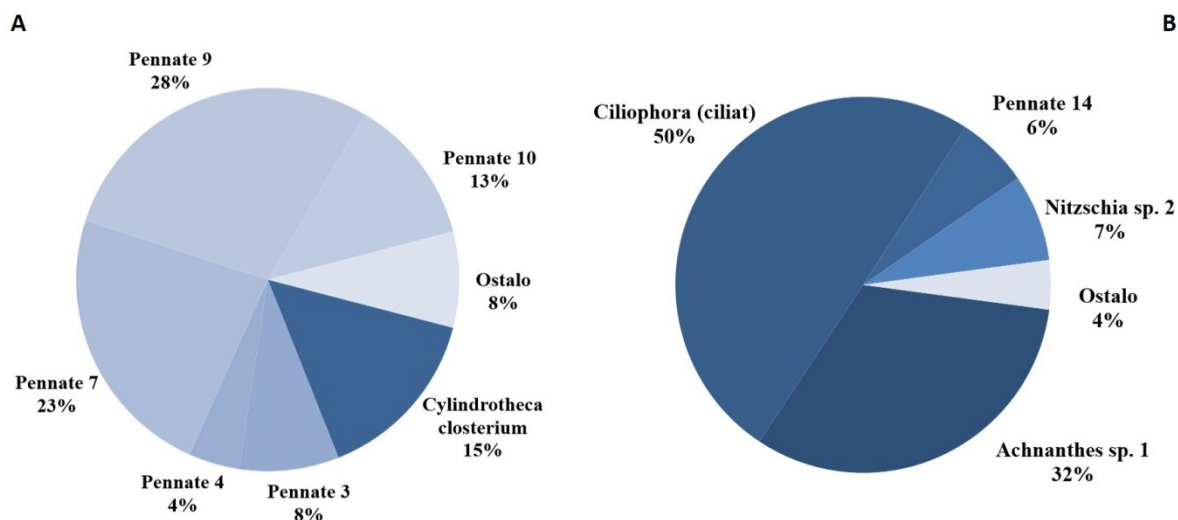
PS 2



Slika 24. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PS2 (a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom .

U uzorku PS3 najbrojnije su bile Pennate 9 s 28% od ukupne abundancije, zatim slijede Pennate 7 s 23% i vrsta *Cylindrotheca closterium* s 15% od ukupne abundancije (Slika 25. a). Najveći biovolumen analizirane zajednice zabilježen u uzorku PS3 pripada svojti Ciliophora s 50% od ukupnog biovolumena, te slijede *Achnanthes sp. 1* s 32% i *Nitzschia sp. 2* sa 7% od ukupnog biovolumena (Slika 25. b).

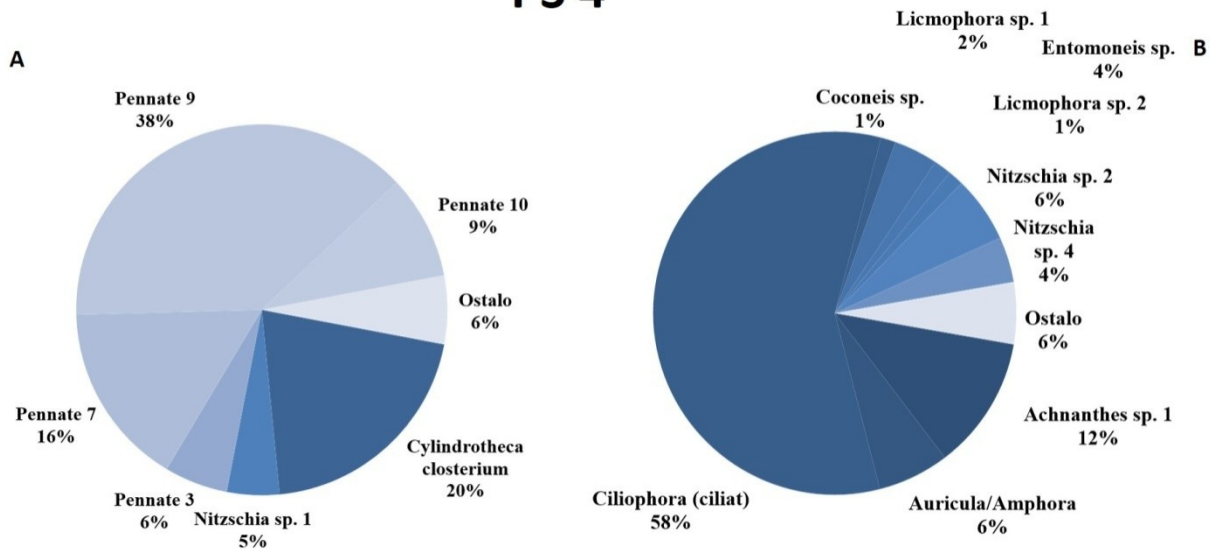
PS 3



Slika 25. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PS3 (a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom

U uzorku PS4 najbrojnije su bile Pennate 9 s 38% od ukupne abundancije, zatim slijedi vrsta *Cylindrotheca closterium* s 20% i Pennate 7 sa 16% od ukupne abundancije (Slika 26. a). Najveći biovolumen analizirane zajednice zabilježen u uzorku PS4 pripada svojti Ciliophora s 58% od ukupnog biovolumena, a slijede *Achnanthes sp. 1* s 12% te *Nitzschia sp. 2* i *Auricula/Amphora* obje s po 6% od ukupnog biovolumena (Slika 26. b).

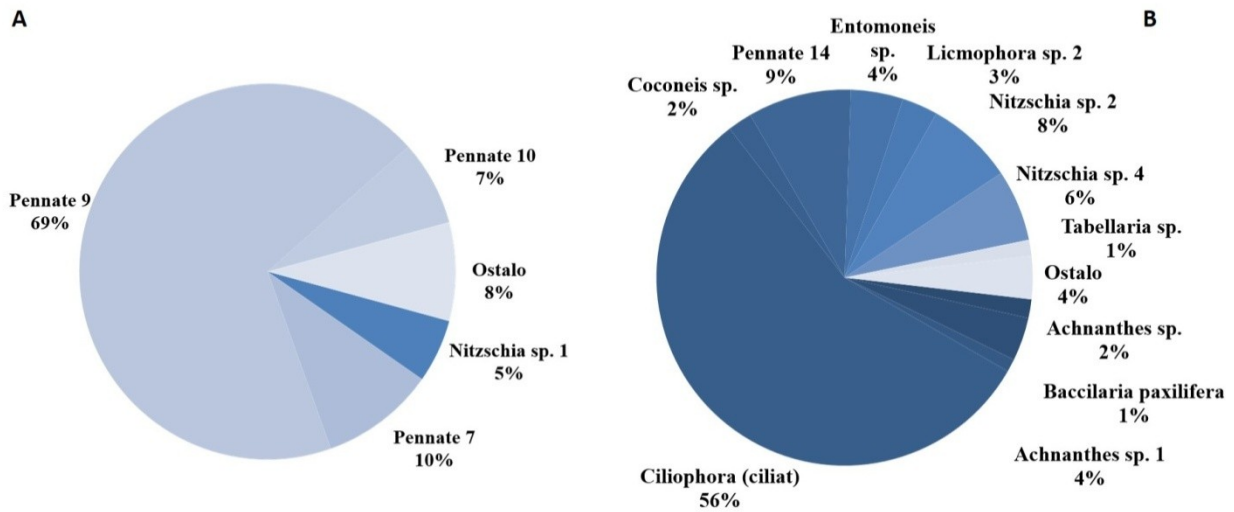
PS 4



Slika 26. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PS4 (a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom

U uzorku PS5 najbrojnije su bile Pennate 9 s 69% od ukupne abundacije, zatim slijede Pennate 7 s 10% i Pennate 10 sa 7% od ukupne abundacije (Slika 27. a). Najveći biovolumen analizirane zajednice zabilježen u uzorku PS5 pripada svojti Ciliophora s 56% od ukupnog biovolumena, a slijede Pennate 14 s 9% i *Nitzschia sp. 2* s 8% od ukupnog biovolumena (Slika 27. b).

