



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Geološki odsjek

Lana Grižančić

**PRIMJENA METODE
METABARKODIRANJA NA SUSTAVNO
PRAĆENJE FITOPLANKTONSKE
ZAJEDNICE - PRIMJER SJEVERNOGA
JADRANA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Geološki odsjek

Lana Grižančić

**PRIMJENA METODE
METABARKODIRANJA NA SUSTAVNO
PRAĆENJE FITOPLANKTONSKE
ZAJEDNICE - PRIMJER SJEVERNOGA
JADRANA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. rer. nat. Martin Pfannkuchen

dr. sc. Ana Baričević

Zagreb, 2025



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Department of Geology

Lana Grižančić

**THE APPLICATION OF METABARCODING
IN THE SYSTEMATIC MONITORING OF
THE PHYTOPLANKTON COMMUNITY: AN
EXAMPLE FROM THE NORTHERN
ADRIATIC**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Martin Pfannkuchen, PhD

Ana Baričević, PhD

Zagreb, 2025

Ovaj doktorski rad izrađen je u sklopu dokorskog studija iz Oceanologije, na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, u Laboratoriju za evolucijsku ekologiju Centra za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. rer. nat. Martina Pfannkuchena i dr.sc. Ane Baričević. Istraživanje je provedeno u sklopu projekta financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (DOK-2021-02-5104), voditelj projekta dr. rer. nat. Martin Pfannkuchen.

PRIMJENA METODE METABARKODIRANJA NA SUSTAVNO PRAĆENJE FITOPLANKTONSKE ZAJEDNICE - PRIMJER SJEVERNOGA JADRANA

LANA GRIŽANČIĆ

Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković

Fitoplankton, fotosintetski mikroorganizmi, ključni su pokazatelji kvalitete i stanja morskih ekosustava u sklopu Okvirne direktive o morskoj strategiji. Cilj Strategije unaprjeđenje je metoda za sustavno praćenje morskog okoliša te uspostava mreže sustavnog praćenja korištenjem inovativnih metoda. Metabarkodiranje okolišne DNA nedavno je predloženo kao pristup za procjenu ukupne stanja morskog okoliša praćenjem bioraznolikosti fitoplanktona u morskim ekološkim istraživanjima, temeljen na varijabilnosti ciljane regije u molekuli DNA te metodama sekvenciranja visoke propusnosti. Metabarkodiranje regije za 18S korišteno je za detekciju i identifikaciju morskog eukariotskog fitoplanktona s ciljem uspostavljanja molekularnih metoda u sustavnom praćenju zajednice fitoplanktona sjevernog Jadrana. Opsežan i dugoročan skup podataka omogućio je evaluaciju metodologije uzorkovanja korištenjem potpunije referentne baze fitoplanktonskih sekvenci te pružio uvid u biološku raznolikost, ekološku dinamiku i stanje ekosustava sjevernog Jadrana na temelju raznolikosti u sastavu zajednice fitoplanktona. Metabarkodiranje okolišne DNA pokazalo se kao važan molekularni alat koji nadopunjuje standardizirane metode sustavnog praćenja i istraživanje genetske raznolikosti i strukture fitoplanktonske zajednice, u svrhu procjene bioraznolikosti i stanja obalnog morskog okoliša sjevernog Jadrana kao primjera složenih obalnih morskih ekosustava.

(236 stranica, 62 slike, 6 tablica, 30 priloga, 319 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: fitoplankton, metabarkodiranje, bioraznolikost, sustavno praćenje, sjeverni Jadran

Mentori: dr. rer. nat. Martin Pfannkuchen, znanstveni savjetnik
dr.sc. Ana Baričević, viša znanstvena suradnica

Ocjenjivači:

1. prof. dr. sc. Petar Kružić,
2. dr. sc. Rade Garić, znanstveni suradnik
3. dr. sc. Mirta Smodlaka Tanković, viša znanstvena suradnica

Zamjena: dr. sc. Ljiljana Iveša, znanstvena savjetnica

Rad prihvaćen: 12.09.2025.

THE APPLICATION OF METABARCODING IN THE SYSTEMATIC MONITORING OF THE PHYTOPLANKTON COMMUNITY: AN EXAMPLE FROM THE NORTHERN ADRIATIC

LANA GRIŽANČIĆ

Centre for marine research, Ruđer Bošković Institute

Phytoplankton, photosynthetic microorganisms, are key indicators of the quality and status of marine ecosystems within the framework of the Marine Strategy Framework Directive. The overarching goal is to enhance methodologies for systematic monitoring of the marine environment and to establish a monitoring network. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding has recently been proposed as a promising method for assessing the overall biodiversity of phytoplankton in marine ecological research, based on the variability of targeted regions within DNA molecules. Metabarcoding of the 18S rRNA gene has been employed for the detection and identification of marine eukaryotic phytoplankton with the aim of integrating molecular techniques into the systematic monitoring of phytoplankton communities in the northern Adriatic. A comprehensive dataset enabled the evaluation of the sampling methodology using newly developed phytoplankton reference database. This approach provided valuable insights into the biological diversity, ecological dynamics, and ecosystem health of the northern Adriatic based on shifts in phytoplankton community composition and environmental DNA metabarcoding has proven to be a valuable molecular tool that complements standardized monitoring methods, supporting the exploration of genetic diversity and community structure of phytoplankton for the purpose of assessing biodiversity and the ecological status of coastal marine environments, with the northern Adriatic serving as a representative case of complex coastal marine ecosystems.

(236 pages, 62 figures, 6 tables, 30 attachments, 319 references, original in Croatian)

Keywords: phytoplankton, metabarcoding, biodiversity, monitoring, northern Adriatic

Supervisors: Martin Pfannkuchen, PhD, Senior scientist
Ana Baričević, PhD, Senior Research Associate

Reviewers:

1. Petar Kružić, PhD, Full Professor
2. Rade Garić, PhD, Research Associate
3. Mirta Smoldaka Tanković, PhD, Senior Research Associate

Substitute: Ljiljana Iveša, PhD, Scientific Advisor

Thesis accepted: 12.09.2025.

INFORMACIJE O MENTORIMA

Martin Pfannkuchen trenutno radi kao znanstveni savjetnik u Centru za istraživanje mora (Institut Ruđer Bošković). Od 2019. do 2025. bio je voditelj Centra za istraživanje mora u Rovinju, a od 2016. voditelj Laboratorija za evolucijsku ekologiju. Posljednjih godina surađuje na brojnim znanstvenim projektima o ekologiji i funkcijama ekosustava sjevernog Jadrana (npr. Interreg Ita-HR: Brigantine, Aliena, AdriaClim, Miramare, MPA-networks), kao i na projektima HORIZON 2020 o obalnim promatranjima (JERICO-S3 i JERICO-DS). Poseban istraživački fokus njegova rada je ekologija i molekularna fiziologija fitoplanktona koju on i njegova grupa vode i surađuju na nekoliko nacionalnih istraživačkih projekata (npr. P-Limit, AdriLife i Spatagen). Suvoditelj je kolegija Molekularna ekologija morau okviru doktorskog studija Oceanologija. Trenutno je autor i koautor 57 znanstvenih publikacija i 78 prezentacija na međunarodnim znanstvenim kongresima, kao i nekoliko knjiga i poglavlja u knjigama.

Ana Baričević viša je znanstvena suradnica zaposlena u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu doktorirala je na temu karakterizacije genske porodice p53 u dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Poslijedoktorska usavršavanja provodi na Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale (OGS) u Italiji i Zoologische Staatssammlung München (ZSM) u Njemačkoj gdje je sudjelovala u istraživanjima ekologije i raznolikosti morskog planktona. U matičnoj ustanovi sudjeluje u uvođenju i razvoju naprednih molekularnih tehnika i bioinformatičkih metoda u istraživanju morskog planktona. Trenutno je suradnica na više europskih (Interreg Aliena, Brigantine i Miramare) i nacionalnih projekata (HRZZ AdriLife i Spatagen), a kao voditelj projekta i voditelj istraživanja za Institut Ruđer Bošković sudjelovala je na projektima Interreg AdriaClim i MPA Networks. U nastavno zvanje docenta izabrana je na Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli gdje je sudjelovala u izvođenju kolegija „Stanična i molekularna biologija“ i „Genetika i evolucija“ na preddiplomskom studiju Znanost o moru. Koautorica je brojnih znanstvenih radova u prestižnim časopisima te usmenih i poster izlaganja na međunarodnim znanstvenim skupovima. Članica je Hrvatskog botaničkog društva, Federation of European Phycological Societies i The International Society for Diatom Research.

THESIS SUMMARY

This doctoral thesis investigates the potential application of small subunit ribosomal DNA (18S rRNA) metabarcoding for systematic monitoring of eukaryotic phytoplankton in the waters of the northern Adriatic. The primary objective was to develop a modern, high-throughput molecular approach for taxonomic characterization and spatiotemporal assessment of phytoplankton communities, with a particular focus on the detection of ecologically significant taxa. Additionally, this work aims to contribute to the development of practical guidelines for the integration of molecular methods into routine monitoring protocols, enabling comprehensive spatiotemporal detection of shifts in phytoplankton community structure and improving the management of coastal marine ecosystems.

Phytoplankton, as primary producers and foundational components of pelagic food webs, are highly sensitive to environmental changes, and their dynamics strongly correlate with abiotic variables. Consequently, phytoplankton are widely recognized as reliable indicators of environmental status with appropriate temporal resolution (Hays *et al.*, 2005). In light of escalating climate change and anthropogenic pressures, global declines and/or changes in biodiversity have been observed (Bálint *et al.*, 2011; Bestion *et al.*, 2021; Keck *et al.*, 2025), underscoring the urgent need for comprehensive, high-resolution monitoring of marine ecosystems. This is particularly critical in regions with pronounced spatial and temporal ecological gradients, such as the northern Adriatic (Degobbi *et al.*, 2000; Giani *et al.*, 2012).

To support the preservation of marine environments and promote sustainable management, the European Commission established the Marine Strategy Framework Directive (MSFD; 2008/56/EC), which aims to achieve and maintain Good Environmental Status (GES) of European marine waters through continuous, standardized, and innovative monitoring practices (Borja *et al.*, 2010). Among the recommended innovative tools, metabarcoding has emerged over the past decade as a valuable complement to traditional methods in plankton biodiversity research. Metabarcoding is based on DNA analysis from environmental samples (eDNA) by sequencing conserved genetic regions, enabling simultaneous detection of a wide array of organisms, including those unidentifiable through morphological analysis alone (Baird *et al.*, Hajibabaei, 2012). In pelagic ecosystems, this approach greatly enhances understanding of taxonomic diversity, seasonality,

spatial structure, and the occurrence of cryptic, potentially harmful, invasive, or rare taxa with significant ecological roles (Grižančić *et al.*, 2023).

This study is based on a three-year sampling campaign targeting phytoplankton communities at multiple sites across the northern Adriatic. Sampling sites included two stations, RV001 and RV004, part of LTRV stations with monthly sampling frequency, while seasonal sampling was performed at stations located in both coastal and offshore areas, including research transects toward the Po River, the Kvarner region and the western Istrian coast. All sampled stations are included in long-term phytoplankton monitoring and extensive data series about phytoplankton biodiversity exists for these sites. Overall, sampling encompassed both coastal and open sea zones and employed two commonly used methods: Niskin bottle collection and vertical phytoplankton net hauls. The applied sampling strategy enabled a comparative evaluation of the two phytoplankton sampling techniques with the aim to assess methodological advantages and limitations in the context of metabarcoding-based biodiversity assessment in routine phytoplankton monitoring.

To improve the extent and accuracy of phytoplankton taxonomic annotation, a custom 18S rRNA gene reference sequence database named CIMPhy18, was developed. This database integrated reference sequences from major publicly available repositories/databases (Silva, PR2 and NCBI) enriched with in-house produced reference sequences of the northern Adriatic characteristic phytoplankton taxa. CIMPhy18 has been validated in the context of ecological diversity, ensuring high reliability in the detection and annotation of a wide range of taxa. By employing seven standardized taxonomic ranks and strict sequence quality and taxonomic filtering (exclusion of incomplete, taxonomically ambiguous and environmental records), the CIMPhy18 database enables reliable taxonomic description of metabarcoding results. This way created custom reference database enhanced the detection of region – specific/characteristic taxa and improved the accuracy of ecological interpretation in the context of systematic monitoring of the northern Adriatic phytoplankton community. The observed phytoplankton groups include Dinophyta (dinoflagellates), Bacillariophyta (diatoms) and other Ochrophyta, Cryptophyta (cryptophytes), Haptophyta (mainly coccolithophores), and Chlorophyceae (green microalgae), as proposed by (Not *et al.*, 2012).

The objective of comparing CIMPhy18 with existing reference databases (Silva and PR2) was to assess its effectiveness in the taxonomic annotation of phytoplankton sequences. A mock

community composed of predefined phytoplankton taxa served as a benchmark for evaluating detection accuracy. Within these communities of known composition, all three databases successfully identified most genera; however, metabarcoding of the 18S V4 region remains, in certain cases, limited in its ability to resolve taxa at the species level. To complement the analysis, a set of 24 environmental samples processed via metabarcoding was also included. The results clearly demonstrate that the choice of reference database significantly affects both the number and taxonomic resolution of detected sequences. CIMPhy18, while detecting fewer sequences overall due to its rigorous curation, offers greater consistency in genus-level assignments and improved quantitative stability across samples. In contrast, PR2 provides conservative yet stable classifications, whereas Silva captures a broader taxonomic spectrum but at a higher risk of false positives.

Ultimately, the selection of a reference database has a direct impact on interpretations of phytoplankton diversity and community composition. The application of CIMPhy18 may substantially enhance the accuracy and reliability of phytoplankton metabarcoding, particularly in the context of routine monitoring in the northern Adriatic Sea and comparable marine environments. In order to assess biodiversity and spatio-temporal variation of phytoplankton in the northern Adriatic, a total of 268 high-quality environmental samples were used for downstream analysis and to evaluate the effectiveness of metabarcoding in routine phytoplankton monitoring. Of these successfully sequenced samples, 123 (43,77%) were collected using a phytoplankton net, while 158 (56,23%) were collected using a Niskin bottle—78 from a depth of 5 m and 79 from 20 m. In terms of geographic origin, the majority of sequenced samples (215, or 76,51%) were collected during monthly sampling at LTRV monitoring stations RV001 (107 samples) and RV004 (108 samples). Additional samples included 32 samples collected along the Po River transect and 34 obtained from the Kvarner region and the western Istrian coast, as part of the national marine monitoring program conducted by the Reference Center for the Sea.

Taxonomic annotation identified a total of 6 013 39 phytoplankton ASVs (19,06%), with at least 80% bootstrap confidence at the genus or species level. The total dataset of phytoplankton sequences included representatives from 27 classes, 84 orders, 156 families, and 291 phytoplankton genera. In terms of total sequence abundance, Dinoflagellates accounted for the highest proportion of ASVs (69,64%) and 75,18% of phytoplankton reads, defining them as the most dominant phytoplankton group of the dataset. Dinoflagellates were taxonomically resolved

into 17 orders and 51 families, encompassing 102 genera. The most represented dinoflagellate orders were primarily heterotrophic: Gymnodiniales (54,81%), Syndiniales (16,65%), and Peridinales (11,79%). These orders occurred in more than 90% of all samples. The most abundant genera were *Gyrodinium* and *Amoebophrya*, accounting for 25,07% and 15,59% of dinoflagellates reads respectively, while *Karlodinium* (92,91%) and *Amoebophrya* (91,05%) were the most frequently detected across all samples. Bacillariophyta was the second most abundant phytoplankton group, contributing to the dataset with 7,21% of ASVs and 8,84% of phytoplankton reads. Bacillariophyta reads/ASVs were taxonomically assigned to 27 orders, 43 families, and 56 genera. Chaetocerotales (33,75%), Thalassiosirales (25,06%), and Bacillariales (10,12%) were the most represented orders in the dataset. The most frequently observed dataset genera included *Chaetoceros* (31,04%), *Mediolabrus* (14,59%), and *Pseudo-nitzschia* (9,07%). Other phytoplankton groups were present in lower proportions; Chlorophyta accounted for 6,18% of phytoplankton reads and included 9 classes, 29 families, and 50 genera. Mamiellophyceae (79,77%) and Chlorodendrophyceae (12,17%) were the dominant classes, while *Micromonas* (38,48%), *Bathycoccus* (33,81%), and *Tetraselmis* (12,12%) were the most prevalent Chlorophyta genera. Cryptophyta was represented by two classes, with Pyrenomonadales dominating (97,55%). Among five families, Geminigeraceae was the most abundant, with *Teleaulax* as the dominant genus. Haptophyta comprised of seven orders, 12 families and 19 genera. Prymnesiales (70,81%) and Isochrysidales (14,45%) were the most abundant orders. The most abundant genera within Haptophyta were *Chrysochromulina* (40,90%), *Prymnesium* (15,12%), and *Gephyrocapsa* (14,41%).

For sampling methods comparison, the dataset included 34 sampling events from three sampling stations (RV001, RV004, and SJ108) when both phytoplankton net and Niskin sampling was conducted, resulting with 174 samples in total. The dataset included 58 samples collected using a phytoplankton net and 116 samples collected using Niskin bottles, since Niskin bottle sampling was conducted on two depths (5 m and 20 m). Analysis of raw sequence counts showed no significant differences between sampling methods. On the other hand, taxonomic richness differed between the methods. The number of detected phytoplankton reads did not significantly differ between Niskin bottle samples collected at 5 m ($15\,598 \pm 7\,886$) and 20 m ($15\,889 \pm 6\,722$). However, a significant difference was observed when comparing these to net-collected samples, which exhibited a markedly lower average phytoplankton count ($1\,024 \pm 2\,088$). Distribution of

phytoplankton ASV abundances by group revealed consistent patterns across sampling depths. Phytoplankton communities from Niskin samples collected at 5 and 20 m displayed similar rank-abundance profiles. In contrast, net-collected samples, which integrate the entire water column, showed lower genus abundances and a reduced number of genera overall. Samples collected with Niskin bottles at both 5 and 20 m depths demonstrated stable and more even distributions of phytoplankton groups over time, with well-represented taxonomic diversity within each individual sample. In contrast, phytoplankton net samples showed more pronounced dominance of specific groups, particularly dinoflagellates, compared to other taxa.

Metabarcoding analysis of the northern Adriatic detected 627 phytoplankton taxa across six major groups, of which 59 were harmful or potentially toxic (HAB; UNESCO IOC HAB Programme list). These comprised 38 genera, with 56 taxa identified to species level. Toxic taxa accounted for 8,71% and harmful but non-toxic taxa for 4,58% of total phytoplankton sequences, together representing 13,29% of the dataset. *Karlodinium veneficum* dominated toxic taxa (53,25% of HAB sequences), while *Noctiluca scintillans* was the most abundant harmful non-toxic species (9,07%). Seasonal and interannual patterns were evident: toxic taxa peaked in autumn, harmful taxa in spring, and overall HAB abundance was lowest in summer. Sampling method influenced results, although characterized with lower phytoplankton sequence number, net-collected samples showed significantly higher HAB relative abundance than Niskin bottle samples. Dinoflagellates dominated both toxic (91,84%) and harmful (51,53%) components, with additional contributions from diatoms and other phytoplankton groups.

A total of 275 phytoplankton taxa (45,38% of the dataset) were newly recorded for the northern Adriatic, spanning 288 genera, 156 families, 84 orders, and all six phytoplankton groups. Dinoflagellates showed the highest number of new records (99 species), including several parasitic orders. Notable new taxa with high relative abundance included *Amoebophrya* spp., *Bathycoccus prasinos*, *Teleaulax* spp., and toxic *K. veneficum*. Novel diversity was also documented within Cryptophyta, Chlorophyta, Haptophyta, and Ochrophyta, including entirely new orders for the region. These findings highlight both the ecological relevance of harmful taxa and the substantial unexplored phytoplankton diversity in the northern Adriatic revealed through high-throughput sequencing.

Comparison of phytoplankton composition revealed by metabarcoding and traditional microscopy, conducted within the national programme for the assessment of ecological status through

systematic monitoring of phytoplankton assemblages, demonstrated higher biodiversity detected using molecular methods—including potentially toxic and harmful taxa. While metabarcoding enabled detection of higher taxonomic diversity, the existing biological assessment protocols and index calculation methods still require adaptation to effectively incorporate metabarcoding-derived data in national monitoring programmes.