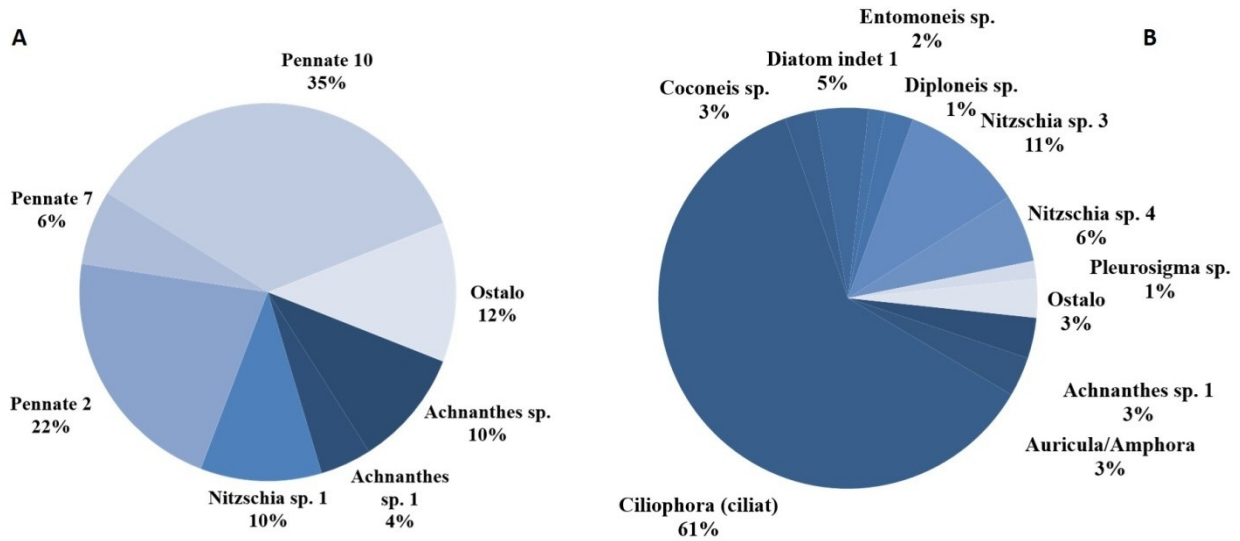
PS 5



Slika 27. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PS5 (a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom

U uzorku PW1 najbrojnije su bile Pennate 10 s 35% od ukupne abundancije, zatim slijede Pennate 2 s 22% i *Achnanthes sp.* i *Nitzschia sp.1* s po 10% od ukupne abundancije (Slika 28. a). Najveći biovolumen analizirane zajednice zabilježen u uzorku PW1 pripada svojti Ciliophora sa 61% od ukupnog biovolumena, te slijede *Nitzschia sp. 3* s 11% i *Nitzschia sp. 4* sa 6% od ukupnog biovolumena (Slika 28. b).

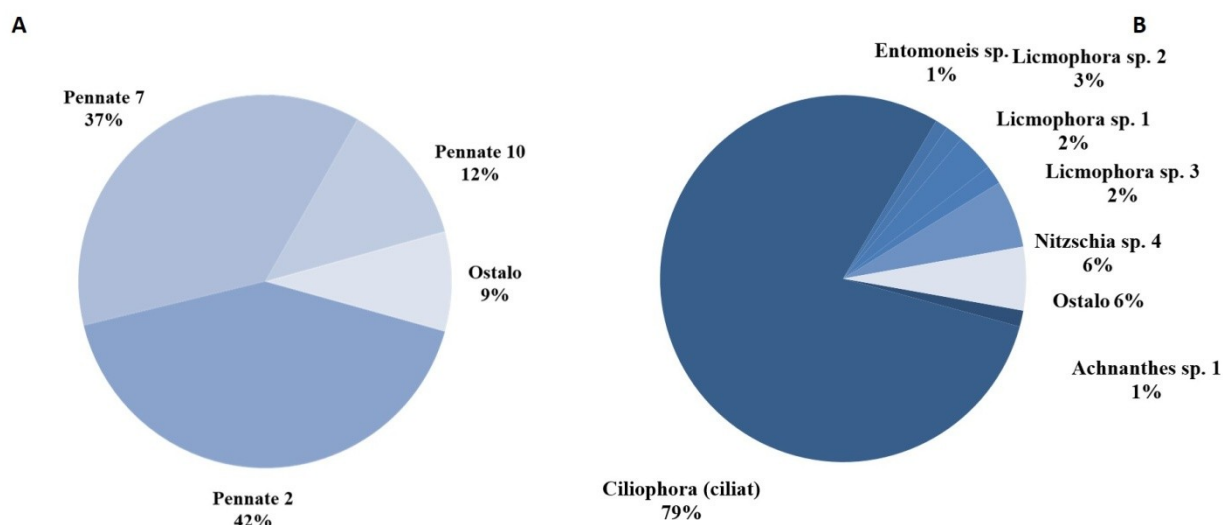
PW 1



Slika 28. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PW1 (a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom

U uzorku PW2 najbrojnije su bile Pennate 2 s 42% od ukupne abundancije, zatim slijede Pennate 7 s 37% i Pennate 10 s 12% od ukupne abundancije (Slika 29. a). Najveći biovolumen analizirane zajednice zabilježen u uzorku PW2 pripada svojti Ciliophora sa 79% od ukupnog biovolumena, te slijede *Nitzschia sp. 4* sa 6% i *Licmophora sp. 2* s 3% od ukupnog biovolumena (Slika 29. b).

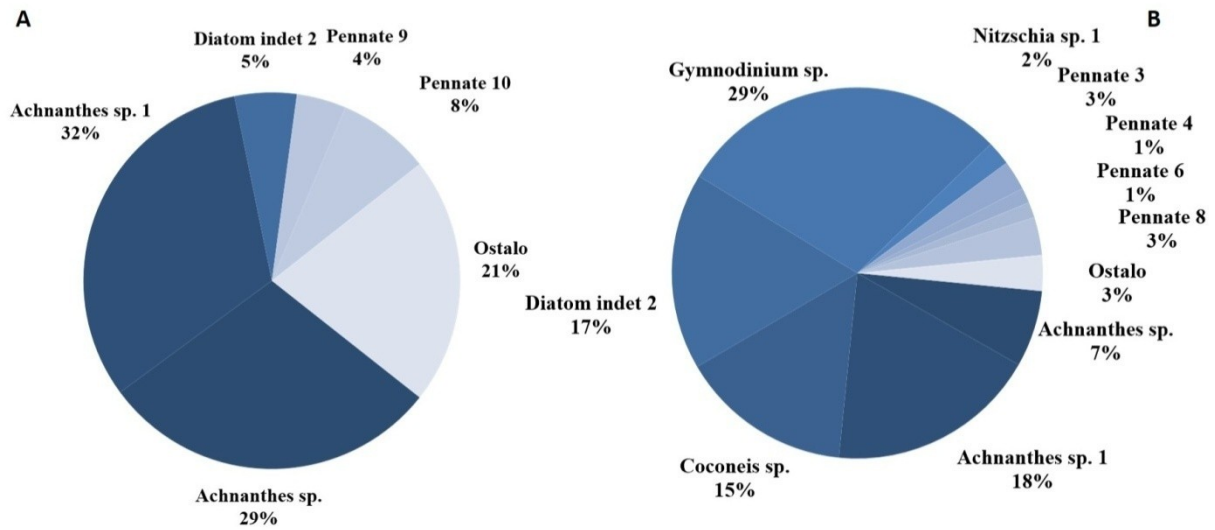
PW 2



Slika 69. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PW2 (a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom

U uzorku PW3 najbrojnije su bile *Achnanthes sp. 1* s 32% od ukupne abundancije, zatim slijede *Achnanthes sp.* s 29% i Pennate 10 s 8% od ukupne abundancije (Slika 30. a). Najveći biovolumen analizirane zajednice zabilježen u uzorku PW3 pripada svojti *Gymnodinium sp.* s 29% od ukupnog biovolumena, te slijede *Achnanthes sp. 1* s 18%, Diatom indet 2 sa 17%, *Coconeis sp.* s 15% i *Achnanthes sp.* sa 7% od ukupnog biovolumena (Slika 30. b).

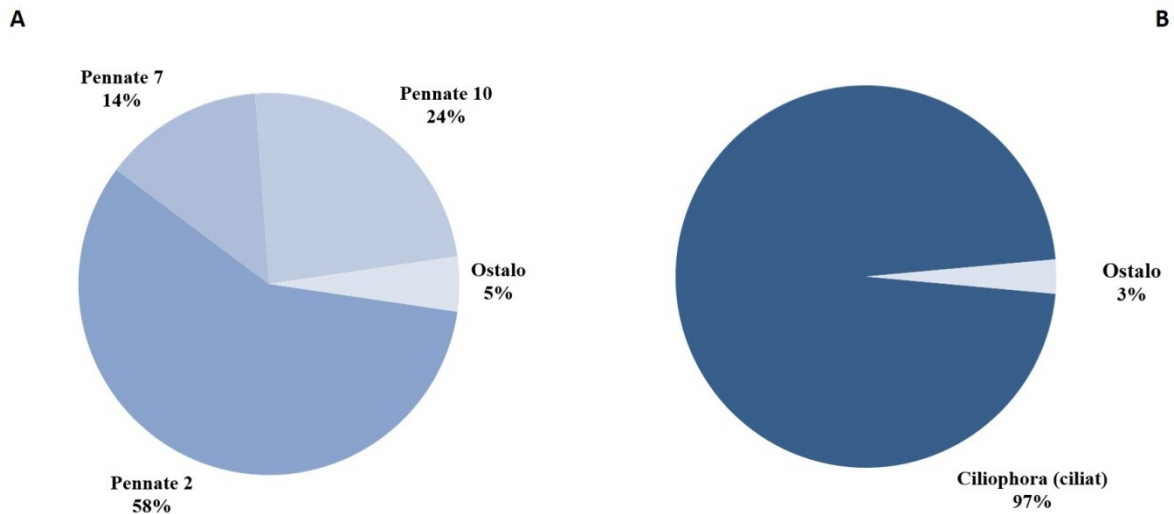
PW 3



Slika 30. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PW3 (a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom

U uzorku PW4 najbrojnije su bile Pennate 2 s 58% od ukupne abundancije, zatim slijede Pennate 10 s 24% i Pennate 7 s 14% od ukupne abundancije (Slika 31. a). U uzorku PW4 dominira svojta Ciliphora s 97% od ukupnog biovolumena, te sve ostale vrste zajedno sudjeluju sa samo 3% od ukupnog biovolumena (Slika 31. b).

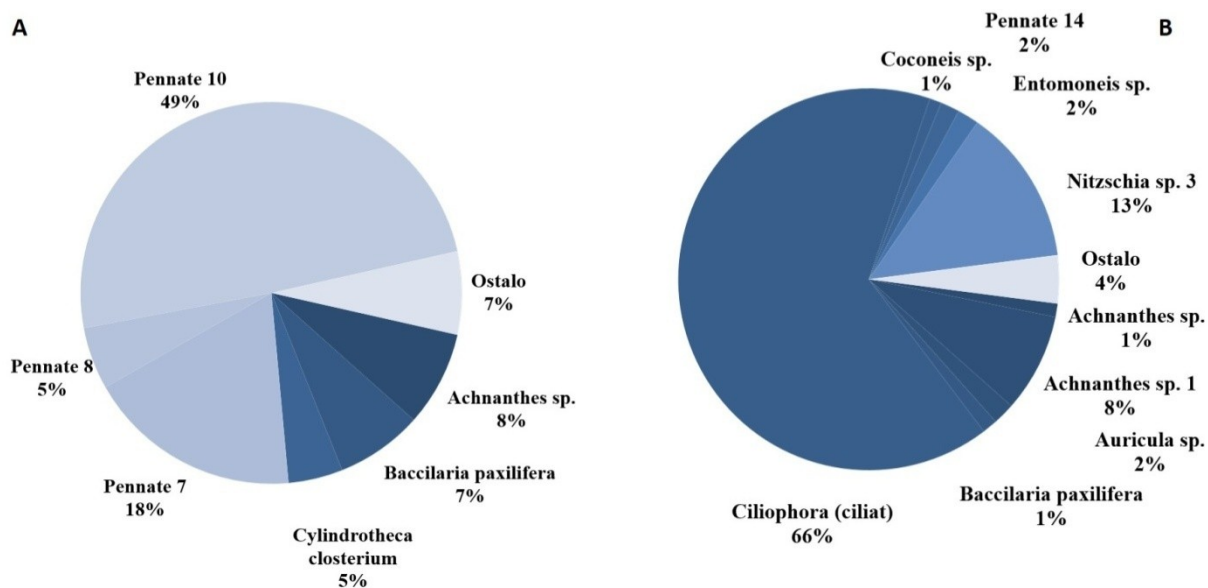
PW 4



Slika 31. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PW4 (a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom

U uzorku PW5 najbrojnije su bile Pennate 10 s 49% od ukupne abundancije, zatim slijede Pennate 7 s 18% i *Achnanthes sp.* s 8% od ukupne abundancije (Slika 32. a). Najveći biovolumen analizirane zajednice zabilježen u uzorku PW5 pripada svojti Ciliophora sa 66% od ukupnog biovolumena, te slijede *Nitzschia sp.* 3s 13% i *Achnanthes sp.* 1 s 8% od ukupnog biovolumena (Slika 32. b).

PW 5



Slika 32. Relativna abundancija i biovolumen dominantnih svojti u uzorku PW5 (a) najbrojnije svojte i (b) svojte s najvećim biovolumenom

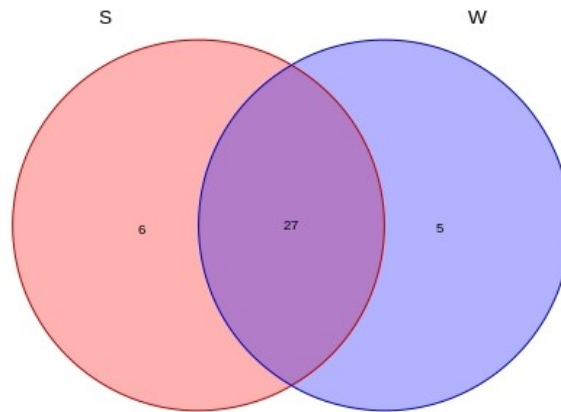
Usporedbom istih materijala u različitim sezonama izdvojile su se tri svojte dijatomeja: Pennate 7, Pennate 9 i Pennate 10. Ove tri vrste su najbrojnije i zajedničke svim uzorcima (Tablica 4.) Svojta Pennate 10 je najbrojnija svojta koja je zajednička svim uzorcima.