This study demonstrates the applicability and added value of 18S rRNA metabarcoding for routine phytoplankton monitoring in the northern Adriatic, highlighting its capacity to capture spatial and temporal biodiversity patterns. Comparison of sampling methods revealed that Niskin bottles provide more consistent and taxonomically rich community profiles than phytoplankton nets. Despite this, both methods detected ecologically relevant taxa, supporting the integration of metabarcoding into existing monitoring frameworks.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Sustavno praćenje u obalnim područjima	2
1.2 Fitoplankton	5
1.3 Metabarkodiranje	14
1.4 Metabarkodiranje fitoplanktona prilikom sustavnog praćenja.....	19
1.5 Ciljevi i hipoteze	23
2. MATERIJALI I METODE	24
2.1 Terensko uzorkovanje.....	24
2.2 Laboratorijska obrada uzoraka	26
2.3 Izrada referentne baze fitoplanktonskih sekvenci	29
2.4. Bioinformatička analiza	35
2.5 Usporedba rezultata s rezultatima sustavnog praćenja RH	38
3. REZULTATI.....	42
3.1 Referentna baza fitoplanktonskih sekvenci male podjedinice rRNA - CIMPhy18.....	42
3.2 Osnovne karakteristike metabarkodiranog seta podataka fitoplanktona sjevernog Jadrana	54
3.3 Taksonomski sastav fitoplanktona.....	57
3.4 Usporedba metoda uzorkovanja - fitoplanktonska mreža i Niskinov crpac.....	59
3.4 Vremenski i prostorni obrasci fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana.....	73
3.6 Detekcija ekološki značajnih taksona u skupu podataka metabarkodiranja sjevernog Jadrana	100
3.7 Usporedba s rezultatima aktivnog programa sustavnog praćenja	111
4. RASPRAVA.....	120

4.1 Referentna baza CIMPhy18	120
4.2 Usporedba metoda uzorkovanja fitoplanktonska mreža – Niskinov crpac	127
4.3 Procjena biorazolikosti.....	133
4.4 Primjena metabarkodiranja u okviru programa sustavnog praćenja	140
5. ZAKLJUČCI.....	146
6. LITERATURA	i
7. PRILOZI.....	xxxii
8. ŽIVOTOPIS	lxxxiv
9. ZNANSTVENA AKTIVNOST I PUBLIKACIJE.....	lxxxv

1. UVOD

Fitoplankton predstavlja ključnu skupinu organizama u morskim ekosustavima, čija su biološka svojstva iznimno pogodna za sustavno praćenje okolišnih promjena. Zahvaljujući kratkom životnom ciklusu i visokoj osjetljivosti na promjene u abiotičkim i biotičkim uvjetima, fitoplanktonske zajednice brzo i mjerljivo reagiraju na čimbenike poput dostupnosti hranjivih tvari, temperature, svjetlosnih uvjeta, koncentracije ugljikova dioksida te antropogenog onečišćenja (Tilman i sur., 1982; Beardall i Raven, 2004; Wiltshire i Manly, 2004; Hinder i sur., 2012; Sterner i Elser, 2017; Meunier i sur., 2018; Salmaso i Tolotti, 2021; Di Pane i sur., 2022). Istovremeno, fitoplankton kao skupina primarnih proizvođača u vodenom stupcu predstavlja važan dio baze hranidbene mreže, asimilacije ugljikovog dioksida i produkcije kisika, zbog čega su vrlo dobri pokazatelji trenutnog stanjaorskog okoliša te su glavna karika u ekološkim direktivama sustavnog praćenjaorskog ekosustava (Varkitzi i sur., 2018; Francé i sur., 2021). Prema Okvirnoj Direktivi o Morskoj Strategiji (MSFD, od engl. *Marine Strategy Framework Directive*) Europske unije, fitoplankton se navodi kao jedan od bioloških elemenata određivanja kvaliteteorskog okoliša te je njegova uporaba kao pokazatelja obavezna u ocjenjivanju ekološkog statusaorskog okoliša u Republici Hrvatskoj kao državi članici Europske unije (UNEP-MAP, 2025).

S obzirom na složenost abiotskih i biotskih čimbenika koji utječu na fitoplanktonsku zajednicu (Lobus i Kulikovskiy, 2023), važno je praćenje promjena sastava fitoplanktonske zajednice u prostorno i vremenski raznolikim sustavima. Sjeverni Jadran, zbog svojih fizikalno-kemijskih karakteristika, ima važnu ulogu u takvim istraživanjima zbog visoke primarne produkcije, osobito u područjima pod utjecajem rijeke Po. Zbog svoje geomorfologije, hidrologije i izloženosti antropogenim pritiscima, sjeverni Jadran može se smatrati jednim od najvažnijih područja za istraživanje dinamike fitoplanktona u Mediteranu (Degobbi i sur., 2000; Cozzi i Giani, 2011; Marić i sur., 2012). Kontinuirano praćenje fitoplanktonske zajednice u kontekstu klimatskih promjena, eutrofikacije i degradacije morskih staništa od velike je važnosti jer omogućuje rano otkrivanje promjena u ekosustavu i podupire očuvanje bioraznolikosti te održivo upravljanje morskim resursima (Domingues i sur., 2008; Ferreira i sur., 2011; Tweddle i sur., 2018; Ugya i sur., 2025).

Standardizirano proučavanje i praćenje ekologije fitoplanktonskih zajednica provodi se metodama taksonomske identifikacije temeljena na morfološkim karakteristikama organizama (mikroskopske metode prema Utermöhl, 1958). Sve češća je upotreba i molekularne metode metabarkodiranja DNA za praćenje morskog fitoplanktona kao nadopuna tradicionalnim metodama poput svjetlosne mikroskopije. U dinamičnom obalnom ekosustavu kao što je sjeverni Jadran, metabarkodiranje ima potencijal detaljno opisati sastav zajednice, detektirati rijetke skupine te skupine koje pripadaju manjim veličinskim frakcijama koje mogu biti predstavljati izazov za detekciju tradicionalnim metodama. Takve prednosti metabarkodiranja, uz standardizaciju protokola za prikupljanje i obradu uzoraka, kao i bioinformatičku analizu i upravljanje podacima mogu nadopuniti tradicionalne metode u ekološkim istraživanjima visoke rezolucije te oplemeniti dugoročne programe sustavnog praćenja (Grižančić i sur., 2023; Neri i sur., 2025).

1.1 Sustavno praćenje u obalnim područjima

Istraživanja su pokazala da zbog kontinuiranog povećanja antropogenog pritiska na okoliš i klimatskih promjena, postoji negativan trend smanjenja bioraznolikosti (Bálint i sur., 2011; Bestion i sur., 2021; Keck i sur., 2025) te se javlja sve veća potreba za cjelovitim praćenjem morske bioraznolikosti što je ključno za procjenu kvalitete ekosustava (Needham i sur., 2007), posebice u izraženim prostorno-vremenskim ekološkim gradijentima obalnih područja kao što je sjeverni Jadran (Degobbi i sur., 2000; Giani i sur., 2012). Sustavno praćenje (engl. *monitoring*) opetovano je prikupljanje podataka tijekom vremena za otkrivanje promjena u sustavu (Spellerberg, 2025), a podaci mogu uključivati informacije o nizu čimbenika poput ekoloških, bioloških i društvenih.

1.1.1 Strategija upravljanja morskim okolišem i obalnim područjima

U 2008. godini, Europska komisija uspostavila je Okvirnu direktivu o morskoj strategiji (MSFD, od engl. *Marine Strategy Framework Directive*, dalje u tekstu: Direktiva) koja za cilj ima postizanje i održavanje dobrog stanja okoliša u europskim morima kontinuiranim sustavnim praćenjem morskog ekosustava (MSFD, 2008/56/EC; osvrt u Borja i sur., 2010) te pronalazak rješenja za oporavak bioraznolikosti (Strategija Europske unije za bioraznolikost za 2030., (Hermoso i sur., 2022). Cilj Direktive 2008/56/EC unaprjeđenje je metoda za sustavno praćenje morskog okoliša te uspostava mreže sustavnog praćenja zaštićenih područja korištenjem inovativnih i isplativih metoda za sustavno praćenje. Okvirna direktiva o morskoj strategiji potiče

razvoj i primjenu novih metoda za učinkovito praćenje, procjenu i upravljanje morskim okolišem. Ovom Direktivom države članice obvezuju se poduzeti mjere kako bi postigle ili očuvale dobro ekološko stanje morskog okoliša. Jedan od ključnih elemenata praćenje je i procjena stanja morskog okoliša. Države potpisnice dužne su redovito pratiti stanje morskog okoliša kroz sustavna istraživanja i prikupljanje podataka o njegovoj kvaliteti, biološkoj raznolikosti, razini onečišćenja i drugim relevantnim pokazateljima. Kako bi ispunile ovaj cilj, države moraju procijeniti ekološko stanje morskih tijela i prijaviti status kvalitete koristeći klasifikacijsku shemu koja se sastoji od pet klasa za ekološki status („vrlo dobro“, „dobro“, „umjereno“, „loše“ i „vrlo loše“) (Facca i sur., 2014; Cvitković i sur., 2018).

Procjena ekološkog statusa uključuje mjerenje nekoliko bioloških pokazatelja, zajedno s fizikalno-kemijskim i hidromorfološkim pokazateljima. Ekološki status utvrđuje se usporedbom stanja pokazatelja s referentnom vrijednošću, odnosno omjer ekološke kvalitete. Jedan od ograničavajućih faktora proizlazi iz činjenice da je teško utvrditi referentnu vrijednost pokazatelja ekološkog stanja s obzirom na to da se referentna vrijednost odnosi na stanje morskog okoliša koji nije pod utjecajem ljudske djelatnosti. Na temelju prikupljenih informacija provodi se procjena ekološkog stanja mora te se, prema potrebi, prilagođavaju strategije i mjere upravljanja kako bi se osiguralo postizanje i održavanje dobrog ekološkog stanja. Ovaj proces omogućuje pravovremeno prepoznavanje prijetnji morskom okolišu te donošenje učinkovitih mjera za njegovu zaštitu. Razvoj i korištenje ekoloških pokazatelja ključni su alati za praćenje ekoloških ciljeva i procjenu morske bioraznolikosti. Naglašava se potreba za robusnim, znanstveno utemeljenim pokazateljima koji bi podržali učinkovito upravljanje i političke odluke (A. Borja i sur., 2016; Teixeira i sur., 2016). Usprkos izazovima u razvoju, kalibraciji i potvrđivanju novih pokazatelja što može usporiti pravovremene odgovore upravljačkih tijela na promjene u okolišu, stvaraju se novi, kvalitetniji pokazatelji. Također, varijabilnost u vrijednostima pokazatelja u različitim morskim ekosustavima otežava provođenje usklađenih procjena u europskim morima (Uusitalo i sur., 2016).

Proteklih se desetljeća, zajedno s tradicionalnim metodama sustavnog praćenja morskog okoliša, razvijaju se i nove metode podobne za sustavno praćenje, poput satelitskih mjerenja što uključuje korištenje satelita za nadzor promjena u morskom okolišu povezanih s biomasom fitoplanktona što može ukazivati na cvjetanje fitoplanktona (Aguilar-Maldonado i sur., 2019; Demarcq i sur., 2012), protočne citometrije te protočne citometrije s mogućnošću stvaranja slika (J. Dubelaar i

sur., 2004; Rutten i sur., 2005). Ipak, svaka metoda ima određena ograničenja: satelitska mjerenja ne omogućuju pouzdanu identifikaciju taksona i ograničena su na površinski sloj mora, protočna citometrija, ne pruža dovoljnu taksonomsku razlučivost, dok je kod protočne citometrije s mogućnošću stvaranja slika otežana pouzdana identifikacija taksona koji pripadaju manjim veličinskim frakcijama. Napretkom metoda molekularne biologije, omogućena je i pouzdana identifikacija vrsta na temelju genetskog materijala (Baird i Hajibabaei, 2012). Napretkom tehnika sekvenciranja DNA omogućena je analiza većeg broj uzoraka te istovremeno dobivanje velikog broja sekvenci (Shendure i Ji, 2008) čime je postala moguća i identifikacija vrsta u cjelokupnoj zajednici, nazvana metabarkodiranje (engl. *metabarcoding*). Primjenom ovih metoda u nacionalnim programima sustavnog praćenja morskog okoliša države članice mogle bi učinkovitije provoditi mjere zaštite i očuvanja morskog okoliša, osiguravajući ostvarenje ciljeva Direktive.

1.1.2 Sjeverni Jadran

Jadransko more izduženi je poluzatvoreni bazen u sjeveroistočnom Sredozemnom moru. Pruža se u smjeru jugoistok – sjeverozapad, s plitkim sjevernim dijelom i dubljim južnim dijelom. Na ekosustave Jadranskog mora utječe redovita izmjena vode s ostatkom Sredozemnog mora (Gacic i sur., 2010). Jadransko more karakteriziraju različiti trofički uvjeti; produktivan i potencijalno eutrofni sjeverni dio, oligotrofni južni dio i također jasno oligotrofne otvorene vode (Viličić i sur., 1989; Artegiani i sur., 1997; Degobbi i sur., 2000; Campanelli i sur., 2011). Sjeverni Jadran, kao najsjeverniji dio Sredozemnog mora, predstavlja jedno od njegovih najproduktivnijih područja (Giani i sur., 2012). Karakterizirano je malom dubinom, visokim riječnim dotokom (uglavnom iz rijeke Po) i dominantnom ciklonskom cirkulacijom (Artegiani i sur., 1997; Campanelli i sur., 2011; Degobbi i sur., 2000).

Istočnojadranska struja teče prema sjeveru duž istočne obale, donoseći slanije, toplije i oligotrofnije vode iz Jonskog i Sredozemnog mora (Poulain i Cushman-Roisin, 2001), dok zapadnojadranska struja (WAC) prenosi prema jugu vode bogate hranjivim tvarima iz sjevernog podbazena (Artegiani i sur., 1997; Campanelli i sur., 2011; Marini i sur., 2008). Obrasci kružnog strujanja redovito tvore zasebno vodno tijelo u sjevernom Jadranu s produljenim vremenima zadržavanja u tom području, a utjecaj slatke vode iz rijeke Po nerijetko dopire preko cijelog područja sjevernog Jadrana (Hopkins i sur., 1999; Russo i sur., 2005).

1.1.3 Obalna područja kao žarišta klimatskih promjena i antropogenog pritiska

U svjetskim razmjerima, obalna područja su jedna od najdinamičnijih okruženja koja se vrlo brzo mijenjaju. Promjene su izazvane snažnim antropogenim pritiscima u sinergiji s prirodnim obalnim procesima i globalnim klimatskim promjenama (Harley i sur., 2006; Pikelj i Juračić, 2013). Obalna područja u Sredozemlju posebno su važna zbog svojih prirodnih, društveno-ekonomskih karakteristika, ali su snažno zahvaćena klimatskim promjenama i njihovom interakcijom s velikim brojem različitih poremećaja antropogenog podrijetla. Ljudske aktivnosti (pomorski promet, ribarstvo, marikultura, vađenje plina u moru, turizam) u obalnim područjima predstavljaju snažan antropogeni pritisak na obalna područja i predstavljaju ozbiljne rizike za osjetljivu ekološku ravnotežu ekosustava kao što je sjeverni Jadran (Giani i sur., 2012; Furlan i sur., 2019). Promjene u riječnom ispuštanju, modifikacije oceanografskih karakteristika i obrazaca cirkulacije, podizanje razine mora i obalna erozija u interakciji su s antropogenim unosom organskih hranjivih tvari, često dovodeći do problema eutrofikacije (Halpern, 2008; Lotze i sur., 2011) i promjena u strukturi morskih ekosustava, uključujući širenje stranih vrsta (Cabrini i sur., 2019). Praćenje antropogenih pritisaka i klimatskih promjena u sjevernom Jadranu od presudne je važnosti za očuvanje ekološke ravnoteže i održivo upravljanje obalnim i morskim ekosustavima. Ova regija, karakterizirana plitkim morem, visokom biološkom produktivnošću i intenzivnom ljudskom aktivnošću, posebno je osjetljiva na kumulativne učinke zagađenja, prekomjernog ribolova, urbanizacije te porasta temperature mora i promjena u režimima cirkulacije (Torresan i sur., 2019). Antropogeni utjecaji u kombinaciji s posljedicama klimatskih promjena – poput povećane učestalosti ekstremnih vremenskih događaja, zakiseljavanja mora i pomaka u biogeokemijskim ciklusima – mogu dovesti do degradacije staništa, gubitka bioraznolikosti i narušavanja usluga koje morski ekosustavi pružaju ljudskim zajednicama (Cozzi i sur., 2020; Degobbi i sur., 2000). Sustavno praćenje ovih procesa ključno je za pravovremeno prepoznavanje promjena, modeliranje budućih scenarija i donošenje znanstveno utemeljenih mjera zaštite i prilagodbe.

1.2 Fitoplankton

Fitoplankton obuhvaća vrlo raznoliku skupinu jednostaničnih mikroskopskih fotosintetskih organizama koji čine glavnu kariku u hranidbenoj mreži svih vodenih ekosustava, uključujući i morski okoliš. Karakterizira ih iznimno široka rasprostranjenost i uključenost u brojne ekološke i funkcionalne procese poput globalnih biogeokemijskih ciklusa (Falkowski, 1994; Karlusich i sur.,

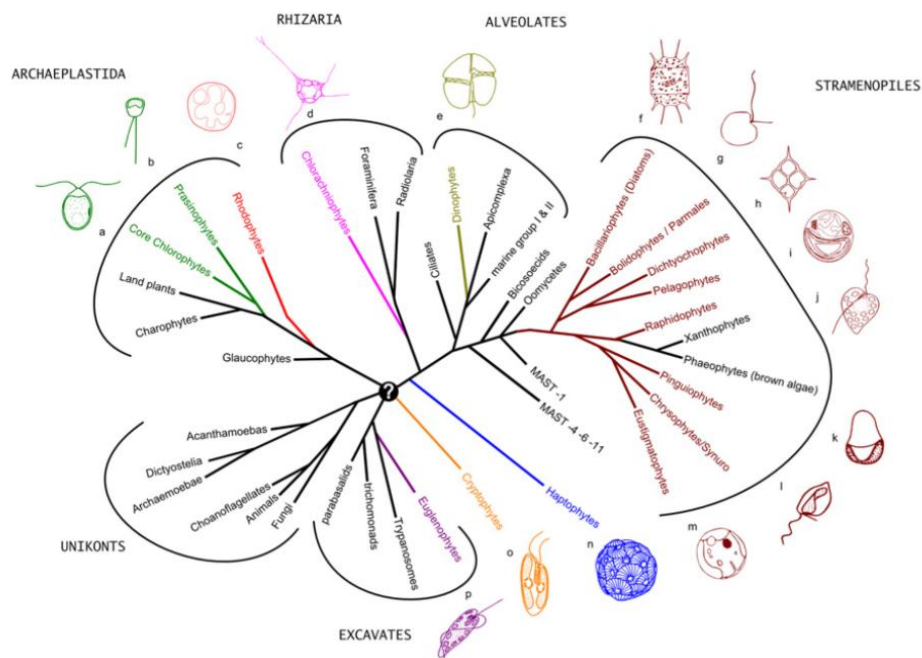
2020; Litchman i sur., 2015) i regulaciji klime (Naselli-Flores i Padisák, 2023) Iako fitoplankton predstavlja manje od 1% globalne fotosintetske biomase (P. G. Falkowski, 1994), ovi eukariotski mikroorganizmi imaju važnu ulogu u primarnoj produkciji unutar vodenih ekosustava, proizvodnji kisika i organskog ugljika, te doprinose približno polovici ukupne fotosintetske aktivnosti na Zemlji (Reynolds, 2006). Prokariotski morski fitoplankton čine cijanobakterije iz domene bakterija, dok su predstavnici eukariotskog fitoplanktona taksonomski vrlo raznolik te pripadaju većini glavnih eukariotskih supergrupa (Archaeplastida, SAR, Haptista, Cryptista). ([Slika 1.1](#)).

Eukariotski fitoplankton nije samo taksonomski vrlo raznolik, već obuhvaćaju iznimno širok raspon veličina između i unutar taksonomske skupine. Veličine mogu varirati vremenski i/ili prostorno kao odgovor na različite uvjete okoliša ili faze životnog ciklusa. Stanice fitoplanktona protežu se u rasponu od pikoplanktona (0,2–2 μm), nanoplanktona (2–20 μm , mikropilanktona (20–200 μm) do mezoplanktona (0,2–20 mm). Fitoplankton sačinjavaju jednostanični organizmi od kojih mnoge vrste tvore lance ili kolonije. Veće stanice karakteristične su za diatomeje i dinoflagelate, dok najmanji redovi veličine se uglavnom sastoje od zelenih algi, što utječe i na odabir metode prilikom istraživanja i karakterizacije različitih skupina. Veličina stanica također utječe na brojne funkcionalne karakteristike fitoplanktona. Primjerice, zbog njihovog velikog omjera površine i volumena koji olakšava pasivan unos hranjivih tvari, male stanice su dobro prilagođene stabilnom i oligotrofnom morskom okolišu siromašnom nutrijentima, dok su veće stanice bolje prilagođene mješovitim i eutrofnim okruženjima bogatim nutrijentima (Maranon i sur., 2010; Finkel i sur., 2010). Budući da morski okoliš pokazuje heterogene fizikalno-kemijske strukture u prostoru i vremenu, veličina stanica važna je značajka koju treba uzeti u obzir s ekološkog aspekta.

Tijekom posljednjeg desetljeća molekularna istraživanja razotkrila su bogatu raznolikost fitoplanktonskih vrsta koja je do tada bila izvan dosega klasičnih metoda (Massana i Pedrós-Alió, 2008; Vaulot i sur., 2008). Iako znanstvena literatura ukazuje na postojanje 200 000 do nekoliko milijuna vrsta, trenutačno je poznato oko 25 000 fitoplanktonskih vrsta (Falkowski, 2012), a smatra se da će taj broj rasti usporedo s razvojem metoda istraživanja, posebice vrsta za koje je karakteristično vrlo malo razlikovnih morfoloških obilježja zbog male veličine.

1.2.1 Pregled fitoplanktonskih skupina

U promatrane fitoplanktonske grupe ubrajaju se Dinophyceae (dinoflagelati), Ochrophyta koju čine Bacillariophyceae (dijatomeje) i Chrysophyceae (zlatne alge), Cryptophyceae (kriptofiti), Haptophyta (uglavnom kokolitoforidi) i Chlorophyceae (zelene mikroalge), kako je predloženo u (Not i sur., 2012) ([Slika 1.1](#)). Dijatomeje, dinoflagelati, kokolitoforidi i mali Prasinophyceae najraširenije su i najraznolikije ekološki važne fitoplanktonske skupine u obalnih područja, uključujući i sjeverni Jadran.



Slika 1.1 Shematsko filogenetsko stablo koje prikazuje predstavnike fitoplanktona u različitim domenama stabla života (preuzeto iz Not i sur., 2012)

Mnoge fitoplanktonske skupine, uključujući dinoflagelate iz rodova *Gymnodinium* i *Amphidinium*, unatoč primarno fotosintetskom načinu ishrane, pokazuju miksotrofno ponašanje – hraneći se prokariotima ili drugim fitoplanktonom (Stoecker, 1999), što čini granice između autotrofnih i heterotrofnih organizama u morskim ekosustavima dinamičnim i nejasnim. Osim toga, brojne vrste dinoflagelata su isključivo heterotrofne ili parazitske, kao što su paraziti iz reda Blastodinales i Syndiniales, koje u potpunosti ovise o heterotrofiji kao načinu prehrane (Coats, 1999). Ove parazitske i predacijske strategije dodatno zamagljuju jasnu podjelu između autotrofnih i heterotrofnih organizama.

1.2.1.1 Chlorophyta

Zelene alge ili Chlorophyta monofiletska su skupina koja uključuje slatkovodne alge i morske predstavnike (De Clerck i sur., 2012) te se smatraju najraznovrsnijom skupinom algi po broju vrsta. Skupina Chlorophyta dobro je definirana te se filogenetski izdvaja od ostalih eukariotskih skupina. Predstavnike ove skupine karakteriziraju jedinstvene biokemijske i ultrastrukturne značajke koje su posljedica evolucijskih procesa, odnosno primarne endosimbioze (Leliaert i sur., 2011). U morskim ekosustavima, jednostanične skupine Chlorophyta čine značajan dio zajednica piko- i nanoplanktona. Pripadnicima skupine Mamiellophyceae pripadaju najpoznatiji fotosintetski predstavnici, *Ostreococcus tauri* i *Bathycoccus prasinus* s promjerom stanica od 0,8 μm (Eikrem i and Throndsen, 1990) karakteristične za obalna područja (Collado-Fabbri i sur., 2011; Medlin i sur., 2006). Zbog svoje veličine i malo razlikovnih obilježja, pojava molekularnih metoda omogućila je prepoznavanje novih skupina i reorganizaciju postojećih (Guillou i sur., 2004; Marin i Melkonian, 2010).

1.2.1.2 Haptophyta

Haptophyta su funkcionalno različita i široko rasprostranjena skupina protista, često vrlo učestali u obalnim područjima. I morfološki i molekularni dokazi podupiru podjelu Haptophyta u dvije glavne skupine, Pavlovophyceae i Prymnesiophyceae (Edwardsen i sur., 2000). Neki od dobro poznatih predstavnika ove skupine su *Phaeocystis*, *Prymnesium*, *Gephyrocapsa* i *Chrysochromulina*, koji povremeno tvore štetna cvjetanja u obalnim područjima. Smatralo se da većina haptofita se pojavljuje kao solitarne planktonske stanice koje spadaju u nanoplankton (stanice promjera 2-20 μm), dok recentna istraživanja na temelju molekularnih analiza ukazuju na postojanje brojnih vrsta za koje su karakteristične vrlo male stanice (pikoplankton) (Liu i sur., 2009). Haptofite karakterizira prisutnost haptoneme, koja je naizgled sličan flagelumu, ali se razlikuje po rasporedu mikrotubula i funkciji koja uključuje vezivanje i hvatanje plijena, što im omogućuje usvajanje različitih ekoloških strategija te osim fotosinteze, sposobni su koristiti organske izvore hrane (Liu i sur., 2009).

1.2.1.3 Dinoflagelati (Dinophyta)

Dinoflagelati su jednostanični eukariotski mikroorganizmi iz skupine Alveolata koji se slobodno pokreću s dva međusobno okomito položena biča. Najveći broj ovih organizama (>1200 vrsta) živi u moru, ali ih se može naći i u slatkovodnim staništima. Prilagođeni su različitim staništima,

ali najučestaliji su u toplim morima, a u umjerenim širinama brojniji su u toplijem dijelu godine. U nepovoljnim uvjetima mogu proizvesti mirujuće ciste koje mogu dulje vrijeme preživjeti u sedimentima, a u povoljnijim uvjetima naglo se razvijaju te pod određenim uvjetima se mogu brzo razmnožavati stvarajući cvjetanja ili crvene plime (engl. *red tides*) koje mijenjaju boju vode te su odgovorni za uvjete hipoksije. Također, neki predstavnici proizvode toksine što dovodi do trovanja ribe i drugih organizama (Berdalet i sur., 2015). Prema načinu prehrane mogu biti fotoautotrofi, slobodnoživući predatori (heterotrofi) ili oboje, istovremeno ili alternativno (miksotrofi), dok neki također žive kao paraziti ili simbionti (Taylor i sur., 2008). Budući da dinoflagelati imaju različite preferencije staništa, višestruke životne strategije i nutritivno su svestrani, vrlo su konkurentni drugim skupinama protista za iskorištavanje dostupnih resursa.

1.2.1.4 Ochrophyta

Diatomeje (Bacillariophyta) jedna su od najraznovrsnijih skupina jednostaničnih fotoautotrofnih eukariota iz skupine Ochrophyta. Sveprisutne su u morskim, slatkovodnim te vlažnim kopnenim staništima. Glavnu zajedničku značajku predstavlja, stanična stijenka izgrađena od silicijeva dioksida, frustulum, podijeljena na dvije valve povezane pleurom. Zbog njihove brojnosti u plitkim obalnim morima, procijenjeno je da dijatomeje čine čak 20% globalne fotosintetske fiksacije ugljika (Mann, 1999). Planktonske dijatomeje posebno su važne jer mogu izazvati cvjetanja mora u obalnim regijama bogatim hranjivim tvarima, posebno u umjerenim zonama i zonama *upwelling*-a u umjerenim i tropskim krajevima.

Osim dijatomeja, unutar skupine Ochrophyta obuhvaćene su i druge, filogenetski raznolike, ali manje učestale fitoplanktonske skupine koje također mogu imati značajnu ekološku ulogu u morskim ekosustavima. Skupina koja je filogenetski najbliža dijatomejama su Bolidophyceae. Svi poznati predstavnici ove skupine ograničeni su na morske pikoplanktonske zajednice, a najučestaliji su u oligotrofnim, otvorenim oceanima. Njihova važnost proizlazi iz sposobnosti preživljavanja u uvjetima niske dostupnosti hranjivih tvari te doprinosi primarnoj produkciji u tim ekosustavima. S druge strane, Dictyochophyceae je mala, ali taksonomski raznolika skupina koja obuhvaća i autotrofne i miksotrofne organizme. Iako brojčano nisu dominantni, predstavnici Dictyochophyceae mogu biti ekološki značajni, osobito tijekom specifičnih sezonskih uvjeta ili u određenim biogeografskim regijama. Njihova prisutnost određenih vrsta (vrste roda *Pseudochattonella*) povezana je i sa štetnim cvjetanjima koje mogu imati negativan utjecaj na

morske organizme zbog proizvodnje ihtiotoksina (Skjelbred i sur., 2011). Pelagophyceae je skupina pretežito morskih, fotoautotrofnih organizama, rasprostranjenih u piko- i nanoplanktonskim frakcijama otvorenih oceana i obalnih voda. Iako brojčano nisu uvijek dominantni, pripadnici ove skupine imaju važnu ulogu u primarnoj produkciji osobito u oligotrofnim i mezotrofnim uvjetima, gdje doprinose osnovnim procesima kruženja ugljika i energije u morskim hranidbenim mrežama. Neki predstavnici ove skupine (*Aureococcus*) mogu izazvati cvjetanje algi (engl. *brown tide*) koje negativno utječe na filtratore poput školjkaša i na opće stanje priobalnih ekosustava. Takvi događaji povezani su s eutrofnim uvjetima i određenim klimatskim promjenama, što dodatno naglašava ekološki značaj i osjetljivost ove skupine na promjene u okolišu. Za razliku od drugih skupina unutar Ochrophyta, Raphidophyceae su često veće stanice koje pripadaju frakciji mikrop planktona. Također, vrste koje su predstavnici ove skupine (*Chattonella*, *Heterosigma* i *Fibrocapsa*) poznate su po mogućnosti cvjetanja, koja mogu imati toksične učinke na riblje zajednice, osobito u akvakulturama, radi oslobađanja reaktivnih oblika kisika, koji uzrokuju oštećenja tkiva kod riba. Pinguiphyceae je mala i taksonomski izolirana skupina, javljaju se isključivo u morskim ekosustavima, često u hladnijim, umjerenim ili polarnim vodama. Obuhvaća relativno rijetke, jednostanične morske alge, poznate po svom visokom udjelu lipida u staničnoj biomasi što omogućuju plutanje u vodenom stupcu i predstavlja potencijalnu energetska rezervu. Zlatnozelene alge, Chrysophyceae i Synurophyceae su dvije filogenetski bliske skupine, čiji su pripadnici prisutni pretežito u slatkovodnim ekosustavima, premda postoje i neki morski predstavnici. Chrysophyceae čine raznoliku skupinu koja uključuje autotrofne, miksotrofne i heterotrofne oblike, dok su Synurophyceae isključivo fotosintetski organizmi. Eustigmatophyceae su mala skupina jednostaničnih, isključivo autotrofnih algi, brojčano i funkcionalno manje učestalih u vodenim planktonskim zajednicama većinom prisutnih u terestričkim staništima, iako postoje i rijetki morski predstavnici.

1.2.1.4 Cryptophyta

Ova skupina jednostaničnih algi karakteristična je zbog svog asimetričnog oblika, pretežito su fotosintetski, no postoje skupine koje su se vratile na heterotrofni način prehrane (Hoef-Emden, 2005). Iako nastanjuju sva vodena staništa, mnogo su učestaliji u morskom okolišu (Clay i sur., 1999). Često tvore cvjetanja mora, ali bez štetnih posljedica.

1.2.2 Fitoplankton sjevernog Jadrana

Fitoplankton Jadranskog mora intenzivno se proučava zadnjih 50-ak godina. Praćenje planktona koristi se u mnoge različite svrhe, kao što je ispitivanje ekološkog stanja, dugoročnih promjena u raznolikosti i biomasi, učinka stresora poput eutrofikacije ili zakiseljavanja, prisutnosti neautohtonih vrsta ili štetnih vrsta fitoplanktona. Praćenje fitoplanktona tradicionalno se provodilo metodom svjetlosne mikroskopije koja je ostala gotovo nepromijenjena više od šest desetljeća (Utermöhl, 1958.). Frakcija mikrofitoplanktona u kojoj dominiraju dijatomeje smatra se glavnim primarnim proizvođačem u sjevernom Jadranu (Fuks i sur., 2012; Marić i sur., 2012).

Bioraznolikost i brojnost fitoplanktona sjevernog Jadrana dobro su proučeni kroz mnoga znanstvena i dugoročna istraživanja (Aubry i sur., 2004, 2012; Cabrini i sur., 2012; Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012; Mozetič i sur., 2012; Neri i sur., 2022; Skejić i sur., 2024; Totti i sur., 2019; Viličić i sur., 2009). Mnoga istraživanja na ovom području bave se sukcesijom fitoplanktonskih zajednica u godišnjem ciklusu, ekologijom odabranih vrsta, korištenjem analiza fitoplanktona u ekološkom sustavnom praćenju ili opisom bioraznolikosti i vrsta kao takvih (Bernardi Aubry i sur., 2006; Cerino i sur., 2019; Godrijan i sur., 2013). Ovi skupovi podataka temelje se na morfološkim svojstvima fitoplanktona koji se tradicionalno dobivaju svjetlosnim mikroskopom. Također, rađeni su i popisi vrsta fitoplanktona Jadranskog mora, na temelju morfoloških karakteristika (Viličić i sur., 2002).

1.2.3 Fitoplankton u okviru sustavnog praćenja

Zbog svoje ekološke važnosti, brzog odgovora na promjene u okolišu i lakoće uzorkovanja, fitoplankton predstavlja jedan od najučinkovitijih pokazatelja u sustavnoj ekološkoj procjeni morskih ekosustava te se već desetljećima koristi u sustavnom praćenju, što omogućuje pouzdanu usporedbu kroz vrijeme i praćenje dugoročnih promjena u ekosustavu. Fitoplankton reagira izravno na promijenjene razine hranjivih tvari kroz promjene u biomasi i sastavu (Barton i sur., 2016; Doney i sur., 2012; Hays i sur., 2005; Reynolds, 2006; Winder i Sommer, 2012). Ekološki i antropogeni pritisci odražavaju se na obrascima bioraznolikosti na široj prostornoj skali, pri čemu dolazi do promjena u sastavu vrsta te do povećanja ili smanjenja međusobne sličnosti zajednica, odnosno do njihove homogenizacije ili diferencijacije. Dok se homogenizacija odnosi na smanjenje razlika među biološkim zajednicama, odnosno zajednice na različitim lokacijama postaju sličnije po sastavu vrsta, najčešće onih otpornih ili oportunističkih vrsta koje se mogu

proširiti i dominirati na više lokacija, diferencijacija označava povećanje razlika među biološkim zajednicama na uskom prostoru, najčešće kao posljedica reakcije na neki pritisak. Oba procesa su indikatori promjena u ekosustavu i važni su za razumijevanje kako ljudske aktivnosti mijenjaju prirodnu ravnotežu bioloških zajednica (Gauff i sur., 2023; Geng i sur., 2022; Rolls i sur., 2023). Standardni programi sustavnog praćenja uključuju identifikaciju fitoplanktonskih vrsta, čija brojnost i raznolikost služe kao dobar pokazatelj utjecaje promjena u okolišu, kao i cjelokupnog ekološkog statusa morskih ekosustava (Goodwin i sur., 2017; Porter i Hajibabaei, 2018). Međutim, za odvajanje klimatskih i antropogenih pritisaka od prirodne varijabilnosti te donošenje odluka o upravljanju obalnim područjem, potrebni su dugoročni setovi podataka (M. Edwards i sur., 2010; Henson i sur., 2010). Vremenski nizovi praćenja planktona dugo su pružale temelj informacija o pelagičkoj bioraznolikosti i omogućile su tumačenje promjena u regulaciji hranjivih tvari u oceanu, kontroli klime i hranidbenim mrežama koje podržavaju komercijalne vrste riba i zaštićene vrste. Podaci praćenja fitoplanktonskih zajednica analizirani mikroskopijom otkrili su značajna smanjenja njihove brojnosti u većem dijelu sjeveroistočnog Atlantika (K. F. Edwards i sur., 2023; Holland i sur., 2023; Schmidt i sur., 2020). Primjerice, primjetan je pad velikih dijatomeja i dinoflagelata diljem sjeveroistočnog Atlantika, koji tradicionalno podržavaju više trofičke razine poput riba i morskih sisavaca te povećanje frakcije pikofitoplanktona (Schmidt i sur., 2020). Također, na temelju dugoročnih podataka primijećene su promjene u sastavu skupina sjevernog Jadrana (Vlašiček i sur., 2025).

Okvirnom direktivom o morskoj strategiji (MSFD) utvrđen je popis od 11 deskriptora stanja okoliša za koje se mora postići dobro stanje (Direktiva 2008/56/EZ, Europska unija, 2008.). Fitoplankton je uključen u deskriptore 1, 2, 3 i 5 MSFD-a, koji je prvi put utvrđen 2008. (2008/56/EZ) (Europska unija, 2008.) i ažuriran 2017. (2017/848/EU) (Europska unija 2017a,b). Deskriptor 1 MSFD-a (D1C6) uključuje praćenje biološke strukture staništa i njegovih funkcija te prisutnost posebno osjetljivih ili ranjivih vrsta ili vrsta koje imaju važne ekološke funkcije. Ovi pokazatelji povezani su s ljudskim pritiscima na okoliš i stoga bi se mogli razviti dodatni pokazatelji za dobro stanje okoliša (GES, od engl. Good Environmental Status). Deskriptor 2 MSFD-a (D2C1, D2C2 i D2C3) odnosi se na novouvedene vrste (NIS, od engl. nonindigenous species); pravovremeno opažanje novih vrsta (D2C1) i pravovremeno opažanje pretvaranja novouvedenih u invazivne vrste (D2C2 i D2C3). Također, MSFD deskriptor 4 (morske hranidbene

mreže) i deskriptor 5 (eutrofikacija, uključujući štetno cvjetanje algi) odnosi se na učinkovito otkrivanje štetnih fitoplanktonskih vrsta već kada su prisutne u malom broju.

Postoji potreba za dosljednim pristupima i metodologijama za definiranje i procjenu dobrog stanja okoliša (GES, od engl. *Good Environmental Status*) u Mediteranu, budući da se trenutačne prakse razlikuju, odnosno Mediteranskim državama članicama nedostaje dosljedna metoda za procjenu dobrog stanja okoliša (GES) prema Okvirnoj direktivi o pomorskoj strategiji (MSFD) (Francé i sur., 2021). Navode se sastav i brojnost fitoplanktona, učestalost i intenzitet cvjetanja te biomasa kao pokazatelji kvalitete za procjenu fitoplanktonskih zajednica u obalnim i prijelaznim vodama (Europska komisija, 2000). Iako dugoročno praćenje fitoplanktonskih zajednica pokazuje da otkrivanje odgovora na promjenu razine hranjivih tvari nije jednostavno (Marchetto i sur., 2009) s obzirom na to da biomasa i sastav fitoplanktona mogu pokazivati različite obrasce promjena (Lugoli i sur., 2012). Biomasa obično reagira brže od vrsta sastav na promjene u razinama hranjivih tvari. Multiparametarski indeks fitoplanktona (MPI, engl. *Multimetric Phytoplankton Index*) predlaže se kao podrška politikama upravljanja za procjenu obalnih i prijelaznih ekosustava i provedbu Europske okvirne direktive o vodama. MPI uključuje Hulburtov indeks dominacije, učestalost cvjetanja i Menhinickov indeks raznolikosti, izračunato na osnovi sastava fitoplanktonskih vrsta te predstavlja cjelovit alat koji uključuje informacije o taksonomskom sastavu, broju stanica i biomasi (Chl *a*) (Garmendia i sur., 2013). Integracija informacija o klorofilu *a* te strukturi fitoplanktonske zajednice omogućuju bolje razumijevanje uvjeta okoliša, jer uključivanje dodatnih pokazatelja može učiniti indeks osjetljivijim, posebice ako se radio o procjeni stupnja eutrofikacije (Garmendia i sur., 2013). Koncentracije klorofila *a* također su uključene kako bi se osigurali podaci o biomasi i zajamčio kontinuitet i usporedba s prošlim procjenama. MPI je izračunat usrednjavanjem omjera dobivenih vrijednosti svakog pokazatelja onima referentnog mjesta koje karakterizira nizak antropogeni utjecaj.