Tablica 4. Usporedba sezona kod analiziranih plastičnih materijala

Materijal	Najbrojnije zajedničke svojte	Postotak u ljetnoj sezoni %	Postotak u zimskoj sezoni %
P1	Pennate 10	32	35
	Pennate 7	18	6
P2	Pennate 7	20	37
	Pennate 10	13	12
P3	Pennate 9	28	4
	Pennate 10	13	8
P4	Pennate 10	9	24
	Pennate 7	16	14
P5	Pennate 10	7	49
	Pennate 7	10	18

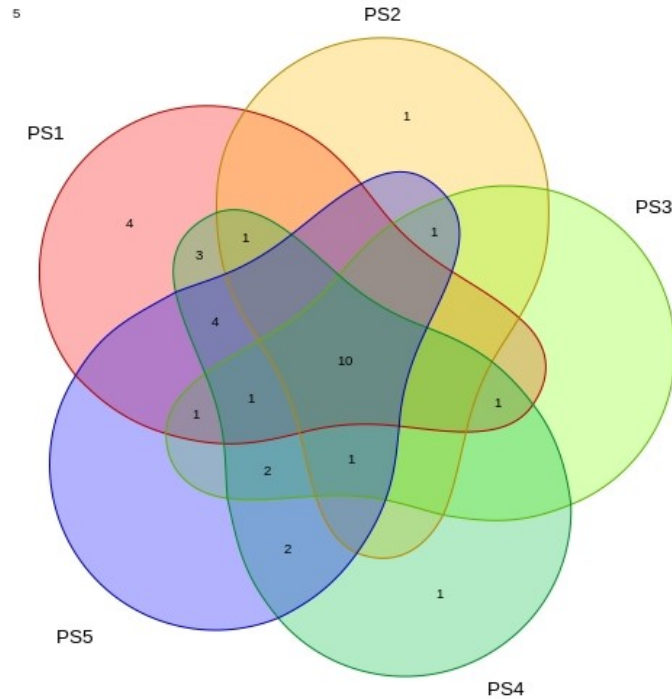
3.6 Analiza zajednice prema sezoni i vrsti plastičnog materijala

U svim sezonama zabilježeno je 27 zajedničkih svojti. Zabilježeno je 6 svojti koje se pojavljuju samo ljeti (Slika 33.), to su: *Diploneis bombus*, *Nitzschia sp. 2*, Pennate 5, Pennate 11, Pennate12 i Pennate13. Zabilježeno je 5 svojta koje se pojavljuju samo zimi, to su (Slika 33.): *Auricula sp.*, Diatom indet. 2, *Diploneis sp.*, *Gymnodinium sp.* i Pennate 2.



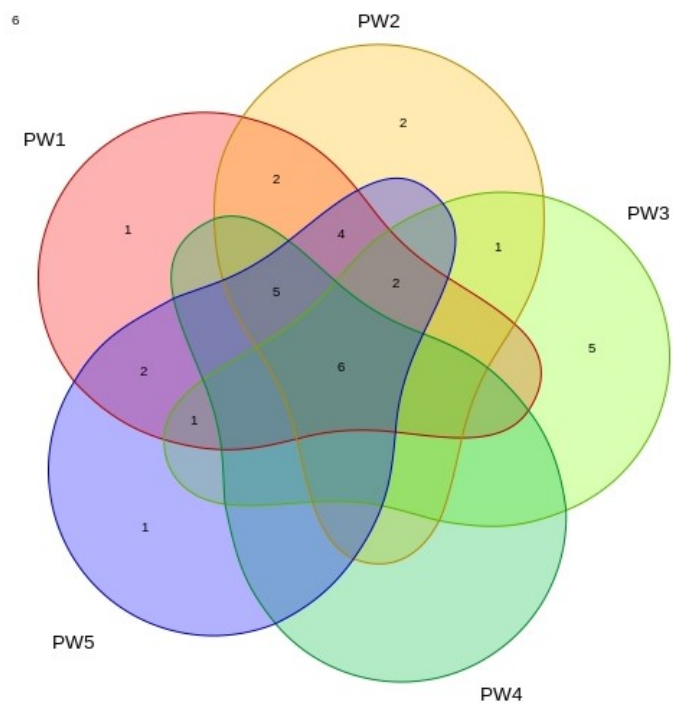
Slika 33. Svojte po sezoni

U ljetnom eksperimentu karakteristične svojte imali su uzorci PS1, PS2 i PS4 (Slika 34.). Uzorak PS1 sadržavao je 4 specifične svojte pronađene samo u tom uzorku: *Nitzschia sp. 3*, Pennate 5, Pennate 6, Pennate 11. U uzorku PS2 zabilježena je jedna specifična svojta, Pennate 12 dok je u uzorku PS4 to bila vrsta *Diploneis bombus*. Uzorci PS3 i PS5 nisu imali specifične svojte. Svi ljetni uzorci imali su 10 zajedničkih svojti, i to: *Achnanthes sp.*, *Achnanthes sp. 1*, *Baccilaria paxilifera*, Ciliophora (ciliat), *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia sp. 1*, Pennate 7, Pennate 8, Pennate 9, Pennate 10. Najveći broj zajedničkih svojti zabilježen je između PS1, PS4 i PS5 i to su bile: *Entomoneis sp.*, *Licmophora sp. 2*, *Nitzschia sp. 4*, *Nitzschia sp. 5*.



Slika 34. Svojte po plastičnom materijalu u ljetnoj sezoni

U zimskom eksperimentu karakteristične svojte imali su uzorci PW2, PW1, PW3 i PW5 (Slika 35.). Uzorak PW3 imao je 5 specifičnih svojti: Diatom indet 2, *Gymnodinium sp.*, Pennate 3, Pennate 4, Pennate 9. Uzorak PW2 imao je 2 specifične svojte: *Licmophora sp.* 3, *Tabellaria sp.*. Samo jedna specifična svojta zabilježena je u uzorku PW1, bila je to *Pleurosigma sp.*, kao i u uzorku PW5, i to *Auricula sp.*. Uzorak PW4 nije imao specifične vrste. Svi zimski uzorci imali su 6 zajedničkih svojti i to su bile: *Achnanthes sp.*, *Coconeis sp.*, *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia sp.* 1, Pennate 7, Pennate 10. Najveći broj zajedničkih svojti bio je između PW1, PW2, PW4, PW5 i to slijedećih pet svojti: *Baccilaria paxilifera*, Ciliophora (ciliat), Diatom indet 1, Pennate 1, Pennate 2.



Slika 35. Svojte po plastičnom materijalu u zimskoj sezoni

Svojte koje su bile prisutne u svim uzorcima i u svim sezonama su: *Achnanthes* sp., *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia* sp. 1, Pennate 7, Pennate 10.