1.2.4 Sustavno praćenje ekološki važnih vrsta fitoplanktona

Pod utjecajem specifičnih fizikalno-kemijskih uvjeta u obalnim vodama umjerenih mora mogu se razviti masovna cvjetanja fitoplanktona. Određene vrste koje uzrokuju takve cvatnje proizvode toksine i time djeluju na više trofičke razine, pa su poznate kao štetna cvjetanja algi (HAB, od engl. *Harmful Algal Blooms*) s izraženim ekološkim i ekonomskim posljedicama (Hinder i sur., 2011). U eutrofnim obalnim morima štetnim cvjetanjima pretežito dominiraju dijatomeje,

dinoflagelati i kokolitoforidi – skupine koje uključuju brojne vrste sposobne za formiranje velikih i dugotrajnijih cvjetanja (primjerice *Pseudo-nitzschia spp.*, *Chaetoceros spp.*, *Noctiluca scintillans*, *Dinophysis acuminata* i drugi). Nasuprot tome, druge skupine poput euglenofita i kriptofita češće stvaraju cvatnje manjeg opsega, lokalnog karaktera (Assmy i Smetacek, 2009).

Strane vrste (novouvedene, neautohtone, egzotične ili alohtone vrste - NIS, od engl. *non-indigenous species*) su vrste, podvrste ili niže taksonomske razine koje se pojavljuju izvan granica svog prirodnog područja rasprostranjenosti, a gdje mogu preživjeti te se potencijalno razmnožavati. Strane invazivne vrste su podskupina stranih vrsta koje zbog svog velikog reproduktivnog potencijala mogu imati negativan učinak na biološku raznolikost, funkcioniranje ekosustava, društveno-ekonomske vrijednosti i/ili ljudsko zdravlje u zahvaćenim regijama (Pyšek i Richardson, 2010). Prema Uredbi EU o prevenciji i upravljanju unošenja i širenja invazivnih stranih vrsta i Okvirnoj direktivi o morskoj strategiji, svaka država članica obvezuje se pratiti unošenje stranih vrsta. Sredozemno more jedno je od žarišta bioraznolikosti (Coll i sur., 2010) i uvođenje NIS-a može negativno utjecati na strukturu ekosustava i funkcija. Pojava novouvedenih vrsta može biti posljedica ljudskog djelovanja ili se može javiti kao posljedica klimatskih promjena, odnosno širenja područja obitavanja vrsta toplijih mora (Pinsky i sur., 2020; Stachowicz i sur., 2002). Uvođenje neautohtonih vrsta fitoplanktona najčešće je putem brodskih balastnih voda i obraštajem, što predstavlja najozbiljnije prijetnje ljudskom zdravlju, okolišu i resursima, čime su najzahvaćenije morske luke (Bailey, 2015; Galil i sur., 2014; Katsanevakis i sur., 2013). Brojna istraživanja pokazuju porast broja otkrivenih NIS vrsta (Galil i sur., 2018; Zenetos i sur., 2017). Što se tiče fitoplanktona, zajednicama balastnih voda dominiraju dijatomeje i dinoflagelati, uključujući potencijalno toksične vrste (Burkholder i sur., 2007; Cabrini i sur., 2019; Hallegraeff i Bolch, 1992).

1.3 Metabarkodiranje

Metabarkodiranje (engl. *metabarcoding*) metoda je umnažanja i sekvenciranja specifičnog slijeda nukleotida iz ukupne DNA okolišnog uzorka (Hajibabaei i sur., 2011). Ukupna DNA izolirana iz prikupljenog okolišnog uzorka. Sekvenciranjem sljedeće generacije (NGS, od engl. *Next Generation Sequencing*) korištenjem omogućeno je istovremeno sekvenciranje velikog broja različitih sekvenci koje potječu od različitih organizama, čime se dobiva detaljna informacija o

taksonomskoj strukturi i zastupljenosti cijele zajednice u uzorku (Valentini i sur., 2009; Taberlet i sur., 2012; Ruppert i sur., 2019).

1.3.1 Izbor markera za sekvenciranje

Opseg bioraznolikosti koji se može procijeniti metabarkodiranjem uvelike ovisi o izboru markera i korištenih početnica (Hadziavdic i sur., 2014). Mala podjedinica ribosomalne RNA, često kraće nazvana SSU (od engl. *small subunit ribosomal RNA*) ili 18S rRNA, među najčešće je korištenim markerima u istraživanjima morske bioraznolikosti (Duarte i sur., 2021; Wangensteen i sur., 2018; Zhang i sur., 2018). Prije svega, rRNA podjedinice funkcionalno su i evolucijski homologne u svim živim organizmima i stoga su zajedničke različitim skupinama organizama. Zbog svoje funkcije, geni rRNA visoko su konzervirani kako bi održali svoju funkciju, manje su osjetljivi na horizontalni prijenos gena (Jain i sur., 1999). Nadalje, sekvence se sastoje od 9 hipervarijabilnih regija (V1-V9) okruženih visoko konzerviranim regijama. Konzervirane regije služe kao mjesta za konstrukciju parova početnica, dok varijabilne regije omogućuju filogenetske analize (Lane i sur., 1985) sa širokim potencijalom taksonomske identifikacije i velikom taksonomskom razlučivosti između blisko povezanih svojti. Sekvenca gena za 18S rRNA daleko je najčešće ciljani genetski marker koji se koristi u studijama eukariotskog planktona (Lopes dos Santos i sur., 2022; Santoferrara i sur., 2020), s hipervarijabilnim regijama 4 (V4) i 9 (V9) koje se najčešće koriste za procjenu eukariotske raznolikosti, odnosno istraživanje fitoplanktonskih zajednica (Vaulot i sur., 2020), iako je V4 hipervarijabilna regija korištenija zbog duljine i bolje pokrivenosti u javnim referentnim bazama podataka. Velike i brzorastuće referentne baze SSU sekvenci pružaju idealan izvor za kvalitetnu taksonomsku identifikaciju i kvantifikaciju bioraznolikosti.

Osim markera za 18S rRNA, za istraživanje i procjenu raznolikosti fitoplanktonskih zajednica često su korištene regije D1/D2 velike podjedinice rRNA, 28S koja pruža višu taksonomsku razlučivost u odnosu na 18S, posebice za specifične skupine poput dinoflagelata (Sildever i sur., 2019; J. Wang i sur., 2025). Iako ova regija omogućuje detaljniju taksonomsku identifikaciju unutar određenih skupina diatomeja i dinoflagelata, ima smanjenu sposobnost umnažanja drugih fitoplanktonskih skupina. Također, u usporedbi s 18S, 28S još uvijek ima relativno manji broj dobro anotiranih referentnih sekvenci, što smanjuje sposobnost detekcije cjelokupne zajednice i ograničava njegovu primjenu u procjeni raznolikosti fitoplanktona. Osim markera koji su dio jezgrinog genoma, često korišteni markeri za metabarkodiranje fitoplanktona, regije su

kloroplastnih gena povezanih s fotosintezom poput gena *rbcL* (kodira veliku podjedinicu enzima RuBisCO) (Vasselon i sur., 2017; Turk Dermastia i sur., 2023) , gena *psbA* (kodira protein fotosustava II) (Man-Aharonovich i sur., 2010), kao i geni za 16S i 23S kloroplastnu rRNA koji omogućuju precizniju taksonomsku razlučivost unutar određenih fotosintetskih skupina (McDonald i sur., 2007; Sherwood i Presting, 2007; Decelle i sur., 2015). Često se koristi u kombinaciji s 18S kako bi se povećala pouzdanost identifikacije i smanjila pristranost uzrokovana ograničenjima jednog markera (MacNeil i sur., 2022a; Turk Dermastia i sur., 2023; Neri i sur., 2025).

1.3.2 Bioinformatička analiza i referentne baze podataka

Bioinformatička analiza uključuje niz računalnih postupaka kojima se sirovi sekvencirani podaci pretvaraju u informacije o sastavu i strukturi zajednice. Najčešće se korišteni računalni programi za filtriranje, grupiranje i taksonomsku identifikaciju dobivenih sekvenci su QIIME2 (Caporaso i sur., 2010; Dubois i sur., 2022), dada2 (Callahan i sur., 2016), USEARCH/VSEARCH (Rognes i sur., 2016) i mothur (Schloss i sur., 2009). Pri dodjeljivanju taksonomskog identiteta pojedinoj sekvenci (ASV, od engl. *amplicon sequence variants*) ili skupini sekvenci sličnog slijeda nukleotida (OTU, od engl. *operational taxonomic units*) koriste se informacije dobivene barkodiranjem koje su pohranjene u referentnim bazama podataka (Ratnasingham i Hebert, 2007). Visokokvalitetne referentne baze sekvenci moraju ispunjavati nekoliko kriterija, od kojih su dva ključna kriterija: potpunost i točnost. Potpunost se odnosi i na taksonomsku pokrivenost - uključivanje što je moguće više vrsta - i na taksonomsku dubinu - posjedovanje detaljnih informacija na različitim razinama taksonomske hijerarhije, od širokih skupina do pojedinačnih vrsta. Točnost, s druge strane, uključuje održavanje visoke kvalitete sekvenci, pri čemu su DNA sekvence pouzdane i bez pogrešaka, kao i osiguravanje točnih i aktualnih taksonomskih oznaka. Studije o raznolikosti fitoplanktona uvelike ovise o dobro održavanim i uređenim bazama podataka koje su ključne za točnu taksonomsku identifikaciju (Hleap i sur., 2021). Poznato je da odabir baze podataka povećava osjetljivost klasifikacije (Park i Won, 2018.), stoga je posljednjih godina objavljeno više odabranih eukariotskih referentnih baza podataka. Najveća i najčešće korištena javna referentna Baza DNA barkodova su *GenBank* Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information, NCBI*) (Benson i sur., 2013), BOLD (engl. *Barcode of Life Data System*) (Ratnasingham i Hebert, 2007) i baza podataka SILVA

(Quast i sur., 2013). Stoga ove baze podataka nude širu dostupnost referentnih DNA sekvenci fitoplanktonskih vrsta (Leray i sur., 2019). Postoje i mnoge druge baze podataka 18S koje sadrže ukupne eukariote, kao što su EukRibo (Berney, 2022) i MARES (Arranz i sur., 2020) za morske eukariote. PR2 referentna baza bila je prva baza sekvenci koja je postala dostupna za protiste (Guillou i sur., 2013). Stvoreno je nekoliko drugih specijaliziranih baza podataka za pružanje taksonomski potvrđenih sekvenci s ažuriranom nomenklaturom i metapodacima za različite skupine organizama i različite markerske regije, npr. *Diat.barcode* (Rimet i sur., 2019) 18S i *rbcL* dijatomeja, *dinoref* (Mordret i sur., 2018) za 18S dinoflagelata, *PhytoREF* (Decelle i sur., 2015) za 16S fotosintetskih eukariota; *PFR2* (Morard i sur., 2015) za foraminifere, *PHYTOPK28-DID2* (Grzebyk i sur., 2017) za 28S linija algi/fitoplanktona i mnoge druge.

1.3.3 Metabarkodiranje fitoplanktonskih zajednica

Zbog širokih mogućnosti primjene, metoda metabarkodiranja u morskom okolišu učestalo se koristi i ima dvojaku ulogu: može poslužiti kao probirni test za vrste ili skupine organizama od interesa te daje uvid u cjelokupni sastav zajednice (Taberlet i sur., 2018). Najznačajnija primjena ove metode je procjena bioraznolikosti i istraživanje sastava pojedinih zajednica u morskom stupcu ili sedimentu, odnosno praćenje promjena u prostorno-vremenskoj distribuciji vrsta i njihovoj relativnoj brojnosti (Andújar i sur., 2018; Apothéloz-Perret-Gentil i sur., 2021), što je ključno za razumijevanje dinamike ekosustava i odgovora na promjene okolišnih uvjeta (Burki i sur., 2021). Uvidom u raznolikost i sastav morskih zajednica, moguće je otkrivanje i praćenje promjena povezanih sa zagađenjem, klimatskim promjenama ili drugim poremećajima koji su posljedica ljudskog djelovanja, odnosno procjena zdravlja morskog okoliša (Pochon i sur., 2013). Također, ovom metodom je omogućeno opisivanje novih vrsta, odnosno otkrivanje skrivene raznolikosti koju nije moguće opisati tradicionalnim metodama (De Vargas i sur., 2015). Jedan od najistaknutijih primjera je ekspedicija *Tara Oceans*, tijekom koje je prikupljeno više od 300 uzoraka za analizu eukariotskih planktonskih zajednica putem eDNA metabarkodiranja na globalnoj razini čime je otkrivena neočekivano visoka raznolikost planktonskih eukariota, uključujući brojne dotad nepoznate skupine (de Vargas i sur., 2015). Metabarkodiranje se koristi u istraživanjima globalne rasprostranjenosti fitoplanktona u obalnim i priobalnim vodama (De Vargas i sur., 2015; Malviya i sur., 2016; Massana i sur., 2015), za bolje razumijevanje obrazaca raznolikosti planktonskih zajednica i njihov prostorni i vremenski sastav (Das i sur., 2019; Logares

i sur., 2018; Xue i sur., 2018), kao i sezonsku dinamiku (Berdjeb i sur., 2018; Nagarkar i sur., 2018). Istraživanja o sastavu i dinamici fitoplanktonskih zajednica također su proučavani na širem području Mediterana (Bittner i sur., 2013; Mordret i sur., 2023; Penna i sur., 2017; Piredda i sur., 2018b; Specchia i sur., 2023; Tragin i sur., 2018) koji je poznat kao područje visoke raznolikosti, ali je zahvaćen snažnim antropogenim pritiskom što rezultira gubitkom bioraznolikosti (Coll i sur., 2010; Gilbert i sur., 2014; Newton i sur., 2014). Hu i sur., 2016 zaključuje da metabarkodiranje omogućuje detaljniju rezoluciju sastava zajednica i bolje prepoznavanje sezonskih i prostorno specifičnih uzoraka fitoplanktonske dinamike, što potvrđuju i navedena istraživanja.

1.3.4 Metabarkodiranje fitoplanktona sjevernog Jadrana

Sve veći broj studija koristi DNA metabarkodiranje za istraživanje fitoplanktonskih zajednica u sjevernom (Armeli Minicante i sur., 2019; Neri i sur., 2024), srednjem i južnom Jadranu (Baričević i sur., 2024; Matek i sur., 2023). U ovom području primjena metabarkodiranja pridonosi produbljivanju spoznaja o prostornoj i vremenskoj raznolikosti fitoplanktonskih zajednica, osobito u kontekstu prijelaznih i oligotrofnih ekosustava. Specchia i sur. (2023) pokazali su da prostorne varijacije u fitoplanktonskom sastavu mogu biti učinkovito razlučene metabarkodiranja, pri čemu su detektirane populacijske strukture unutar rodova, poput roda *Tetraselmis*. Neri i sur. (2024) proveli su usporednu analizu mikroskopske i metabarkodne identifikacije pri čemu je metodom metabarkodiranja detektirano više od 150 vrsta, uključujući brojne kriptične i pikoplanktonske organizme koji su izostali u mikroskopskim analizama. U južnom Jadranu Baričević i sur. (2024) godišnjim uzorkovanjem kod otoka Lokruma otkrili su izraženu sezonalnost u sastavu planktonske zajednice i identificirali organizame prisutne tijekom cijele godine. Matek i sur. (2023) istražili su vertikalnu distribuciju fitoplanktona i njegovu interakciju s mikrobnom zajednicom tijekom ljetne stratifikacije, čime je pokazana dominacija parazitskih dinoflagelata iz reda Syndiniales koja ukazuje na važnu ulogu mikrobnih interakcija. Grižančić i sur. (2023) proveli su sustavno metabarkodiranje na dvije postaje sjevernog Jadrana te detektirali nekoliko rodova dijatomeja i dinoflagelata koji dotad nisu bili zabilježeni u ovom području. Osim toga, Knjaz i sur., 2024 su predstavili su prvu lokalno relevantnu, funkcionalno i taksonomski obogaćenu bazu transkriptoma dijatomeja sjevernog Jadrana što omogućuje detaljnu analizu ekspresije gena, postavlja temelje metatranskriptomike i daljnja molekularna istraživanja okoliša. Ove procjene, zajedno sa standardiziranim metodama svjetlosne mikroskopije, pomažu u stjecanju boljeg znanja u sveobuhvatnom praćenju skupina fitoplanktona u promjenjivom okolišu, poput sjevernog Jadrana.

1.4 Metabarkodiranje fitoplanktona prilikom sustavnog praćenja

Razvoj brzih i pouzdanih metoda sekvenciranja omogućio je primjenu molekularnih metoda poput metabarkodiranja u istraživanju sastava i dinamike fitoplanktonskih zajednica, kao i njihovo sustavno praćenje. Želja za integracijom metabarkodiranja u sustavno praćenje proizlazi iz primjene metabarkodiranja u praćenju promjena u bioraznolikosti fitoplanktona te njihovih prostornih i vremenskih promjena u okolišu (Bittner i sur., 2013; Penna i sur., 2017; Tragin i sur., 2018; Andújar i sur., 2018; Piredda i sur., 2018b; Mordret i sur., 2023; Specchia i sur., 2023), kao i potreba za brzim i efikasnim metodama. Primjena metode metabarkodiranja u sustavnom praćenju fitoplanktona nosi niz prednosti u odnosu na tradicionalne pristupe; primjenom automatiziranih sustava za rukovanje uzorcima i bioinformatičku analizu moguća je istovremena obrada većeg broja uzorka, dok je utjecaj ljudske pogreške na identifikaciju taksona višestruko smanjen. Važna prednost je i mogućnost detekcije rijetke i skrivene raznolikosti, posebice manjih frakcija fitoplanktonske zajednice, dok standardizacija metoda pridonose boljoj usporedivosti rezultata među različitim laboratorijima (Taberlet i sur., 2012; Ruppert i sur., 2019; Pawlowski i sur., 2021). No, zbog nedostatka jasnih temeljnih pravila za primjenu molekularnih metoda u sustavnom praćenju, potreban je razvoj preciznih smjernica kako bi se osigurala uspješna implementacija molekularnih metoda za određivanje i praćenje sastava morskih zajednica u rutinske programe sustavnog praćenja (Goldberg i sur., 2016; Thalinger i sur., 2021). Predlaže se niz preporuka i smjernica za usklađivanje i standardizaciju protokola prilikom implementacije u standardnim rutinskim programima praćenja kako bi se osigurala jednoznačnost i usporedba rezultata (Thalinger i sur., 2021; van der Loos i Nijland, 2021). Primjerice, kao način uzorkovanja prilikom sustavnog praćenja metabarkodiranjem predlaže se usklađivanje s načinom uzorkovanja u nacionalnim programima sustavnog praćenja, kako bi se osigurala usporedivost rezultata metabarkodiranja s onima dobivenim mikroskopskim analizama (Lindh i sur., 2023). Primjerice, u programima sustavnog praćenja Republike Hrvatske, Cvitković i sur. (2018), navode uzorkovanje Niskinovim crpcima kao metodu uzorkovanja fitoplanktonskih zajednica. Također, kako bi se osigurala pouzdanost metabarkodiranja kao prikladne metode za rutinsko sustavno praćenje, potrebno je optimizacijom sveukupnih protokola spriječiti sklonost lažno pozitivnim rezultatima, s obzirom na to da su metode za detekciju DNA izuzetno osjetljive i podložne kontaminaciji i unakrsnoj kontaminaciji između uzoraka (Goldberg i sur., 2015; Pawlowski i sur., 2020; van der Loos i Nijland, 2021; Lindh i sur., 2023) stoga mogu imati negativan utjecaj na

pouzdanost donesenih zaključaka (Alberdi i sur., 2018). S obzirom na to da je za određivanje taksonomske pripadnosti od ključne važnosti, posebna pažnja se pridaje nedovoljno popunjenim referentnim bazama sekvenci, budući da praznine utječu na nepotpunu identifikaciju zajednice u uzorku (Weigand i sur., 2019). van der Loos i Nijland, 2021 naveli su niz preporuka koje se mogu lako uspostaviti kako bi se doprinijelo ujednačavanju postupaka i lakšoj usporedbi dobivenih rezultata, poput korištenja komercijalnih kitova za izolaciju DNA u svrhu dobivanja izolirane DNA visoke čistoće, korištenje više različitih molekularnih markera za isti set podataka za identifikaciju veće bioraznolikosti, veća dubina sekvenciranja pridonosi cjelovitosti rezultata u usporedbi s brojem replikata (Alberdi i sur., 2018). Također, definiran je skup minimalnih smjernica za izvještavanje koje obuhvaćaju sve sastavne korake metabarkodiranja čime se osigurava pozadina potrebna za evaluaciju i razumijevanje rezultata istraživanja te su usmjerene na globalnu standardizaciju i povezivanje podataka iz različitih istraživanja, a uključuju informacije o vrsti uzoraka, vremenu, mjestu i načinu uzorkovanja, veličini uzorka, načinu i duljini pohrane, okolišnim podacima, kontrolama, metodama izolacije DNA, korištenim markerima, početnicama, pripremi knjižnice i sekvenciranju, bioinformatičkoj analizi, korištenim referentnim bazama, završnim rezultatima, pohrani i dostupnosti podataka i slično (Klymus i sur., 2024).

Razvijen je protokol za sustavno praćenje fitoplanktonskih zajednica metabarkodiranjem za praćenje štetnih cvjetanja mora u Ohotskom moru u Japanu (Sildever i sur., 2022) i Čileu (Yarimizu i sur., 2020). Također, navedene su smjernice za korištenje okolišne DNA u sustavnom praćenju fitoplanktona u skandinavskim morskim područjima kako bi se osnažila procjena bioraznolikosti kroz nadopunu metoda te omogućila njihova usporedba (Jerney i sur., 2023). Osim sustavnog praćenja morskih okoliša, nedavno su objavljene smjernice za metabarkodiranje u alpskim jezerima, koje sadrže detaljno razrađene protokole za analizu bentoskih dijatomeja, kao i za prokariotski i eukariotski fitoplankton (Domaizon i sur., 2021). Ove smjernice predstavljaju važan korak prema standardizaciji molekularnih metoda u različitim tipovima vodenih ekosustava. Trenutačno se metabarkodiranje ne koristi za usklađeno rutinsko praćenje morskog fitoplanktona u Jadranu, niti postoje smjernice za njegovu implementaciju.

Kontinuirano unaprjeđenje metodologije, nadogradnja referentne baze podataka te ujednačavanje i standardizacija metode omogućuju stvaranje snažnog i brzog alata s velikim potencijalom za primjenu metode metabarkodiranja u rutinskom sustavnom praćenju zajednica, nazvanog

Biomonitoring 2.0 (Baird i Hajibabaei, 2012; Pawlowski i sur., 2021; van der Loos i Nijland, 2021). Takav pristup nadopunio bi standardne metode sustavnog praćenja te bi omogućio kvalitetnije i dublje razumijevanje ekologije zajednica u morskom okolišu (Pawlowski i sur., 2021), posebice malih fitoplanktonskih skupina, poput piko- i nanoplanktona koje bi trebale biti uključene u pokazatelje stanja morskih ekosustava, budući da unatoč svojoj veličini imaju ključnu ulogu u trofičkim mrežama, kruženju hranjivih tvari i osjetljivo reagiraju na promjene okolišnih uvjeta (Massana, 2011; De Vargas i sur., 2015). Njihova prisutnost i dinamika stoga mogu poslužiti kao vrijedni bioindikatori ekološkog stanja mora (McQuatters-Gollop i sur., 2024). S obzirom na to da se dugoročne studije u istočnom sjevernom Jadranu koje pokazuju raznolikost i brojnost fitoplanktona temelje na morfologiji, uvođenje metode metabarkodiranja u programe sustavnog praćenja moglo bi razotkriti skrivenu raznolikost i produbiti znanje o obrascima pojavnosti fitoplanktona u tom području.

1.4.1 Ograničenja primjene metabarkodiranja u monitoringu

Glavna pitanja koja se postavljaju prilikom upotrebe metode metabarkodiranja kao metode za primjenu u sustavnom praćenju morskih zajednica su: (1) jesu li dugoročni skupovi podataka temeljeni na mikroskopiji usporedivi s identifikacijom koju pružaju molekularne metode i (2) je li metabarkodiranje dovoljno pouzdano za samostalno korištenje. Budući da se procjene bioraznolikosti i programi sustavnog praćenja temelje na promatranjima svjetlosnim mikroskopom postoji duga povijest prikupljenih podataka, pa je važno pronaći vezu između rezultata dobivenih metabarkodiranjem i klasičnim mikroskopskim metodama kako se kontinuiranost podataka ne bi mijenjala. Skupovi podataka dobiveni dugoročnim praćenjem trebali bi biti usporedivi s novim metodama u svrhu zadržavanja važnih serija informacija o bioraznolikosti na dugoj vremenskoj skali izbjegavanjem odstupanja u promatranom sastavu vrsta između metoda i osigurala točnost analize dugoročnih promjena. Također, neusklađenost protokola otežava ponovljivost istraživanja te njihovu usporedbu s rezultatima dobivenim sličnim istraživanjima (Gaither i sur., 2022). Jedan od glavnih izazova u implementaciji metabarkodiranja u rutinske programe sustavnog praćenja su i manjkave referentne baze podataka (Weigand i sur., 2019). Dva glavna nedostatka baza podataka su nepotpunost te nedovoljna kontrola nad pohranjenim podacima. Ovisno o području proučavanja, referentne baze pune se podacima različitom brzinom, što rezultira neujednačenošću u pokrivenosti informacijama među različitim skupinama. Zbog zahtjevnosti istraživanja i velikih razmjera morskog ekosustava, još uvijek nedostaju informacije o sekvenciranim ciljanim

sljedovima za širok raspon morskih organizama (Weigand i sur., 2019). S druge strane, količina barkodova i velika brzina kojom se oni pohranjuju rezultira skraćenim procesom provjere, čime se smanjuje kvaliteta i pouzdanost baze podataka (Hamsher i sur., 2013), dok je ponekad dobro uređenim bazama podataka ograničena dostupnost na način da se ne mogu slobodno koristiti. Također, zbog nejednake sklonosti početnica prema određenom dijelu genoma prilikom analize okolišnog uzorka za kojeg je karakterističan veliki broj genetski raznovrsnih organizama, broj kopija dobivenih metodom sekvenciranja nije u jasnoj korelaciji s brojnosti pojedinačnih vrsta sadržanih u uzorku, a određivanje brojnosti pojedinih vrsta, odnosno relativne biomase bilo bi poželjno svojstvo prilikom praćenja promjena u bioraznolikosti. Nadalje, broj kopija genoma pojedinog organizma je povezan s brojem stanica koje ga izgrađuju, odnosno veličinom samog organizma. U slučajevima kada je jedina potrebna informacija potvrda prisutnosti ili odsutnosti vrsta, apsolutna brojnost nije strogo neophodna i indeksi za procjenu ekosustava funkcioniraju dobro čak i bez njih (Aylagas i sur., 2014).

1.5 Ciljevi i hipoteze

Opći cilj ovog istraživanja bio je uspješno opisati bioraznolikosti i prostorno-vremensku dinamiku eukariotskog fitoplanktona sjevernog Jadrana metodom metabarkodiranja te odrediti glavne smjernice prema uspostavljanju metode metabarkodiranja u sustavnom praćenju fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana.

Specifični ciljevi bili su:

C1 Izraditi novu i opsežnu referentnu bazu sekvenci male podjedinice ribosomalne RNA (18S) za taksonomsku anotaciju eukariotske fitoplanktonske zajednice u sustavnom praćenju metodom metabarkodiranja

C2 Usporediti dva načina uzorkovanja (fitoplanktonska mreža i crpac) fitoplanktona za opis bioraznolikosti metodom metabarkodiranja u sustavnom praćenju sjevernog Jadrana

C3 Opisati bioraznolikost i prostorno-vremensku dinamiku fitoplanktona sjevernog Jadrana s dodatnim fokusom na vrste od osobitog ekološkog značaja

C4 Odrediti način implementacije metabarkodiranja u sustavno praćenje Jadrana usporedbom opisa fitoplanktonske zajednice metabarkodiranjem s mjerenim parametrima aktualnog programa monitoringa Jadrana RH.

U skladu s navedenim ciljevima postavljene su sljedeće hipoteze:

H1 Odabir načina uzorkovanja fitoplanktona utječe na opis bioraznolikosti fitoplanktona metabarkodiranjem i može biti značajan korak kod implementacije metabarkodiranja u sustavno praćenje stanja morskog okoliša

H2 Metabarkodiranje omogućava opsežan opis taksonomske raznolikosti, prostorno-vremenske pojavnosti (distribucije) različitih svojti i detekciju ekološki značajnih svojti eukariotskog fitoplanktona sjevernog Jadrana

H3 Metabarkodiranje omogućava detekciju ekološki značajnih svojti, poput toksičnih i nezavičajnih svojti u zajednici eukariotskog fitoplanktona sjevernog Jadrana koje su ključni pokazatelji u sustavnom praćenju obalnog područja RH.

2. MATERIJALI I METODE

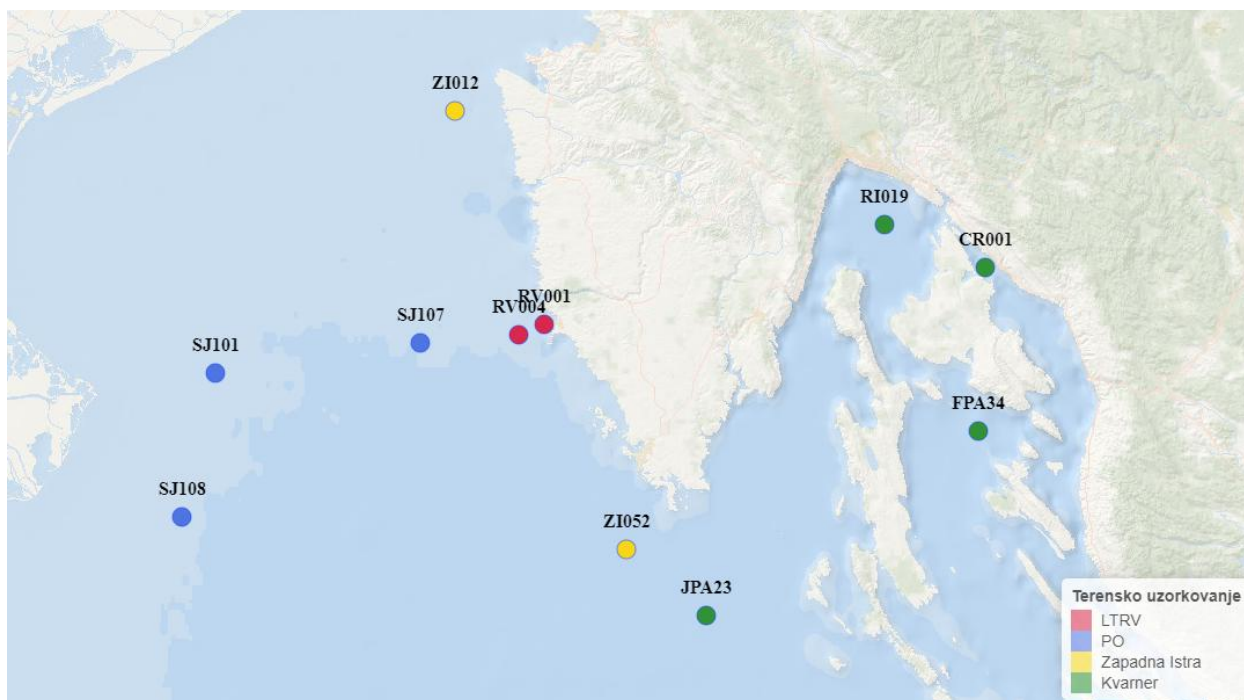
Za potrebe istraživanja fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana metabarkodiranjem, korištena je metodologija koja se sastoji od sljedećih koraka: 1. terensko uzorkovanje, 2. laboratorijska obrada uzoraka koja uključuje izolaciju DNA, umnažanje regije barkoda i sekvenciranje, 3. bioinformatička obrada i analiza podataka.

2.1 Terensko uzorkovanje

2.1.1 Plan uzorkovanja

Terensko uzorkovanje fitoplanktonske zajednice provodilo se kroz tri godine (2020 – 2022) na ukupno 11 postaja uključenih u dugoročne programe praćenja stanja morskog ekosustava sjevernog Jadrana ([Slika 2.1](#), [Prilog 1](#)). Na postajama rovinjskog akvatorija, RV001 i RV004 (terensko uzorkovanje LTRV) uzorkovanja su provedena mjesečno (osim travnja 2020. zbog pandemije COVID-19), na postajama istraživačkog transekta prema rijeci Po (RV001, SJ107, SJ101, SJ108, terensko uzorkovanje PO), područja Kvarnera (CR001, RI019, JPA23, FPA34) i šire zapadne obale Istre (ZI012 i ZI052) uzorkovanja su provedena prema mogućnostima plovidbe istraživačkih brodova, a minimalno u sezonskoj učestalosti.

Istraživačke postaje odabrane su kako bi se pokušalo obuhvatiti što opsežnije područje sjevernog Jadrana (obalna i otvorena područja mora). Za terenska uzorkovanja korištene su istraživačke brodice i brodovi Instituta Ruđer Bošković; „Burin“, „Triton“ i „Vila Velebita“.



Slika 2.1 Karta s označenim postajama uzorkovanja. Crveno – postaje RV001 i RV004 terenskog uzorkovanja LTRV, plavo – postaje transekta prema rijeci Po (uključujući i RV001) – terensko uzorkovanje PO, žuto – postaje zapadne istarske obale, zeleno – postaje Kvarnerskog zaljeva

2.1.2 Metode uzorkovanja

Uzorkovanja fitoplanktonske zajednice su se provodila na dva načina: Niskinovim crpcima i fitoplanktonskom mrežom. Pomoću Niskinovih crpaca uzorkovano je na dvije dubine: 5 i 20 metara. Uzorci morske vode iz crpca predfiltrirani su preko mrežice veličine pora 300 μm kako bi se uklonili veći planktonski organizmi. Fitoplanktonska mreža, promjera otvora 60 cm, duljine 2 m i veličine oka $\sim 50 \mu\text{m}$ korištena je za prikupljanje uzoraka vertikalnim potezom kroz vodeni stupac, od dna do površine.

2.1.3 Terenska obrada uzoraka

Obrada uzoraka započela je odmah nakon prikupljanja uzoraka na istraživačkom brodu (uzorkovanja brodom „Vila Velebita“) ili unutar 2h od uzorkovanja (uzorkovanja brodicama „Burin“ i „Triton“) u laboratoriju vakuum filtracijom pomoću filtracijskog sustava spojenog na vakuum pumpu. Volumen uzorka dobivenog iz Niskinovog crpca koji se koristio za filtraciju bio je do zasićenja filtera ili maksimalno 2,5 L morske vode. Volumen uzorka koji se koristio za filtraciju mrežnog uzorka bio je do zasićenja filtera ili maksimalno 150 mL od ukupnog mrežnog

uzorka ukupnog volumena do 500 mL. Za filtraciju uzorka morske vode iz crpca korišteni su membranski filteri polikarbonatnog tipa, promjera 47 mm te veličine pora 0,8 µm (Merck Millipore, Njemačka) dok su za mrežne uzorke korišteni membranski filteri nitroceluloznog tipa, promjera 47 mm te veličine pora 1,2 µm (Merck Millipore, Njemačka). Uzorci na membranskim filterima pohranjivani su u malim plastičnim Petri posudicama (filteri mrežnih uzoraka) ili *cryo* tubicama (filteri uzoraka iz crpaca) u zamrzivače na -80°C do daljnje laboratorijske obrade (Baricevic i sur., 2022).

2.2 Laboratorijska obrada uzoraka

2.2.1 Izolacija DNA

Za izolaciju ukupne genomske DNA korišteni su komercijalni kitovi - *Gentra Puregene Kit* (Qiagen, Njemačka) i *NucleoSpin eDNA Water Kit* (Macherey-Nagel, Njemačka) prema preporučenim uputama proizvođača prilagođenima za uzorke na filteru promjera 47 mm. Izolacija DNA korištenjem oba komercijalna kita za izolaciju ukupne DNA, sastojala se od zajedničkih koraka razbijanja stanica te fizičkog i kemijskog uklanjanja neželjenih staničnih dijelova kroz serije centrifugiranja (centrifuge 5804R i 5424R Eppendorf, Njemačka), ispiranja i pročišćavanja ukupne DNA iz uzorka. Korištenjem Gentra Puregene Kit izolirani su mrežni uzorci s terenskog uzorkovanja LTRV (od siječnja 2020. do travnja 2021.), dok su preostali mrežni uzorci s terenskog uzorkovanja LTRV (od svibnja 2021. do prosinca 2022.), svi uzorci iz crpaca i mrežni uzorci s terenskih uzorkovanja PO, Zapadna Istra i Kvarner izolirani pomoću *NucleoSpin eDNA Water Kit*.

Za izolaciju DNA korištenjem *Gentra Puregene Kit* (Qiagen, Njemačka) korišten je protokol za izolaciju DNA iz tkiva. Filter s uzorkom postavljao se u plastičnu epruvetu za centrifugiranje od 15 mL tako da je strana filtera koja sadrži uzorak okrenuta prema unutrašnjosti epruvete. Na filter je zatim dodano 3 mL otopine za lizu stanica (*Cell Lysis Solution*). Sadržaj na filteru ispiran je i resuspendiran pipetiranjem dodane otopine za lizu te je sadržaj u epruveti dodatno homogeniziran vorteksiranjem. Slijedila je inkubacija na 65 °C, 15 minuta. U epruvetu s uzorkom i otopinom za lizu zatim je dodano 15 µL proteinaze K (*Puregene Proteinase K*), a sadržaj je homogeniziran pažljivim okretanjem epruvete. Uzorak je zatim inkubiran na 55 °C, dva sata uz povremenu homogenizaciju okretanjem epruvete. Nakon inkubacije dodano je 10 µL otopine Rnaze A (*RNase A solution*) te je uzorak homogeniziran pažljivim okretanjem epruvete i inkubiran na 37 °C, 60

minuta. Nakon inkubacije uklonjen je filter te su uzorci zatim brzo hlađeni na ledu 3 minute. Slijedi dodavanje 1 ml otopine za precipitaciju proteina (*Protein Precipitation Solution*), vorteksiranje 20 sekundi, dodatna inkubacija na ledu, 5 minuta te centrifugiranje (2 000 g, 10 minuta). Dobiveni supernatant pažljivo je dodan u novu epruvetu koja je sadržavala 3 mL izopropanola. Nakon homogenizacije pažljivim okretanjem epruvete, slijedilo je centrifugiranje (2 000 g, 3 minute). Nakon uklanjanja supernatanta, na talog je dodano 3 mL 70%-tnog etanola te je talog ispiran pažljivim okretanjem epruvete. Slijedilo je centrifugiranje (2 000 g, 1 minuta), odlijevanje supernatanta, dodatno sušenje taloga na zraku 10-15 minuta te završno otapanje taloga kojeg čini pročišćena ukupna DNA dodavanjem 100 µL otopine za hidrataciju DNA (*DNA Hydration Solution*) te inkubacija na 65 °C, 60 minuta. Ukoliko talog sačinjen od DNA nije bio u potpunosti otopljen, postupno je dodavano dodatnih 100 µL otopine za hidrataciju dok se nije otopio u potpunosti, do maksimalnih 500 µL. Konačno, uzorci s otopljenom ukupnom DNA inkubirani su preko noći na sobnoj temperaturi te su pohranjivani u mikroeprijetama.

U slučaju izolacije DNA korištenjem *NucleoSpin eDNA Water Kit* (Macherey-Nagel, Njemačka), filter s uzorkom postavljao se u epruvetu za centrifugiranje od 5 mL tako da je strana filtera koja sadrži uzorak okrenuta prema unutrašnjosti epruvete. Na filter je zatim dodano 2 mL pufera za lizu stanica (*Dissolve*). Sadržaj na filteru ispiran je i resuspendiran pipetiranjem dodanog pufera za lizu te je nakon dodatne homogenizacije na vorteks uređaju u sadržaj u epruveti dodano 25 µL Proteinaze K. Slijedila je kratka homogenizacija vorteksiranjem te inkubacija na sobnoj temperaturi 60 minuta, uz kontinuirano umjereno ljuljanje na nagibnoj mješalici. Po završetku inkubacije, filter je uklonjen, a u lizat je dodano 360 µL pufera za uklanjanje inhibitora (*Acid*). Nakon lagane homogenizacije, slijedilo je centrifugiranje (4 500 g, 2 minute). Supernatant je prenesen u sterilnu 15 mL epruvetu te je dodano 50 µL pufera za vezanje DNA (*Prec*) i 25 µL suspenzije za zadržavanje DNA (*NucleoTrap® matrix*). Uzorci su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi uz umjereno ljuljanje na nagibnoj mješalici, nakon čega je slijedilo centrifugiranje (4 500 g, 3 minute). Talog je resuspendiran s 400 µL pufera (*Resu*) na uređaju vorteks te je suspenzija s DNA prenesena u mikroeprijetu od 1,5 mL. Slijedilo je centrifugiranje (10 000 g, 1 minuta), odbacivanje supernatanta, te ispiranje koje se sastojalo od resuspendiranja taloga u 400 µL pufera (*WB*) na uređaju vorteks te centrifugiranja (10 000 g, 1 minuta). Završno ispiranje ponovljeno je s 300 µL otopine WB, talog je resuspendiran i suspenzija je prenesena na kolonicu (*NucleoSpin® eDNA XS column*), nakon čega je slijedilo je sušenje suspenzije s DNA i kolonice centrifugiranjem

(10 000 g, 2 minute). Na kolonicu je dodano 100 µL pufera za eluciju (*BE*) i kratko resuspendirano na uređaju vorteks. Nakon inkubacije od 1 minute na sobnoj temperaturi, izolirana DNA eluirana je centrifugiranjem (10 000 g, 1 minuta).