4. RASPRAVA

Sve prirodne i umjetne površine koje su uronjene u more, podložne su obraštaju. Odmah nakon uranjanja stvara se kondicionirajući film (Bakker i sur. 2003; Bhosle i sur. 2005; Loeb i Neihof 1975) koji regulira naseljavanje drugih organizama, odnosno obraštaja. U početku su se istraživanja o obraštaju fokusirala na sprječavanje formiranja obraštaja na brodovima kako bi se smanjila potrošnja goriva. Danas je u vodene ekosustave unesen novi supstrat (materijal) – plastika. Plastika u more dospijeva u obliku smeća (litter/debris) ili predmeta koji služe čovjeku (plutače, konopi, pontoni, alati za marikulturu), a na njoj se također formira biofilm i nastanjuju organizmi. Istraživan je obraštaj na raznim materijalima kao što su drvo, metal, staklo i plastika te su uspoređivani (Nenadović i sur., 2015). Danas se istraživanja fokusiraju pretežito na obraštaj na plastici odnosno razne vrste plastike, a tu spada i zadnja pridošlica, biorazgradiva plastika. Spoznaje o obraštaju na biorazgradivoj plastici su minimalne, Eich i suradnici (2015) te Pauli i suradnici (2017) daju informacije o obraštaju i razgradnji tih materijala u *in situ* eksperimentima. Masó i suradnici (2016) te Reisser i suradnici (2014) su prikupljali plastični otpad mrežama iz morskog stupca, te analizirali obraštaj na njemu.

U ovom radu utvrđeno je da u trenutku kad plastika počinje tonuti, to jest nakon 11 dana u ljetnoj sezoni i 13 dana u zimskoj sezoni, na njoj je prisutan početni obraštaj kojega čine 95% dijatomeje (i čestice sedimenta) te nema makroorganizama. Razlika u potrebnom vremenu da plastika potone nije značajna, no puno faktora može utjecati na tonjenje, na primjer, utjecaj valova i suspendirani sediment koji se lijepi za biofilm. U ovom eksperimentu testirana je plovnost svakog komadića plastike nakon odstranjenja obraštaja, pri čemu je svaki uzorak plutao nakon odstranjenja obraštaja, čime dokazujemo da je razlog potonuća bio obraštaj, što je u skladu s rezultatima istraživanja Lobelle i Cunliffe (2011) i Ye i Andrady (1991).

U ovom eksperimentu pronađeno je 38 svojiti mikroorganizama na 5 različitih vrsta plastike (PVC, PEHD, PELD, i dvije biorazgradive), od kojih 36 svojiti pripada dijatomejama, jedna dinoflagelatima i jedna cilijatima. Sve determinirane svojite dijatomeja pripadaju penatama (Pennales) koje inače prevladavaju u bentosu. U literaturi se kao najčešće vrste u biofilmu spominju dijatomeje iz roda *Licmophora*, *Cocconeis* i *Achnanthes* (Masó i sur. 2016; Mejđandžić i sur. 2015; Mihalić i sur. 2008; Munda, 2005; Reisser i sur. 2014; Totti i sur.

2007). Te vrste su prisutne i u uzorcima iz ovog istraživanja, ali nisu među najbrojnijima. Najčešće vrste u ovom eksperimentu su male penatne dijatomeje (Pennate 7, Pennate 9, Pennate 10). Totti i sur. (2007) su utvrdili da se gustoća vrste *Nitzschia longissima* povećava zimi, međutim u ovom eksperimentu gustoća *Cylindrotheca closterium/Nitzschia longissima* grupe bila je veća ljeti. Razlika se može objasniti s tim da su uzorci iz eksperimenta Totti i suradnika (2007) bili duže uronjeni u more te se zajednica uspjela stabilizirati.

Razlika u broju svojta između ljetne i zimske sezone je zanemariva, 34 ljeti i 32 zimi što je u skladu s rezultatima eksperimenta provedenog u Piranu (Munda 2005). Broj svojti po uzorku neznajno varira u obje sezone, u ljetnoj sezoni najviše svojti pronađeno je na PS4 odnosno EarthRated® (26 svojti) i na PS1 odnosno PVC (25), a najmanje na PS2 odnosno PEHD (14 svojti). U zimskoj sezoni najviše svojti je pronađeno na PW1 odnosno PVC (23), dok je najmanje pronađeno na PW4 odnosno EarthRated® (11). Može se zaključiti da je na PVC u obje sezone bio visok broj svojti, ali kod EarthRated® broj svojti vidljivo varira između sezona. Takva razlika može se objasniti razlikom temperature i povećanom količinama UV zračenja koji imaju utjecaj na EarthRated®, odnosno na EPI aditive koji razgrađuju plastiku.

Kod relativne abundancije po sezoni razlika je bila izražena, abundancija je naime 15 puta veća u ljetnoj sezoni, odnosno 20509 stanica/cm² prema 1342 stanica/cm² u zimskoj sezoni. Totti (2007) je utvrdila jednako smanjenje abundancije u zimskoj sezoni. U ljetnoj sezoni uzorci s najvećom gustoćom populacije su PS1 odnosno PVC (41361 stanica/cm²) i zatim PS4 odnosno EarthRated® (26411 stanica/cm²). Najniža gustoćom populacije u ljetnoj sezoni utvrđena je na PS2 odnosno PEHD (7230 stanica/cm²). Međutim u zimskoj sezoni najveća gustoćom populacije pronađena je na PW2 odnosno PEHD (3509 stanica/cm²) i na PW1 odnosno PVC (2319 stanica/cm²). Može se zaključiti da je gustoća populacije na PVC-u među višima u obje sezone a kod PEHD vidljivo varira sezonski. Sezonska varijacija može se objasniti kao utjecaj temperature i UV zračenja na materijal (PEHD), odnosno fizičke promjene.

Prosječni biovolumen po sezoni je neznajno veći zimi (241855 μm^3), nego ljeti (235872 μm^3). Zaključuje se da iako ima razlike u gustoći populacije među sezonama, nema značajnih razlika u biovolumenu. Najveći biovolumen u ljetnoj sezoni izmjeren je na uzorku PS1 odnosno PVC-u (452784 μm^3), a najmanji biovolumen izmjeren je na uzorku PS2

odnosno PEHD (136994 μm^3), što se podudara s rezultatima relativne abundancije. U zimskoj sezoni je najveći biovolumen izmjeren na uzorku PW1 odnosno PVC (359438 μm^3), a najmanji na uzorku PW3 odnosno PELD (30272 μm^3). Može se zaključiti da je u obje sezone najveći biovolumen izmjeren na PVC-u a najmanji na PE materijalima, PEHD ljeti, a PELD zimi.

Razlika zajednica prema gustoći populacije zabilježena je između sezona, ali ne i po biovolumenu i svojatama. Zaključuje se da iste svojte nastanjuju sve vrste plastike sličnim biovolumenom u ljetnoj i zimskoj sezoni, ali njihova gustoća varira. To se može objasniti time da su zimi stanice veće, odnosno sporije se dijele te je prisutan manji broj krupnijih stanica, a ljeti se stanice brže dijele te je prisutno više malih stanica. Ako pretvorimo biovolumen u biomasu možemo zaključiti da u obje sezone je bila potrebna slična biomasa da bi plastika potonula.

Plastični materijali PVC i EarthRated® su imali najviše svojta, najveću gustoću stanica i najveći biovolumen u ljetnoj sezoni, no te razlike nisu statistički značajne. U obje sezone na materijalu PVC je prisutan najveći broj svojti, najviša gustoća stanica i najviši biovolumen, ali razlike nisu statistički značajne.