Kvantitativna i kvalitativna mjerenja izolirane DNA provedena su spektrofotometrijski UV-VIS spektrofotometrom (*Implen NanoPhotometer* Pearl, Njemačka) pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm.

2.2.2 Sekvenciranje

Ukupna izolirana genomska DNA poslana je na uslugu sekvenciranja sljedeće generacije tehnologijom sekvenciranja Illumina. Priprema DNA knjižnica za metabarkodiranje i sekvenciranje provedeni su u tvrtki AllGenetics & Biology SL (www.allgenetics.eu) za uzorke terenskog uzorkovanja LTRV i MacroGen Inc. za uzorke terenskih uzorkovanja PO, Zapadna Istra i Kvarner. Za umnažanje oko 430 pb hipervarijabilne V4 regije gena za malu podjedinicu ribosomalne RNA (18S rRNA), korišten je par početnica TAREuk454FWD1 (5'-CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATTCC-3') i TAREukREV3 (5'-ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G) A-3') specifičan za eukariotske organizme (Piredda i sur., 2018a; Stoeck i sur., 2010) s Illumina adapterima na 5' kraju koji su omogućili sekvenciranje. Sekvenciranje se provodilo na platformi Illumina, koju karakterizira sekvenciranje visokog prinosa i mogućnost paralelnog sekvenciranja većeg broja uzoraka. U prvom koraku amplifikacije PCR reakcije provedene su u konačnom volumenu od 12,5 µL, pri čemu je reakcijska smjesa sadržavala 1,25 µL izolirane DNA, 0,5 µM pojedine početnice, 3,13 µL otopine Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix (NZYTech) te ultračistu vodu do konačnog volumena. Program amplifikacije uključivao je inicijalnu denaturaciju na 95 °C tijekom 5 min, zatim 30 ciklusa denaturacije na 95 °C tijekom 30 sekundi, vezanje početnica na 46 °C tijekom 45 sekundi te elongacije na 72 °C tijekom 45 sekundi, uz završnu elongaciju na 72 °C tijekom 7 minuta (Vierna i sur., 2017). U drugom koraku amplifikacije dodani su adapteri potrebni za multipleksiranje knjižnica. Reakcije su provedene u volumenu od 25 µL, pri čemu su sadržavale 2,5 µL PCR produkta prve amplifikacije, 1 µM dvostruko indeksiranih početnica, 6,5 µL Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix-a te ultračistu vodu do konačnog volumena. Temperaturni program uključivao je inicijalnu denaturaciju na 95 °C tijekom 5 minuta, zatim 5 ciklusa od 95 °C tijekom 30 sekundi, 60 °C tijekom 45 sekundi i 72 °C tijekom 45 sekundi te završnu elongaciju na 72 °C tijekom 7

minuta (Vierna i sur., 2017). Veličina knjižnica provjerena je elektroforezom na 2 % agaroznim gelovima s dodatkom boje GreenSafe (NZYTech), a fragmenti su vizualizirani pod UV svjetlom. Knjižnice su potom pročišćene pomoću magnetskih kuglica Mag-Bind RXNPure Plus (Omega Bio-tek). Konačne knjižnice kvantificirane su pomoću Qubit dsDNA HS Assay kita (Thermo Fisher Scientific, SAD) te pomiješane u ekvimolarnim omjerima. Sekvenciranje je provedeno na platformi Illumina NovaSeq PE250. Sirovi Illumina paired-end podaci za svaku knjižnicu sastojali su se od forward (R1) i reverse (R2) očitavanja pohranjenih u odvojenim *fastq* datotekama, uključujući i kvalitativne vrijednosti očitavanja. Moguće prisustvo adapter-dimera uklonjeno je korištenjem programa Cutadapt v3.5 (Martin, 2011). Kvaliteta *fastq* datoteka procijenjena je alatom FastQC (Andrews, 2010), a rezultati su objedinjeni i prikazani pomoću softvera MultiQC (Ewels i sur., 2016).

Rezultati sekvenciranja svakog uzorka preuzeti su u obliku *fastq* datoteka koje sadržavaju informacije o mnogobrojnim sljedovima nukleotida, kao i odgovarajućih ocjena kvalitete sekvenciranja za pojedini uzorak u digitalnom obliku. Za bolju procjenu rezultata, u skup podataka uvršteni su pozitivni i negativni kontrolni uzorci. Pozitivni kontrolni uzorci sastojali su se od izmiješanih akseničnih kultura iz kolekcije kultura iz Centra za istraživanje mora. U svrhu otkrivanja kontaminacija, korišteno je nekoliko tipova kontrolnih uzoraka: (1) uzorak filtrirane sterilne morske vode koja se koristi za ispiranje uzorka, (2) uzorak DNA dobiven u koraku izolacije genomske DNA bez materijala iz morskog okoliša te (3) uzorci dobiveni umnažanjem PCR-om bez dodavanja izoliranog DNA materijala kako bi se provjerilo je li cijeli tijek rada, od filtracije do sekvenciranja, bez kontaminacije ([Prilog 9](#)).

2.3 Izrada referentne baze fitoplanktonskih sekvenci

2.3.1 Preuzimanje referentnih sljedova iz javno dostupnih baza podataka

Za izradu referentne baze fitoplanktonskih sekvenci CIMPhy18 korišten je programski paket ARB v.7.0 (Ludwig i sur., 2004). ARB je programski paket za rukovanje sekvencama i njihovim pridruženim informacijama, prvotno dizajniran za podatke ribosomalne RNA, koji uključuje razne alate za obradu, održavanje i analizu nukleotidnih baza podataka. ARB programski paket podržava uvoz podataka sekvenci pohranjenih u različitim formatima datoteka, uključujući sekvence s dodatnim informacijama u *arb*, *genbank* i *fasta* formatima. Početni skup sekvenci za izradu referentne baze fitoplanktonskih sekvenci male podjedinice ribosomalne RNA, CIMPhy18, (engl.

CIM Phytoplankton 18S ribosomal RNA) preuzet je iz javno dostupnih referentnih baza Silva (Pruesse i sur., 2007; Quast i sur., 2013) i PR2 (engl. *Protist Ribosomal Reference Database*) (Guillou i sur., 2013). Sekvence pohranjene u ovim referentnim bazama porijeklom su izbaze nukleotidnih sekvenci međunarodne suradnje (engl. *The International Nucleotide Sequence Database Collaboration, INSDC*) te su poznate kao visoko kurirane baze podataka. U referentnu bazu CIMPhy18 uključene su referentne sekvence eukariotskih skupina fitoplanktona: Dinophyta (dinoflagelati), Ochrophyta koja sadrži Bacillariophyta (dijatomeje) i ostale Ochrophyta (Bolidophyceae, Chrysophyceae, Dictyophyceae, Pelagophyceae, Pinguiphyceae, Raphidophyceae, Synchromophyceae, Synurophyceae), Cryptophyta (kriptofiti), Haptophyta (uključuje Pavlovophyceae i Prymnesiophyceae, kokolitoforide) i Chlorophyta (zelene mikroalge), kao što je predloženo u Not i sur., 2012. Iz referentne baze Silva, verzija *138.1 SSU Ref NR 99* (uvezena u program ARB kao *.arb* datoteka) koja sadržava referentne nukleotidne slijedove svih eukariota, preuzete su fitoplanktonske sekvence koje pripadaju navedenim fitoplanktonskim skupinama te je konstruirano filogenetsko stablo temeljeno na početnom skupu sekvenci iz Silva referentne baze primjenom algoritma Neighbor-Joining (NJ). NJ algoritam korišten je zbog svoje učinkovitosti u rekonstrukciji odnosa među velikim brojem taksona, uz zadržavanje niske ukupne duljine stabla. Postojeći NCBI pristupni brojevi (engl. *Accession Number*) fitoplanktonskih sekvenci iz Silva referentne baze podataka uspoređeni su s NCBI pristupnim brojevima iz PR2 referentne baze podataka. Na taj način detektirani su svi pristupni brojevi iz referentne baze PR2 povezani s fitoplanktonskim sekvencama koji nisu bile prisutne u bazi podataka Silva te su preuzeti iz referentne baze NCBI (Benson i sur., 2013) korištenjem Entrez sustava za višedjelnu pretragu informacija (engl. *Entrez Molecular Sequence Database System*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Search/entrezfs.html) u genbank (.gb) formatu i uvezeni su u ARB.

2.3.2 Poravnanje i provjera pruzetih sekvenci

Za poravnanje preuzetih referentnih sekvenci korišteno je programsko proširenje za obradu sekvenci ARB EDIT4 (engl. *ARB sequence editor*). Sekvence su usklađene prema referentnom višestrukum poravnanju temeljenom na sekundarnoj strukturi rRNA za regiju *E. coli* ALI 16S, uz korištenje vizualnog prikaza konzerviranih regija, čime se osigurava strukturna konzistentnost poravnanja između svih uključenih sekvenci. Naknadno, izvršena je vizualna provjera i ručno ispravljanje zaostalih neadekvatnih poravnanja. Za potrebe očuvanja filogenetski informativnih pozicija korišteno je postojeće poravnanje iz referentne baze SILVA (Quast i sur., 2013), unutar

koje su položaji već strukturirani u skladu sa sekundarnom strukturom rRNA molekule. Nakon poravnanja sekvenci, konstruirano je filogenetsko stablo referentne baze podataka CIMPhy18 primjenom algoritma Neighbor-Joining.

Nakon poravnanja sekvenci i izrade filogenetskog stabla, slijedilo je kuriranje samog sadržaja referentne baze, odnosno uklanjanje svih sekvenci nezadovoljavajuće kvalitete. Za referentnu poziciju unutar gena, korištene su eukariotske specifične početnice TAREuk454FWD1/TAREukREV3 (Piredda i sur., 2018; Stoeck i sur., 2010.), ciljajući oko 430 pb V4 hipervarijabilne regije male podjedinice ribosomskog RNA gena. Navedeni par početnica poznat je kao najčešće korišten skup početnica za opisivanje eukariotske raznolikosti, posebno fitoplankton u uzorcima iz okoliša (Lopes dos Santos i sur., 2022.) i stoga se koristio kao smjernica. Sekvence kojima nedostaje glavina nukleotidnog slijeda unutar te regije (> 50% nukleotida karakterističnih za regiju), sekvence sa slijedom od 4 ili više nepoznatih nukleotida, nukleotidni slijedovi s 8 ili više homopolimera, kao i sekvence koje nisu mogle biti poravnate s preostalima, uklonjene su iz konačne verzije referentne baze. U referentnu bazu CIMPhy18 nisu uključene sekvence koje su potencijalno smanjene pouzdanosti, odnosno sekvence koje: (1) nisu taksonomski određene do razine roda ili vrste, (2) koji su potekle iz sekvenciranja okolišnog uzorka (eng. *environmental sample*) te (3) sekvence koje su definirane do razine roda kao *uncultured*.

Kako bi se izbjegla taksonomska nedosljednost kao posljedica korištenja sekvenci iz različitih referentnih baza s različitim taksonomskim sistematikama, taksonomske informacije svake sekvence CIMPhy18 usklađene su prema sistematici *AlgaeBase* (<http://www.algaebase.org>) pomoću alata za usklađivanje taksonomije pri GBIF (od engl. *The Global Biodiversity Information Facility*, www.gbif.org) (Guiry i sur., 2014). Taksonomska sistematika CIMPhy18 usklađena je na sedam taksonomskih razina koje su prihvaćene kao tradicionalne Linnéove razine (carstvo, koljeno, razred, red, porodica, rod, vrsta) (Linnaeus, 1735).

Nakon što su referentne fitoplanktonske sekvence iz referentnih baza Silva i PR2 poravnate, kurirane i pozicionirane u filogenetsko stablo, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) baza sekvenci pretražena je u svrhu provjere dodatnih referentnih sekvenci koje pripadaju fitoplanktonskim taksonima koji nisu prisutni u dvije spomenute referentne baze podataka, pretraživanjem nukleotidnih slijedova [pojedina fitoplanktonska skupina + 18S/SSU/small

ribosomal subunit], podnesenih u NCBI u razdoblju 01.01.2023.-01.01.2025 kako bi se obuhvatile recentne sekvence koji su možda izostali u navedenim referentnim bazama. Nove fitoplanktonske sekvence preuzete su u .gb formatu te su unesene u ARB EDIT4, poravnate te ručno provjerene zadovoljavaju li gore navedene uvjete. Također, referentnim sekvencama pridodane su taksonomski i filogenetski kurirane sekvence dobivene barkodiranjem fitoplanktonskih kultura iz kolekcije kultura Centra za istraživanje mora. Za potrebe naknadnog uključivanja dodatnih sekvenci u već konstruirano filogenetsko stablo korišten je parsimony pristup implementiran u ARB-u. Ova metoda omogućuje brzo i pouzdano dodavanje novih sekvenci („*quick add to tree*“) bez potrebe za ponovnom rekonstrukcijom cjelokupnog stabla, pri čemu se novi sljedovi pozicioniraju na filogenetsko stablo na temelju minimalnog broja evolucijskih promjena u poravnanju. Dodatne sekvence taksonomski su i filogenetski potvrđene te su dodane u CIMPhy18 zajedno s popratnim metapodacima. U referentnu bazu sekvenci koja se sastoji od 18S fitoplanktonskih sekvenci, uključene su i njihove taksonomske identifikacije zajedno sa širokim rasponom popratnih povezanih podataka: NCBI pristupni broj, datum uzorkovanja, autori pohranjene sekvence, lokacija uzorkovanja i sl.. Svakom novom unosu automatski je dodijeljen jedinstveni ARB naziv koji sadrži troslovnu kraticu roda, iza koje slijedi kratica vrste i broj u slučaju višestrukih unosa iste vrste.

Kako bi se osigurala kvaliteta samih sekvenci stvorene referentne baze (engl. *sequence quality filtering*), one su provjerene i validirane te su nepouzdanе sekvence uklonjene iz referentne baze, ukoliko nisu bile zadovoljavajuće kvalitete (engl. *database curation*). Primjerice, nepotpune sekvence koje su za regiju od interesa (regija koja je zahvaćena korištenim početnicama u istraživanju) bile kraće za više od polovice broja nukleotida koji je procijenjen za tu regiju, one su uklonjene kao nepouzdanе s obzirom na to da, iako se radi o hipervarijabilnoj regiji, postoji vjerojatnost da se radi o greškama prilikom sekvenciranja. Osim toga, zbog korištenja raznih parova početnica i regije za sekvenciranje mogu biti razmještene duž gena, čime sekvenca ne zahvaća glavninu regije od interesa, pa su i takve sekvence uklonjene. Takve prekratke sekvence siromašne su informacijama te ne mogu biti pouzdano taksonomski određene. Slično tome, iz referentne baze uklonjene su i sekvence koje u željenoj regiji posjeduju insert dulji od polovice broja nukleotida procijenjenih za tu fitoplanktonsku skupinu. Osim same duljine referentnih sekvenci, njihova kvaliteta je određena i greškama sekvenciranja, koje su najčešće prikazane kao neodređene baze (N), stoga su sve referentne sekvence koje sadrže više od osam neodređenih baza,

odnosno oko 2% ukupnog broja nukleotida, također uklonjene iz završne verzije CIMPhy18. Nadalje, s obzirom na to da je bilo potrebno poravnati referentnu bazu, sve sekvence za koje nije bilo moguće poravnanje niti u jednom smjeru sa sekvencama unutar iste skupine, uklonjene su kao nepouzidane.

2.3.3 Provjera uspješnosti taksonomske anotacije referentne baze CIMPhy18 u odnosu na referentne baze Silva i PR2

Uspješnost anotacije baze CIMPhy18 u bioinformatičkoj obradi uzoraka metabarkodiranja provjerena je na dva tipa uzoraka: 1. kontrolni/probni uzorci zajednice različitih fitoplanktonskih kultura Centra za istraživanje mora (uzorci MOCK3 i MOCK4) i 2. evaluacijski set okolišnih uzoraka iz različitih izvora. Kontrolni/testni MOCK uzorci pripremljeni su spajanjem jednakih volumena i brojnosti različitih, odabranih fitoplanktonskih kultura ([Tablica 3.1](#)). Set okolišnih uzoraka (ukupno 24 uzorka) za provjeru CIMPhy18 pripremljen je preuzimanjem iz javno dostupne baze podataka ENA (engl. *European Nucleotide Archive*, www.ebi.ac.uk/ena/) fastq datoteka uzoraka metabarkodiranja dviju istraživačkih postaja, Biološke stanice Roscoff (u tekstu: Roscoff) i Zoološke stanice Anton Dohrn (u tekstu: Napulj) kojima su pridruženi i odabrani uzorci seta podataka Centra za istraživanje mora ovog istraživanja (u tekstu: CIM) ([Prilog 2](#)). Postupak DNA izolacije, sekvenciranja i bioinformatička analiza za potrebe provjere referentne baze bila je provedena kao za ostale okolišne uzorke CIM seta podataka ovog istraživanja (poglavlja 2.2, 2.4). Taksonomska klasifikacija dobivenog skupa ASV-ova provedena je koristeći tri referentne baze: Silva (Quast i sur., 2013), PR2 (Guillou i sur., 2013) i CIMPhy18. U slučaju referentne baze PR2 v5.1.0, uzorci su taksonomski klasificirani na temelju cijelog sadržaja referentne baze te su naknadnom obradom rezultata izdvojene sekvence koje pripadaju referentne sekvence eukariotskih skupina fitoplanktona: Dinophyta (dinoflagelati), Ochrophyta koje čine Bacillariophyta (dijatomeje) i ostale Ochrophyta (Bolidophyceae, Chrysophyceae, Dictyophyceae, Pelagophyceae, Pinguiphyceae, Raphidophyceae, Synchromophyceae, Synurophyceae), Cryptophyta (kriptofiti), Haptophyta (uključuje Pavlovophyceae i Prymnesiophyceae, kokolitoforide) i Chlorophyta (zelene mikroalge), kao što je predloženo u Not i sur., 2012. U slučaju referentne baze Silva, verzija SSU r138.2 pretražena je za navedene fitoplanktonske skupine te su preuzete sekvence pripadale isključivo fitoplanktonskim skupinama.

Cijeli set od 24 evaluacijska uzorka analiziran je zajedno. Bioinformatička analiza pratila je iste navedene korake kao analiza okolišnih uzoraka u programskom alatu *mothur* (Schloss i sur., 2009) (poglavlje 2.4.1) za sve tri referentne baze. Nakon grupiranja u ASV (od engl. *amplicon sequence variants*), daljnja obrada u računalnom programu *mothur* odvija se zasebno za svaku pojedinu referentnu bazu. Taksonomska klasifikacija fitoplanktonske zajednice evaluacijskog seta okolišnih uzoraka taksonomski je klasificirana na temelju svake pojedine referentne baze zasebno primjenjujući istovjetne uvjete: metodom *Naive Bayesian classifier* (Wang i sur., 2007), postavljanjem minimalnog praga pouzdanosti (engl. *bootstrap*) na 80.

Dobivenim rezultatima taksonomske identifikacije na temelju referentnih baza Silva i PR2 usklađene su taksonomske razine u skladu s taksonomskom organizacijom/sistematikom referentne baze CIMPhy18. U setovima podataka zadržani su samo ASV-ovi koji su taksonomski određeni do razine roda ili vrste za svaku pojedinu referentnu bazu. Tablicama (3) s rezultatima za detektirane fitoplanktonske ASV-ove za svaku pojedinu referentnu bazu, pridružena je informacija o referentnoj bazi te su te tablice povezane u jednu kako bi se omogućila daljnja statistička analiza i vizualizacija rezultata u programskom paketu R (R Core Team, 2024).