Usporedbom svih plastičnih materijala po morfologiji i biovolumenu utvrđeno je da postoji mala, ali statistički značajna razlika između materijala PELD i ostalih vrsta plastičnih materijala. Eich i suradnici (2015) nisu utvrdili statistički značajnu razliku između biorazgradivog i PE plastičnog materijala, ali vidljivo je da na PE ima manje stanica.

Između sezona je prisutno 27 zajedničkih svojti, 6 svojti se pojavljuje samo u ljetnoj sezoni, to su: *Diploneis bombus*, *Nitzschia sp. 2*, Pennate 5, Pennate 11, Pennate12 i Pennate13. Svojta *Nitzschia sp. 2* je zastupljen između najvišim biovolumenima u uzorcima PS3 (PELD), PS4 (EarthRated®) i PS5 (Profissimo kompostabilna). U ljetnoj sezoni ni jedna od specifičnih svojta nije bila među najbrojnijima. U zimskoj sezoni pojavljuje se 5 karakterističnih svojti, a to su: *Auricula sp.*, *Diatom indet. 2*, *Diploneis sp.*, *Gymnodinium sp.* i Pennate 2. U uzorku PW1 (PVC) svojta *Diploneis sp.* je među najvećim biovolumenima, u uzorku PW3 (PELD) najveći biovolumen imaju *Diatom indet. 2* i *Gymnodinium sp.* U uzorku PW5 (Profissimo kompostabilna) svojta *Auricula sp.* je među najvišim biovolumenima. U uzorcima PW1 (PVC), PW2 (PEHD) i PW4 (EarthRated®) svojta Pennate 2 je među

najbrojniji svojtama, a u PW3 (PELD) je Diatom indet. 2. Svojte koje su bile prisutne u svim uzorcima i u svim sezonama su: *Achnanthes* sp., *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia* sp. 1, Pennate 7, Pennate 10, te možemo ih definirati opurtonističkim vrstama.

Vrste koje su bile najbrojnije nemaju veliki biovolumen i one koje imaju najveći biovolumen nisu najbrojnije. Najveći biovolumen pripada svojtama *Ciliophora* i *Gymnodinium* sp.. Zanimljivo je da u jedinom uzorku (PW3) u kojem nije bila prisutna svojta *Ciliophora*, je bila prisutna svojta *Gymnodinium* sp.. Odnos ukazuje na kompeticiju za hranu ili prostor, no potrebna su daljnja istraživanja za njegovo razumijevanje.

Najbrojnije svojte su male dijatomeje: Pennate 9 i Pennate 10. Svojta Pennate 10 je bila prisutna u svih 10 uzoraka i među najbrojnijima u svakom uzorku. Pretpostavlja se da se takav fenomen može pripisati tome da kako se plastični film savija, djelovanjem valova i morskih struja (plima i oseka), otežava prihvaćanje velikih svojti dijatomeja, odnosno savijanjem filma velike dijatomeje budu "odlijepljene" s površine. Ovu pretpostavku treba dalje istražiti jer može pomoći u ciljanom uzgoju dijatomejskog biofilma koji se koristi za pričvršćivanje mlađi raznih beskralješnjaka u marikulturi.

5. ZAKLJUČAK

- 1) Plastični listovi 5 različitih vrsta plastike (PVC, PEHD, PELD, Earth Rated® i Profissimo kompostabilna) počinju tonuti nakon 11 dana u ljetnoj sezoni, a nakon 13 dana u zimskoj sezoni.
- 2) Početni obraštaj na 5 različitih vrsta plastike (PVC, PEHD, PELD, Earth Rated® i Profissimo kompostabilna) sastavljen je od 38 svojti mikroorganizama, od kojih 36 svojti pripada dijatomejama, jedna dinoflagelatima i jedna cilijatima. Sve determinirane svojite dijatomeja pripadaju penatama (Pennales). Najbrojnije svojite su male dijatomeje: Pennate 9 i Pennate 10. Razlika između sezona postoji samo u pogledu gustoće populacije, po biovolumenu i svojtama nema značajne razlike. Abundancija stanica je 15 puta veća u ljetnoj sezoni (20509 stanica/cm²) nego u zimskoj sezoni (1342 stanica/cm²). Usporedbom svih uzoraka po morfologiji i biovolumenu utvrđeno je da postoji mala, ali statistički značajna razlika između materijala PELD i ostalih vrsta plastičnih materijala.
- 3) Na plastičnom materijalu PVC u obje sezone je prisutan najveći broj svojti, najviša gustoća stanica i najviši biovolumen, ali razlike nisu statistički značajne. Zaključuje se da nema plastičnog materijala sa značajno više obraštaja.

6. LITERATURA

- Accinelli, C., Saccà, M.L., Mencarelli, M., Vicari, A., 2012. „Deterioration of bioplastic carrier bags in the environment and assessment of a new recycling alternative“. *Chemosphere* 89(2): 136–43.
- Anderson, N.J. 1990. „Inferring diatom paleoproduction and lake trophic status from fossil diatom assemblages“. *Mem. California Acad. Sci* 17: 539–47.
- Aubry, F.B., Berton, A., Bastianini, M., Socal, G., Acri, F., 2004. „Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990–1999)“. *Continental shelf research* 24(1): 97–115.
- Baier, R.E. 1972. „Proceedings of the Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling“. U National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD, 633–39.
- Bakker, D.P., Klijnstra, J.W., Busscher, H.J., van der Mei, H.C. 2003. „The Effect of Dissolved Organic Carbon on Bacterial Adhesion to Conditioning Films Adsorbed on Glass from Natural Seawater Collected during Different Seasons“. *Biofouling* 19(6): 391–97.
- Battarbee, R.W., Mason, J., Renberg, I., Talling, J.F., 1990. *Palaeolimnology and lake acidification*. The Royal Society.
- Batterbee, R.W., Charles, D.F., Dixit, S.S., Renberg, I. 1999. „Diatoms as indicators of surface water acidity“. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences* 85: 127.
- Bennion, H., Monteith, D., Appleby, P., 2000. „Temporal and geographical variation in lake trophic status in the English Lake District: evidence from (sub) fossil diatoms and aquatic macrophytes“. *Freshwater Biology* 45(4): 394–412.
- Bhosle, N.B., Garg, A., Fernandes, L., Citon, P., 2005. „Dynamics of amino acids in the conditioning film developed on glass panels immersed in the surface seawaters of Dona Paula Bay“. *Biofouling* 21(2): 99–105.
- Bos, R., Van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1999. „Physico-chemistry of initial microbial