Zbog varijacija u dubini sekvenciranja broj fitoplanktonskih sekvenci normaliziran je na temelju broja sirovih sekvenci pojedinog uzorka. Normalizacija brojnosti vršila se na način da se umnožak apsolutnog broja sirovih sekvenci za pojedini fitoplanktonski rod u uzorku i medijana vrijednosti dubine sekvenciranja unutar skupa podataka podijelio s vrijednosti dubine sekvenciranja za navedeni uzorak. Relativne učestalosti izračunate su na razini roda kao omjer brojnosti fitoplanktonskih sekvenci tog roda i ukupne brojnosti fitoplanktonskih sekvenci tog uzorka.

Dobiveni rezultati primjenom svake referentne baze međusobno su uspoređeni na temelju brojnosti i raznolikosti fitoplanktonskih rodova pomoću Kruskal-Wallis testa i *post hoc* Dunn testom za usporedbu između pojedinih parova uzoraka. Za procjenu potencijalnih razlika u određivanju fitoplanktonske bioraznolikosti pojedinih uzoraka izračunati su indeksi alfa raznolikosti — Shannon, Simpson, inverzni Simpson i Pielou indeks — dok su obrasci beta raznolikosti analizirani na temelju prisutnosti i brojnosti fitoplanktonskih rodova korištenjem Bray-Courtis indeksa različitosti na temelju udaljenosti koje su statistički analizirane permutacijskom analizom varijance (PERMANOVA, adonis2) na temelju 999 permutacija. Analize su provedene uz pomoć

R paketa phyloseq (v1.48.0) i vegan (v2.0-4). Sve računalne analize, statističke obrade i vizualizacije provedene su u RStudio okruženju (v2024.09.1).

CIMPhy18 je dostupna u formatima cimphy18_mothur.fasta i cimphy18_mothur.tax za obradu u programu mothur (Schloss i sur., 2009) te cimphy18_dada2.fasta prilagođena za program dada2 (Callahan i sur., 2016). Preuzimanje datoteka baze moguće je na zahtjev putem interne repozitorske platforme Laboratorija za evolucijsku ekologiju, Centra za istraživanje mora, a uz objavu znanstvenog rada o izradi CIMPhy18 referentne baze, bit će pohranjena i u repozitoriju otvorenog pristupa.

2.4. Bioinformatička analiza

2.4.1 Obrada sirovih sekvenci

Neobrađeni podaci sekvenciranja u obliku *fastq* datoteka obrađeni su koristeći računalni paket *mothur* (verzija 1.47.0) (Schloss, 2009). Bioinformatički protokol (engl. *bioinformatic pipeline*) proveden je prema predloženom standardnom operativnom postupku (engl. *Standard Operating Procedure, SOP*, https://mothur.org/wiki/miseq_sop/), uz minimalne izmjene. Prvi korak obrade uključio je pridruživanje sirovih sljedova pripadajućim uzorcima (engl. *demultiplexing*), nakon čega slijedi formiranje kontiga (engl. *contigs*) spajanjem komplementarnih sljedova iz oba smjera očitavanja (engl. *paired-end*). Iz seta podataka su zatim uklonjeni kontizi niske kvalitete, odnosno kontizi koji su duljine veće od 450 nukleotida te kraći od 200 nukleotida, koji sadrže homopolimere dulje od osam nukleotida te one koji sadrže neodređene baze. Visokokvalitetne sekvence koje su identične (engl. *unique*), odnosno imaju isti slijed su se zatim grupirale zajedno te su se poravnale na temelju poravnanja referentnih sekvenci koje čine referentnu bazu CIMPhy18. Nakon poravnanja, stupci koji sadrže samo znakove praznine ("-") uklonjeni su, kako bi se smanjila duljina poravnatih sljedova. U nastavku su sekvence grupirane u klastere ASV (engl. *Amplicon Sequence Variants*) prema međusobnoj sličnosti u sekvenci (engl. *clustering*), uz maksimalnu toleranciju razlike od jednog nukleotida s ciljem uzimanja u obzir pogreški sekvenciranja. Prepoznavanje i uklanjanje potencijalnih kimera provedeno je koristeći alat VSEARCH (Rognes i sur., 2016). Taksonomska klasifikacija ukupne fitoplanktonske zajednice provedena je usporedbom procesiranih sekvenci s referentnom bazom sekvenci CIMPhy18 metodom *Naive Bayesian classifier* (Wang i sur., 2007), postavljanjem minimalnog praga pouzdanosti (engl. *bootstrap*) na 80.

2.4.2 Statistička analiza i vizualizacija rezultata

Za analizu i opisivanje fitoplanktonskih zajednica sjevernog Jadrana korišteno je nekoliko pokazatelja – brojnost, relativna učestalost te raznolikost.

Brojnost se odnosi na ukupan broj sekvenci pripasan pojedinoj taksonomskoj razini. Brojnost sekvenci u uzorku prikazana je kao normalizirana brojnost, a normalizacija se vršila na način da se umnožak apsolutnog broja sekvenci za pojedini takson (A) u uzorku (S) i medijana vrijednosti dubine sekvenciranja unutar skupa podataka podijelio s vrijednosti dubine sekvenciranja za navedeni uzorak (S). Uzorci s izrazito niskom brojnošću fitoplanktonskih sekvenci (< 20) isključeni su iz daljnje analize.

$$Brojnost(A, S) = \frac{Broj\ generiranih\ sekvenci(A, S) \times medijan(D)}{D(S)}$$

Gdje je:

A – pojedini takson (na razini vrste, roda ili skupine),

S – pojedini uzorak

D – dubina sekvenciranja, odnosno broj sirovih sekvenci za pojedini uzorak u setu podataka

Transformacija seta podataka u relativne učestalosti provedena je izračunavanjem omjera između broja detektiranih sekvenci pojedinog fitoplanktonskog taksona u uzorku te ukupnog broja fitoplanktonskih sekvenci detektiranih za taj uzorak čime je relativna učestalost izražena kao udio pojedinog taksona unutar svakog uzorka. Pregled relativne učestalosti pojedine fitoplanktonske skupine, izražen je kao suma relativnih učestalosti svih taksona koji taksonomski pripadaju navedenoj skupini. Ova transformacija omogućuje uvid u učestalost fitoplanktonskih skupina u uzorcima, umjesto rada sa apsolutnim brojem sekvenci svake skupine koji su kod podataka metabarkodiranja prisutni u velikom rasponu vrijednosti. Vrijednosti relativnih brojnosti taksona izračunate su zasebno za svaki uzorak, čime je osigurana međusobna usporedivost sastava zajednica u različitim prostorno-vremenskim kontekstima.

Raznolikost je korištena kao mjera broja detektiranih različitih fitoplanktonskih taksona, rodova ili skupina u pojedinom uzorku ili skupu uzoraka. Također, za procjenu alfa raznolikosti, izračunati su indeksi alfa raznolikosti; Shannon, Simpson, inverzni Simpson i Pielou indeks (Kim i sur., 2017) u R programskom paketu vegan (Oksanen, i sur., 2022).

Za analize vremenskih obrazaca, sezone su definirane pripadajućim mjesecima kao: proljeće (ožujak, travanj, svibanj), ljeto (lipanj, srpanj, kolovoz), jesen (rujan, listopad, studeni) i zima (prosinac, siječanj, veljača).

Sve računalne analize, statističke obrade i vizualizacije provedene su analizu i vizualizaciju rezultata korišteno je programsko okruženje R (verzija 4.4.1) u RStudio okruženju (v2024.09.1). U R okruženju korišteni su i specijalizirani paketi (1) za analizu podataka - *phyloseq* za učitavanje, integraciju i analizu podataka (McMurdie i Holmes, 2013), *vegan* za analizu alfa i beta raznolikosti (Oksanen, i sur., 2022) i (2) vizualizaciju rezultata - *ggplot2* (Wickham, 2009), *patchwork* za udruživanje prikaza, *eulerr* za prikaz stvarnih presjeka između skupova, *leaflet* za izradu geografske karte postaja.

Analiza nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja (nMDS, od engl. *Non-metric Multidimensional Scaling*) omogućila je vizualizaciju uzoraka u reduciranoj dimenzionalnosti, na temelju Bray-Curtis indeksa koji je korišten za kvantifikaciju sličnosti u sastavu zajednica čime se ocijenila njihova međusobna prostorna bliskost u zajedničkom ekološkom prostoru na temelju podataka o relativnoj učestalosti i raznolikosti fitoplanktonskih rodova. NMDS je konfiguriran za dvije dimenzije ($k = 2$), a broj pokušaja optimizacije postavljen je na 100 (trymax = 100). PERMANOVA test primijenjen je za statističku evaluaciju razlika među skupinama na temelju matrice udaljenosti funkcijom *adonis2()* iz programskog paketa *vegan* (Oksanen, i sur., 2022). Ako su pokazane značajne razlike, naknadno je primjenjivan i Tukey HSD (od engl. *Honestly Significant Difference*) *post hoc* test s Bonferroni korekcijom kako bi se utvrdilo između kojih grupnih parova postoje statistički značajne razlike u sastavu zajednica. Također, korištena je i funkcija *betadisper()* za testiranje homogenosti varijance između grupa.

Za identifikaciju rodova koji najviše doprinose razlikama u sastavu zajednica s obzirom na vremenske obrasce sezonalnosti korištena je SIMPER analiza (engl. *Similarity Percentage Analysis*), temeljena na Bray-Curtis matrici različitosti. Analiza je provedena pomoću funkcije *simper()* iz R paketa *vegan*. SIMPER analiza kvantificira doprinos svakog roda ukupnim razlikama među uzorcima, što omogućuje identifikaciju rodova koji najviše doprinose razlikama i time dominiraju u diferencijaciji zajednica.

Za opis strukture i dinamike fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana na temelju rezultata dobivenih metabarkodiranjem, korišteni su podaci o raznolikosti i brojnosti na taksonomskoj razini

roda, čime je omogućeno uvid u opće obrasce sastava zajednice. S druge strane, za karakterizaciju ekološki značajnih taksonomskih skupina, korišteni su taksoni, definirani na najnižoj taksonomskoj razini na koju je pojedini ASV bio pouzdano klasificiran — bilo da se radi o razini roda ili vrste, ovisno o taksonomskoj razlučivosti.

Proveden je probir dobivenih fitoplanktonskih zajednica u potrazi za novodetektiranim vrstama i vrstama koje bi mogle biti značajne za promatrani ekosustav. Popis štetnih i potencijalno toksičnih taksona preuzet je s UNESCO IOC HAB Programme (<https://hab.ioc-unesco.org/>). Taksoni su podijeljeni u toksične (engl. *toxic*), štetne, ali ne-toksične (engl. *harmful non-toxic*) (u tekstu: štetne) i siva lista (engl. *greylist*) te su zajedničkim imenom nazvani HAB (od engl. *Harmful algal blooms*) taksoni. Dobiveni rezultati uspoređeni su s UNESCO IOC HAB popisom kako bi se detektirali štetni i toksični taksoni u dobivenom setu podataka sjevernog Jadrana.

Novootkrivene fitoplanktonske vrste za sjeverni Jadran definirane su kao one koje: (1) nisu uvrštene u najnoviji kontrolni popis fitoplanktona istočnog Jadrana prema Viličić i sur., 2002. te (2) fitoplanktonske vrste, odnosno taksoni koji se ne nalaze na popisu detektiranih u bazama podataka dugoročnog sustavnog praćenja metodom svjetlosne mikroskopije Centra za istraživanje mora. Popis fitoplanktonskih taksona na razini vrste i roda iz dva navedena izvora usklađen je koristeći *Species matching tool* (www.gbif.org) kako bi se osiguralo najrecentnije taksonomsko nazivlje te je uspoređen s dobivenim rezultatima kako bi se identificirali novootkriveni taksoni koji su prisutni u setu podataka, ali nisu na popisu ranije detektiranih.

Za usporedbu podataka za omjer ekološke kvalitete (OEK) pri izračunu Multiparametrijskih indeksa fitoplanktona (MPI) dobivenih metabarkodiranjem i mikroskopijom, provedena je analiza korelacije i jednostavne linearne regresije. Prvo je provedena Pearson korelacijska analiza pomoću funkcije *cor.test()* kako bi se procijenila povezanost između metabarkodnih i mikroskopskih podataka. Zatim je primijenjena linearna regresija, *lm()* s ciljem kvantifikacije odnosa između varijabli.

2.5 Usporedba rezultata s rezultatima sustavnog praćenja RH

Indeksi bioraznolikosti fitoplanktonskih zajednica izračunati su prema Izvješću 'Analiza biološke metode ocjene ekološkog stanja za fitoplankton, morske cvjetnice i ribe u europskim interkalibracijskim tipovima prijelaznih voda Mediterana' (Cvitković i sur., 2018), prilagođenima

za rezultate dobivene metabarkodiranjem. Opis bioloških zajednica fitoplanktona podrazumijevao je: abundanciju fitoplanktonske zajednice, sastav vrsta, omjer brojnosti dijatomeja i dinoflagelata, pregled stranih i potencijalno toksičnih vrsta (vrste od osobitog ekološkog značaja) te izračun Multiparametrijskog indeksa.

2.5.1 Izračun Multiparametrijskog indeksa fitoplanktona

Multiparametrijski indeks, kojeg su predložili Facca i sur., 2014, izračunat je iz podataka brojnosti i sastava fitoplanktonske zajednice pomoću: Hulburtovog indeksa dominacije, učestalosti cvatnji i Menhinickovog indeksa bioraznolikosti. Za izračunavanje navedenih metrika korištene su samo informacije o fitoplanktonskom sastavu taksonomski identificiranog do razine vrste, odnosno pojedinačni taksoni određeni do razine roda. Korišteni su skupovi podataka s terenskog uzorkovanja LTRV taksonomski određeni metodama metabarkodiranja i svjetlosne mikroskopije kao standardizirane metode.

(1) Hulburtov indeks dominacije ($\delta 2$) za rezultate metabarkodiranja izračunat je prema prema formuli:

$$\delta 2 = rel_abund(n1) + rel_abund(n2)$$

$rel_abund(n1)$ – relativna učestalost najdominantnije vrste

$rel_abund(n2)$ – relativna učestalost druge najdominantnije vrste

(2) Učestalost cvatnji pokazana je kao broj koliko je puta relativna abundancija jedne vrste premašila 50% ukupne abundancije uz uvjet da je koncentracija klorofila a premašila dogovorene granične vrijednosti (1,092 ili $\log_{10}(x)=12,37$).

(3) Menhinickov indeks raznolikosti (D) prilagođen je za rezultate metabarkodiranja i izračunat je prema formuli:

$$D = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

S – broj vrsta

N – ukupan broj klasificiranih fitoplanktonskih sekvenci

Menhinickov indeks korigiran je množenjem s faktorom korekcije u cilju smanjivanja pogreške nastale zbog izostavljanja pojedinih organizama koji nisu determinirani do razine vrste već su navedeni kao grupa vrsta (npr. *Pseudo-nitzschia spp.*). Faktor korekcije izračunat je kao omjer

relativne abundancije organizama određenih do razine vrste i ukupne abundancije koja uključuje abundanciju organizama određenih do razine vrste.

(4) Vrijednost koncentracije klorofila *a* transformirana je logaritmiranjem po bazi 10. Logaritamska transformacija klorofila *a* omogućuje usklađivanje vrijednosti za izračun Multiparametrijskog indeksa fitoplanktona.

Za izračun ekološkog stanja korišten je omjer ekološke kvalitete (OEK). Omjer ekološke kakvoće za Hulburtov indeks (100 - $\delta 2$), učestalost cvatnji (100 - F) i Menhinickov indeks (D) određen je kao omjer između srednje godišnje vrijednosti za određenu postaju i referentne vrijednosti.

$$\text{Omjer ekološke kakvoće} = \frac{\text{Srednja godišnja vrijednost mjerenja na određenoj postaji}}{\text{Referentna vrijednost}}$$

Omjer ekološke kakvoće za koncentraciju klorofila *a* izračunat je kao omjer referentne vrijednosti i srednje godišnje antilogaritmirane vrijednosti na određenoj postaji.

$$\text{Omjer ekološke kakvoće (Chl } a) = \frac{\text{referentna vrijednost}}{\log(\text{srednja godišnja vrijednost na određenoj postaji})}$$

Omjer ekološke kakvoće (OEK) podijeljen je u pet kategorija, od 0 do 1, a koje se odnose na pet statusa ekološke kvalitete: vrlo dobro (0,81-1,00), dobro (0,61-0,80), umjereno (0,41-0,60), loše (0,21-0,40) i vrlo loše (0-0,20) ([Tablica 2.1](#)).

Tablica 2.1 Vrijednosti omjera ekološke kakvoće (OEK) za kategorije ekološkog stanja

Kategorija ekološkog stanja	OEK
Vrlo dobro	0,81 - 1,00
Dobro	0,61 - 0,80
Umjereno	0,41 - 0,60
Loše	0,21 - 0,40
Vrlo loše	0 - 0,2

Pri izračunavanju MPI indeksa, brojčana vrijednost Hulburtovog indeksa i učestalosti cvatnji se oduzimala od 100. Konačna vrijednost MPI indeksa dobila se kao srednja vrijednost od sva 4 omjera ekološke kakvoće (OEK) metrika koje su uključene u MPI indeks:

$$MPI = \text{srednja vrijednost } [OEK (100 - \delta 2); OEK (100 - F); OEK (D); EQR (Chl a)]$$

$\delta 2$ – Hulburtove indeks dominacije

F – Učestalost cvatnji

D – Menhinickov indeks raznolikosti

Chl *a* – Koncentracija klorofila *a*

Na temelju dobivenih rezultata, Multiparametrijski indeks fitoplanktona (MPI) izračunat je za dvije metode analize (metabarkodiranje i mikroskopija) na postajama RV001 i RV004, tijekom tri uzastopne godine (2020.–2022.).

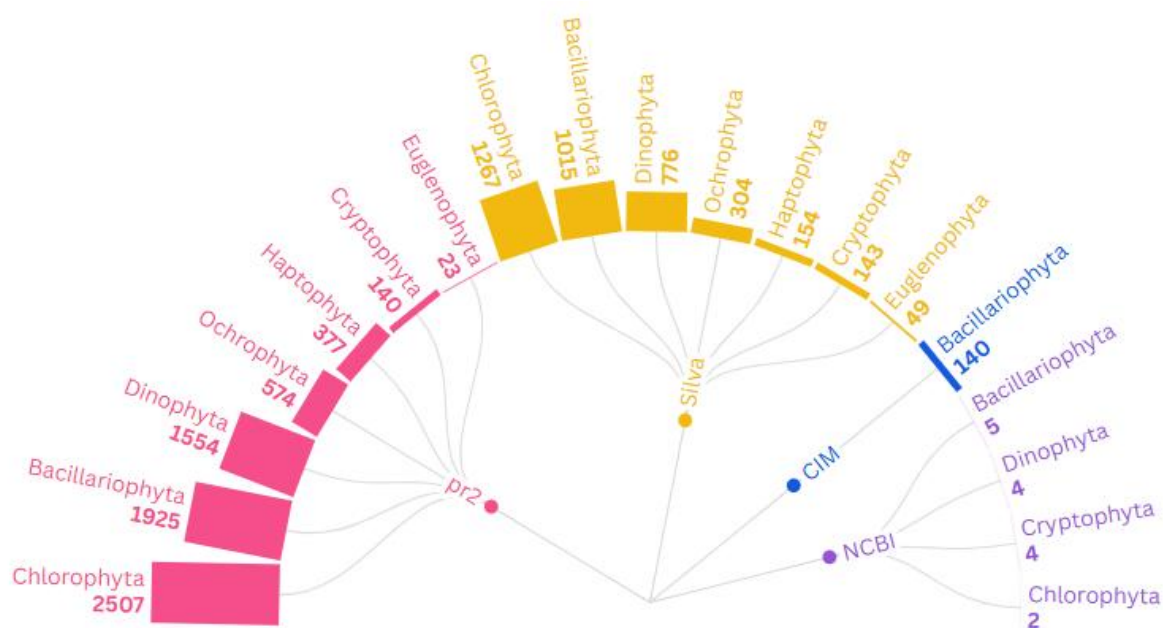
3. REZULTATI

3.1 Referentna baza fitoplanktonskih sekvenci male podjedinice rRNA - CIMPhy18

Korištenjem dvije javno dostupne baze podataka Silva i PR2 te set referentnih sekvenci CIM-a produciran barkodiranjem fitoplanktonskih kultura, nadopunjeni sa sekvencama iz referentne baze NCBI, uspješno je izrađena referentna baza fitoplanktonskih sekvenci male podjedinice CIMPhy18. CIMPhy18 sadrži ukupno 10 963 referentnih sekvenci, koje su sve opisane NCBI pristupnim brojem (engl. *Accession Number*). Referentne sekvence CIMPhy18 pripadaju fitoplanktonskim skupinama Chlorophyta, Dinophyta, Haptophyta, Ochrophyta, Cryptophyta i Euglenophyta. Svaka referentna sekvenca u bazi osim pristupnog broja i same sekvence, sadrži i dodatne podatke koji opisuju sekvencu kao što su: jedinstveni kratki zapis imena sekvence, taksonomski opis, podatke o autoru/autorima sekvence, podatke o načinu objavljivanja sekvence (znanstvena publikacija/časopis ili izravni podnesak, engl. *direct submission*), datumu i lokaciji uzorkovanja, tipu staništa na lokaciji uzorkovanja, kratki opis/naziv sekvence i podatak o duljini sekvence ([Prilog 3](#), [Prilog 4](#)).