- adhesive interactions—its mechanisms and methods for study“. *FEMS microbiology reviews* 23(2): 179–230.
- Charles, D.F., Smol, J.P., 1990. „The PIRLA II project: regional assessment of lake acidification trends“. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen* 24(1): 474–80.
- Compère, C., Bellon-Fontaine, M.N., Bertrand, P., Costa, D., Marcus, P., Poleunis, C., Pradier, C.M., Rondot, B., Walls, M.G., 2001. Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling*, 17(2), pp.129-145.
- Cooksey, B. 1984. „The attachment of microfouling diatoms“. U: Costlow, J. D., Tipper, R. C. (eds.) *Marine biodeterioration: an interdisciplinary study*, pp. 167–171. US Naval Institute Press, Annapolis.
- Cumming, B F. 1993. „Diatoms and their relationship to salinity and other limnological characteristics from 65 Cariboo/Chilcotin region (British Columbia, Canada) lakes“. *Hydrobiologia* 269: 179–96.
- de Rincon, O., Morris, E., Romero, M., Andrade, S., 2001. „The Effect of *Pelo de Oso* (*Garveia Franciscana*) on Different Materials in Lake Maracaibo“. U *CORROSION* 2001, NACE International.
- DeNicola, D.M., McIntire, C.D., 1990. Effects of substrate relief on the distribution of
- Derjaguin, B., Landau, L. 1941. „Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes“. *Acta Physicochim. USSR* 14: 633–662.
- Edgar L.A., Pickett-Heaps J.D. 1984 Diatom locomotion. *Prog Phycol Res* 3:49–88
- Eich, A., Mildenerger, T., Laforsch, C., Weber, M., 2015. „Biofilm and diatom succession on polyethylene (PE) and biodegradable plastic bags in two marine habitats: Early signs of degradation in the pelagic and benthic zone?“ *PLoS ONE* 10(9): 1–16.
- Encyclopedia Britannica, 2016. Britannica Academic.
- Engstrom, D.R., Swain E.B., Kingston J.C. 1985. „A palaeolimnological record of human

- disturbance from Harvey's Lake, Vermont: geochemistry, pigments and diatoms". *Freshwater Biology* 15(3): 261–288.
- Fazey, F.M.C., Ryan P.G. 2016. „Biofouling on buoyant marine plastics: An experimental study into the effect of size on surface longevity“. *Environmental Pollution* 210: 354–60.
- Fera, P. 1985. „Etude expérimentale de la colonisation par les bactéries de surfaces immergées en milieu marin“.
- Flemming, H.C., Schaule G., McDonogh R., Ridgway H.F.. 1994. „Effects and extent of biofilm accumulation in membrane systems“. *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*: 63–89.
- Fletcher, M., Pringle H.J.. 1985. „The effect of surface free energy and medium surface tension on bacterial attachment to solid surfaces“. *Journal of Colloid and Interface Science* 104(1): 5–14.
- Fritz, S.C. 1990. „Twentieth-century salinity and water-level fluctuations in Devils Lake, North Dakota: Test of a diatom-based transfer function“. *Limnology and Oceanography* 35(8): 1771–81.
- Hamilton, P.B, Duthie, H.C., 1984. „Periphyton colonization of rock surfaces in a boreal forest stream studied by scanning electron microscopy and track autoradiography“. *Journal of Phycology* 20(4): 525–32.
- Hendey, N I. 1964. *Introductory account of the smaller algae of British coastal waters, part v- bacillariophyceae.*
- Higgins, J.M., Crawford, S.A., Mulvaney, P., Wetherbee, R., 2000. „The topography of soft, adhesive diatom ‘trails’ as observed by atomic force microscopy“. *Biofouling* 16(2–4): 133–139.
- Juggins, S. 1992. „Diatoms in the Thames estuary, England“.
- Kaiser, D., Kowalski N., Waniek, J.J.. 2017. „Effects of biofouling on the sinking behavior of microplastics“. *Environmental Research Letters* 12(12).
- Kalff, J. 2002. *Limnology: Inland Water Ecosystems*. Prentice Hall.

- Korte, V.L., Blinn D.W.. 1983. „Diatom colonization on artificial substrata in pool and riffle zones studied by light and scanning electron microscopy“. *Journal of Phycology* 19(3): 332–341.
- Lehaitre, M., Delauney, L., Compère, C., 2008. Biofouling and underwater measurements. Real-time observation systems for ecosystem dynamics and harmful algal blooms: Theory, instrumentation and modelling. *Oceanographic Methodology Series*. UNESCO, Paris, pp.463-493,
- Lewin, J C. 1962. „Silicification p. 445-453“. Lewin, RA *Physiology and Biochemistry of Algae*. Academic Press. New York.
- Lewis, D.P., Piontkowski, J.M., Straney, R.W., Knowlton, J.J., Neuhauser, E.F., 1997. „Use of potassium for treatment and control of zebra mussel infestation in industrial fire protection water systems“. *Fire technology* 33(4): 356–71.
- Little, B.J. 1984 Succession in microfouling. In: Costlow, J.D.; Tipper, R.C., eds. *Marine biodeterioration: An interdisciplinary study*. London: E & F.N. Span Ltd.;; 63-67.
- Lobelle, D. Cunliffe, M., 2011. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*, 62(1), pp.197-200.
- Loeb, G.I., Neihof, R.A. 1975. „Marine conditioning films“. *Advances in Chemistry* 145(4): 319–35.
- López-Fuerte, F.O., Siqueiros-Beltrones, D.A., Veleza, L., Huerta-Quintanilla, D.A., 2017. „Species composition and assemblage structure of microfouling diatoms growing on fiberglass plates off the coast of Yucatán, Mexico“. *Hidrobiologica* 27(1): 23–27.
- MacIntyre, H.L., Geider, R.J., Miller, D.C., 1996. „Microphytobenthos: the ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production“. *Estuaries* 19(2): 186–201.
- Mahapatra, B.C., Sarkar, B., Barik, N.K., Jayasankar, P., 2011. *Application of Plastics in Aquaculture*.
- Maki, J.S., Rittschof, D., Costlow, J.D., Mitchell, R., 1988. „Inhibition of attachment of larval barnacles, *Balanus amphitrite*, by bacterial surface films“. *Marine Biology* 97(2):

199–206.

Margalef, R., 1983. *Limnologia*. Barcelona. Omega, 1(010).

Marini, M., Fornasiero, P., Artegiani, A., 2002. Variations of hydrochemical features in the coastal waters of Monte Conero: 1982–1990. *Marine ecology*, 23, pp.258-271.

Marshall, K.C., Stout, R., Mitchell, R., 1971. „Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces“. *Microbiology* 68(3): 337–48.

Masó, M., Fortuño, J.M., De Juan, S., Montserrat Demestre. 2016. „Microfouling communities from pelagic and benthic marine plastic debris sampled across Mediterranean coastal waters“. *Scientia Marina* 80(S1): 117–27.

Mejdandžić, M., Ivanković, T., Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Pfannkuchen, D.M., Hrenović, J., Ljubešić, Z., 2015. „Colonization of diatoms and bacteria on artificial substrates in the northeastern coastal Adriatic Sea“. *Acta Botanica Croatica* 74(2): 407–22.

Mihalić, .C., Viličić, D., Ahel, M., Burić, Z., Carić, M., 2008. „Periphytic algae development in the upper reach of the Zrmanja estuary (Eastern Adriatic Coast)“. *Vie et Milieu* 58(3–4): 203–13.

Ministarstvo Poljoprivrede,. 2015. „Nacionalni strateški plan razvoja akvakulture za razdoblje 2014-2020

Munda, I.M. 2005. „Seasonal fouling by diatoms on artificial substrata at different depths near Piran (Gulf of Trieste , Northern Adriatic)“. *Acta Adriatica* 46(2): 137–157.

Nenadović, T., Šarčević, T., Čižmek, H., Godrijan, J., Pfannkuchen, D.M., Pfannkuchen, M., Ljubešić, Z., 2015. „Development of periphytic diatoms on different artificial substrates in the Eastern Adriatic Sea“. *Acta Botanica Croatica* 74(2): 377–392.

Not, F., Siano, R., Kooistra, W.H., Simon, N., Vaultot, D., Probert, I., 2012. „Diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton“. U *Advances in Botanical Research*, Elsevier, 1–53.

O'Toole, G., Kaplan, H.B. Kolter, R., 2000. „Biofilm formation as microbial development“. : 49–79.

- Overbeek, J.Th.G., E.J.W. Verwey. 1948. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids: The interaction of Sol Particles Having an Electric Double Layer.
- Pauli, N.C., Petermann, J.S., Lott, C. Weber, M., 2017. „Macrofouling communities and the degradation of plastic bags in the sea: an in situ experiment“. Royal Society Open Science 4(10): 170549.
- periphyton in laboratory streams, i. hydrology 1. Journal of Phycology, 26(4), pp.624-633.
- Pethica, B.A. 1980. „Microbial and cell adhesion“. Microbial adhesion to surfaces: 19–45.
- Powell, M.S., Slater, N.K., 1983. „The deposition of bacterial cells from laminar flows onto solid surfaces“. Biotechnology and bioengineering 25(4): 891–900.
- Pradier, C.M., Bertrand, P., Bellon-Fontaine, M.N., Compere, C., Costa, D., Marcus, P., Poleunis, C., Rondot, B., Walls, M.G., 2000. „Adsorption of proteins on an AISI 316 stainless-steel surface in natural seawater“. Surface and interface analysis: An International Journal devoted to the development and application of techniques for the analysis of surfaces, interfaces and thin films, 30(1): 45–49.
- Reisser, J., Shaw, J., Hallegraeff, G., Proietti, M., Barnes, D.K., Thums, M., Wilcox, C., Hardesty, B.D., Pattiaratchi, C., 2014. „Millimeter-sized marine plastics: A new pelagic habitat for microorganisms and invertebrates“. PLoS ONE 9(6): 1–11.
- Richard, M., Maurice, J.T., Anginot, A., Paticat, F., Verdegem, M.C.J. Hussenot, J.M.E., 2010. „Influence of periphyton substrates and rearing density on *Liza aurata* growth and production in marine nursery ponds“. Aquaculture 310(1–2): 106–111.
- Richter, O. 1906. 2 Zur physiologie der Diatomeen.
- Riedl, R., 1991. Fauna e flora del Mediterraneo. Dalle alghe ai mammiferi; una guida sistematica alle specie che vivono nel mar Mediterraneo.
- Robb, I D. 1984. „Stereo-biochemistry and function of polymers“. U Microbial Adhesion and Aggregation, Springer, 39–49.
- Roberts, D., Rittschof, D., Holm E., Schmidt A.R. 1991. „Factors influencing initial larval

- settlement: temporal, spatial and surface molecular components“. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 150(2): 203–221.
- Ross, R., Sims, P.A., 1972. „The fine structure of the frustule in centric diatoms: a suggested terminology“. *British Phycological Journal* 7(2): 139–163.
- Round, F E. 1972. „Patterns of seasonal succession of freshwater epipelagic algae“. *British Phycological Journal* 7(2): 213–220.
- Round, F E. 1981. „The ecology of algae. 653 pp“. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Rubio, C. 2002. „Compréhension des mécanismes d’adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention“.
- Ryan, P.G. 2015. „Does size and buoyancy affect the long-distance transport of floating debris?“ *Environmental Research Letters* 10(8): 84019.
- Sabater, S., Gregory, S.V., Sedell, J.R., 1998. „Community dynamics and metabolism of benthic algae colonizing wood and rock substrata in a forest stream“. *Journal of Phycology* 34(4): 561–67.
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romani, A., Vidal, G., Klünder, C., Mechthild S. 2007. „Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface“. *Analytical and bioanalytical chemistry* 387(4): 1425–34.
- Sládečková, A. 1962. „Limnological investigation methods for the periphyton (“Aufwuchs”) community“. *The Botanical Review* 28(2): 286–350.
- Smetacek, V. 1999. „Diatoms and the ocean carbon cycle“. *Protist* 150(1): 25–32.
- Smol, J.P., Brown, S.R. and McNeely, R.N., 1983. „Cultural disturbances and trophic history of a small meromictic lake from central Canada“. *U Paleolimnology*, Springer, 125–30.
- Smol, J.P., Cumming, B.F., 2000. „Tracking long-term changes in climate using algal indicators in lake sediments“. *Journal of Phycology* 36(6): 986–1011.
- Society of the Plastics Industry, (SPI), 1988, (https://www.ryedale.gov.uk/attachments/article/690/Different_plastic_polymer_types.p

df). zadnje pregledano: 07.01.2019.

Spaulding, S., Esposito, R., Lubinski, D., Horn, S., Cox, M., McKnight, D., Alger, A., Hall, B., Mayernick, M., Whittaker, T., Yang, C. Antarctic Freshwater Diatoms web site, McMurdo Dry Valleys LTER, zadnji pregled 17.9.2018 na <http://huey.colorado.edu/diatoms/>

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002 Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), pp: 187–209.

Sun, J., Liu, D., 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of plankton research*, 25(11), pp.1331-1346.

Totti, C., Civitarese, G., Acri, F., Barletta, D., Candelari, G., Paschini, E. and Solazzi, A., 2000. Seasonal variability of phytoplankton populations in the middle Adriatic sub-basin. *Journal of Plankton Research*, 22(9), pp.1735-1756.

Totti, C., Cucchiari, E., De Stefano, M., Pennesi, C., Romagnoli, T. and Bavestrello, G., 2007. Seasonal variations of epilithic diatoms on different hard substrates, in the northern Adriatic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(3), pp.649-658.

Townsin, R L. 2003. „The Ship Hull Fouling Penalty“. *Biofouling* 19(sup1): 9–15.

Tuji, Akihiro. 2000a. „Observation of developmental processes in loosely attached diatom (Bacillariophyceae) communities“. *Phycological Research* 48(2): 75–84.

Tuji, Akihiro. 2000b. „The effect of irradiance on the growth of different forms of freshwater diatoms: implications for succession in attached diatom communities“. *Journal of Phycology* 36(4): 659–61.

Underwood, G J C. 2001. „G. J. C. Underwood, Microphytobenthos“. U *Encyclopedia of Ocean Sciences*, ur. John Steele, Steve Thorpe, i Karl Turekian. Elsevier Ltd, 807–14.

Von Stosch, H.A. 1975. „Amended terminology of the diatom girdle“. *Nova hedwigia. Beihefte*.

Walls, M.G., Rondot, B., Costa, D., Pradier, C.M., Marcus, P., Bellon-Fontaine, M.N.,

- Compère, C., Guezennec, J., 1998. The BASIS group., A study of the initial stages of Biofilm formation on stainless steel immersed in sea water. In Proc. Euromat 98(1), pp. 421-430.
- Wetherbee, R., Lind, J.L., Burke, J. and Quatrano, R.S., 1998. Minireview—the first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *Journal of Phycology*, 34(1), pp.9-15.
- Wetzel, R.G., 2001. *Limnology: lake and river ecosystems*. gulf professional publishing.
- Whitmore, T.J., 1989. Florida diatom assemblages as indicators of trophic state and pH. *Limnology and Oceanography*, 34(5), pp.882-895.
- Willemsen, P., 2005. Biofouling in European aquaculture: is there an easy solution. *European Aquaculture Society Special Publ*, (35), pp.82-87.
- Wu, Y. 2016. *Periphyton: Functions and Application in Environmental Remediation*. Elsevier Science.
- Ye, S. and Andrady, A.L., 1991. Fouling of floating plastic debris under Biscayne Bay exposure conditions. *Marine Pollution Bulletin*, 22(12), pp.608-613.
- Zisman, W.A., 1964. Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. *Advan. Chem. Ser.*, 43, pp.1-51.