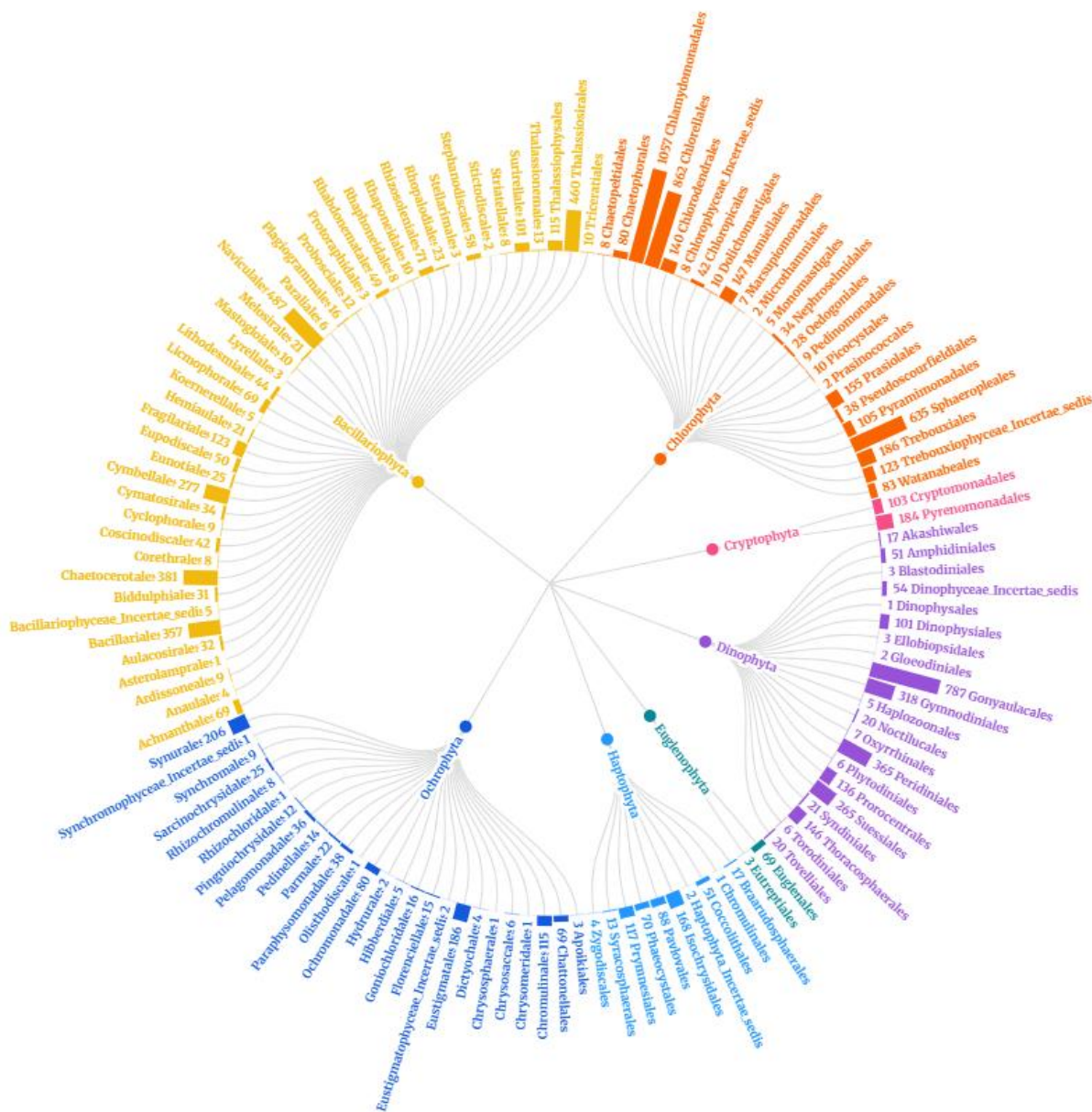
Za većinu referentnih sekvenci nedostaju podaci o uzorkovanju pa tako tek 38,12 % njih ima podatak o mjestu uzorkovanja, a 22,54% podatke i o tipu i podrijetlu uzorka (primjerice morska voda, sediment, ledenjak). Osim toga, veliki broj sekvenci iz referentne baze (5 445 sekvenci) nije objavljeno (*unpublished*), dok je kao dio znanstvene publikacije objavljeno 5 518 unosa/sekvenci. Najveći broj unosa/sekvenci porijeklom je iz referentne baze PR2 (7 100 unosa ili 64,76%) dok je iz referentne baze Silva 3 708 sekvence ili 33,82%. Ukupno 140 sekvenci porijeklom je iz baze barkodova fitoplanktonskih kultura Centra za istraživanje mora, a samo 15 sekvenci preuzeto je direktno iz baze NCBI ([Slika 3.1](#)).

Najveći broj sekvenci u referentnoj bazi pripada skupini zelenih algi (Chlorophyta), 3 776 ili 34,44%, zatim dijatomejama (Bacillariophyta) 3 085 (28,14%) i dinoflagelatima (Dinophyta) 2 334 referentne sekvence (21,29%). Ostale skupine predstavljene su s manjim brojem sekvenci: ostali Ochrophyta (8,01%), Haptophyta (4,84%), Cryptophyceae (2,62%) te Euglenophyceae (0,66%).



Slika 3.1 Brojnost referentnih sekvenci CIMPhy18 grupirano i naznačeno različitim bojama prema javno dostupnoj referentnoj bazi iz koje potječu

Kod zelenih algi najučestaliji redovi su Chlamydomonadales i Chlorelales, vrste kojih su najčešće predstavnici slatkovodnih staništa. Kod diatomeja, najveći udio sekvenci pripada redovima Naviculales i Thalassiosirales, kod dinoflagelata Gonyaulacales i Peridinales, dok od ostalih Ochrophyta, najučestaliji su redovi Eustigmatales i Synurales. Kod Haptophyta, referentne sekvence većinom pripadaju redovima Isochrysidales i Prymnesiales, dok su Cryptophyta većinom zastupljeni sekvencama redova Pyrenomonadales i Cryptomonadales. Euglenales je najčešći red iz skupine Euglenophyta ([Slika 3.2](#)).



Slika 3.2 Dendrogram zastupljenih redova fitoplanktonskih skupina (naznačene u različitim bojama) referentne baze CIMPhy18. Uz svaki red naveden je broj pripadajućih referentnih sekvenci u bazi CIMPhy18.

Taksonomski, referentne sekvence raspoređene su u šest koljena, 34 razreda, 127 redova, 308 porodica s ukupno 956 različitih fitoplanktonskih rodova. Najraznovrsnije fitoplanktonske skupine su zelene alge (Chlorophyta) s 332 roda, dijatomeje (Bacillariophyta) s 224 roda i dinoflagelati (Dinophyceae) s 200 rodova dok su ostale skupine zastupljene s manjim brojem rodova: ostali Ochrophyta 101, Haptophyta 42, Cryptophyceae 19 te Euglenophyceae s 11 rodova. Ukupno 18

fitoplanktonskih rodova predstavljeno je s više od 100 referentnih sekvenci. Kod dinoflagelata, prema broju sekvenci, najbrojniji su rodovi *Alexandrium* (373 referentne sekvence) i *Gambierdiscus* (198 referentnih sekvenci). *Chaetoceros* i *Skeletonema* najbrojniji su dijatomejski rodovi s 337 i 207 referentnih sekvenci. Kod zelenih algi najveći broj referentnih sekvenci pripada rodovima *Chlorella* (318 sekvenci) i *Chlamydomonas* (312). Od ostalih Ochrophyta, sa po 135 sekvenci predstavljani su *Synura* i *Nannochloropsis*, dok je kod Haptophyta najčešći rod *Phaeocystis* (70 sekvenci). Najbrojniji predstavnici Cryptophyta i Euglenophyta su *Cryptomonas* s 91 i *Trachelomonas* s 30 pripadajućih referentnih sekvenci.

Referentna baza sadrži isključivo referentne sekvence taksonomski određene do razine roda ili vrste. Do razine vrste određeno je 7 769 (70,86%), a do razine roda preostalih 3 194 referentnih sekvenci (29,14%). Najviše sekvenci koje nisu određene do razine vrste pripada rodovima *Chlorella*, *Alexandrium* i *Symbiodinium* (>100 referentnih sekvenci).

3.1.2 Provjera uspješnosti taksonomske klasifikacije na temelju CIMPhy18 referentne baze u odnosu na referentne baze Silva i PR2

Rezultati dobiveni bioinformatičkom obradom uzoraka metabarkodiranja kontrolne zajednice sastavljene od osam fitoplanktonskih kultura (*mock* uzorci, [Tablica 3.1](#)) uspoređeni su s popisom fitoplanktonskih kultura korištenih za izradu zajednice. Sve tri referentne baze (Silva, PR2 i CIMPhy18) uspješno su taksonomski odredile sve zastupljene rodove u *mock* uzorcima. Samo je *Chaetoceros costatus* (CIM935) uspješno taksonomski određen u uzorcima do razine vrste koristeći sve tri referentne baze dok za *C. curvisetus* i *C. cf curvisetus* (CIM931 i CIM957) nije bilo moguće pouzdano taksonomski odrediti kompleks vrsta na temelju referentne baze Silva. Za vrstu *Thalassiosira rotula* (CIM861) je, korištenjem CIMPhy18, dio sekvenci uspješno taksonomski određen do razine vrste (*T. rotula*), dok je dio sekvenci taksonomski određen kao *Thalassiosira unclassified*. Korištenjem referentne baze PR2, sekvence vrste *T. rotula* taksonomski su određene kao *T. rotula*, *T. gravida*, *Thalassiosira unclassified* te *Thalassiosiraceae unclassified*. Slično, korištenjem referentne baze Silva, sekvence *T. rotula* taksonomski su određene kao *Thalassiosira metagenome* i *Thalassiosira unclassified*. Za rodove *Nitzschia* i *Pseudo-nitzschia* taksonomska je anotacija bila moguća samo do razine roda za sve tri korištene referentne baze ([Tablica 3.2](#)), međutim, pomoću referentne baze CIMPhy18 ovi su rodovi za dio sekvenci uspješno

taksonomski određeni uz pomoć identičnih CIM referentnih sekvenci u slučaju *Nitzschia sp.* CIM976 i *Pseudo-nitzschia calliantha* CIM960.

Tablica 3.1 Popis vrsta Centra za istraživanje mora u kontrolnim (mock) uzorcima zajedno s oznakom kulture Centra za istraživanje mora i podacima o vremenu i mjestu uzorkovanja

Oznaka kulture	Mjesto uzorkovanja	Datum uzorkovanja	Vrsta
CIM861	SJ107	27.1.2017	<i>Thalassiosira rotula</i>
CIM931	RV001	26.11.2019	<i>Chaetoceros cf. curvictetus</i>
CIM935	LKR02	13.11.2018	<i>Chaetoceros costatus</i>
CIM941	RV001	15.7.2020	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>
CIM957	RV004	19.11.2020	<i>Chaetoceros curvisetus</i>
CIM960	RV004	19.11.2020	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>
CIM976	BORIK	24.3.2021	<i>Nitzschia sp.</i>
CIM982	BORIK	24.3.2021	<i>Nitzschia sp.</i>

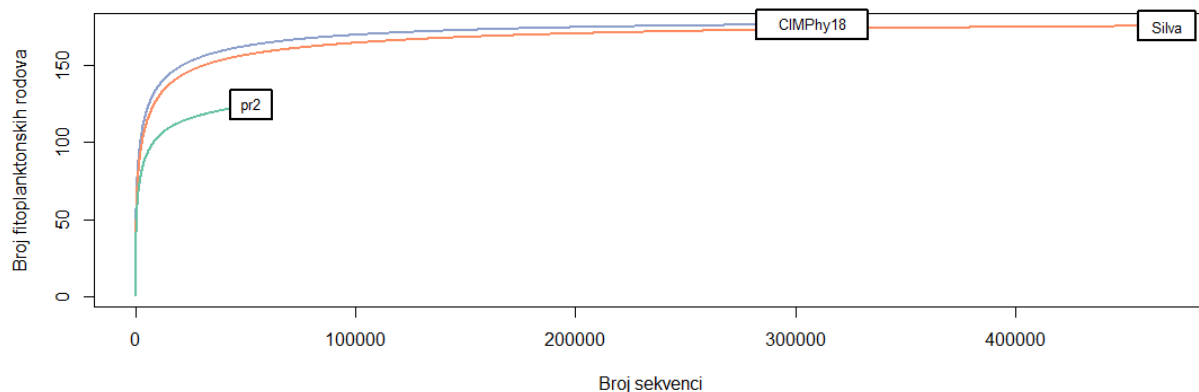
Tablica 3.2 Taksonomska anotacija 10 najučestalijih ASV-ova u kontrolnoj (mock) zajednici korištenjem Silva, PR2 i CIMPhy18 referentnih baza. Podebljano su označene vrste taksonomski određene na temelju identičnih referentnih sekvenci u bazama, narančasto su označene vrste za koje je nepouzdana klasifikacija na razini vrste, podcrtano su anotacije više od razine roda, plavo su anotacije na temelju referenci okolišnih uzoraka

Silva	PR2	CIMPhy18
<u>Bacillariophyceae unclassified</u>	<i>Chaetoceros costatus</i>	<i>Chaetoceros cf. curvisetus</i> CIM931
<i>Chaetoceros costatus</i>	<i>Chaetoceros curvisetus-1</i>	<i>Chaetoceros costatus</i>
<i>Chaetoceros invertebrate metagenome</i>	<i>Chaetoceros curvisetus-3</i>	<i>Chaetoceros costatus</i> CIM935
<i>Chaetoceros pseudo-curvisetus</i>	<i>Nitzschia unclassified</i>	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CIM957
<i>Chaetoceros unclassified</i>	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	<i>Chaetoceros unclassified</i>
<u>Mediophyceae unclassified</u>	<i>Pseudo-nitzschia unclassified</i>	<i>Nitzschia sp.</i> CIM976
<i>Nitzschia unclassified</i>	<i>Thalassiosira gravida</i>	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> CIM960
<i>Pseudo-nitzschia unclassified</i>	<i>Thalassiosira rotula</i>	<i>Pseudo-nitzschia unclassified</i>
<i>Thalassiosira metagenome</i>	<i>Thalassiosira unclassified</i>	<i>Thalassiosira unclassified</i>
<i>Thalassiosira unclassified</i>	<u>Thalassiosiraceae unclassified</u>	<i>Thalassiosira rotula</i>

Set od 24 evaluacijska okolišna uzorka ([Prilog 2](#)) sastojao se od ukupno 3 380 460 sirovih kontiga, odnosno 1 816 953 jedinstvenih sekvenci koje su bioinformatičkom obradom generirale ukupno 1 099 424 jedinstvenih ASV-ova. Uklanjanjem ASV-ova zastupljenih u niskoj brojnosti (<5), preostalo je ukupno 62 357 ASV-ova, od kojih je 36 773 klasificirano kao fitoplanktonski. Nakon

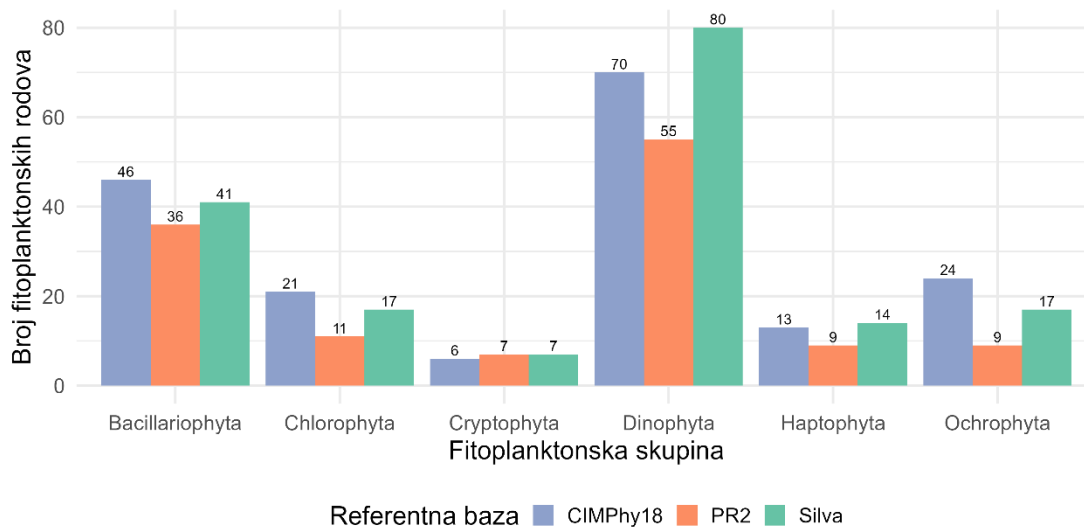
uklanjanja ASV-ova detektirani na razini višoj od roda ili vrste ([Prilog 5](#)), kombinacijom sve tri referentne baze taksonomski je određeno ukupno 26 617 fitoplanktonskih ASV-ova do razine roda ili vrste bar s jednom referentnom bazom, dok je 1 736 ASV-ova (6,52%) taksonomski određeno sa sve tri referentne baze. Na temelju referentne baze PR2 taksonomski je određeno 2 062 (7,75% ukupnih fitoplanktonskih) ASV-ova, 16 637 ASV-ova (62,50%) na temelju CIMPhy18 te 21 646 ASV-a (81,32%) na temelju referentne baze Silva. Usporedba broja klasificiranih fitoplanktonskih sekvenci, kao i broj klasificiranih fitoplanktonskih ASV-ova pokazala je značajne razlike u taksonomskoj razlučivosti između različitih referentnih baza. Referentnom bazom Silva ukupno je klasificirano je značajno više fitoplanktonskih sekvenci u odnosu na preostale dvije referentne baze, dok je na temelju PR2 klasificirano najmanji broj fitoplanktonskih sekvenci i ASV-ova, za sve fitoplanktonske skupine ([Prilog 6b](#)). Najveći udio sekvenci pripao je skupini dinoflagelata (57,26%) te dijatomeja (30,50%), dok su preostale skupine zastupljene u manjoj brojnosti (<5%) ([Prilog 6a](#)).

U setu evaluacijskih okolišnih uzoraka korištenih za provjeru CIMPhy18 ukupno je identificirano 228 fitoplanktonskih rodova na temelju sve tri korištene referentne baze, od kojih je 95 (41,67%) uspješno taksonomski određeno sa sve tri referentne baze. Pojedini rodovi taksonomski su određeni specifično samo sa jednom ili dvije referentne baze ([Prilog 7](#)). Ukupno, najveći broj rodova (180 rodova) taksonomski je određen koristeći referentnu bazu CIMPhy18. Na temelju referentne baze Silva taksonomski je određeno 176 rodova, dok je na temelju referentne baze PR2 127 fitoplanktonskih rodova, što je prikazano na [Slici 3.3](#): CIMPhy18 (zelena krivulja) prikazuje najveći broj detektiranih rodova, iako Silva (narančasta krivulja) pokazuje veći broj sekvenci taksonomski određenih do razine roda.



Slika 3.3 Usporedba taksonomske razlučivosti triju referentnih baza (CIMPhy18, PR2 i Silva) prema broju detektiranih fitoplanktonskih rodova

Ukupno, sa sve tri referentne baze, najveća raznolikost rodova u evaluacijskom okolišnom setu zabilježena je kod dinoflagelata (94 rodova) i dijatomeja (58 rodova), dok je kod ostalih skupina zabilježen manji broj rodova (ostali Ochrophyta - 26, Chlorophyta - 23, Haptophyta - 17 te Cryptophyta - 9 rodova). Usporedba broja detektiranih fitoplanktonskih rodova koji pripadaju pojedinoj skupini također je pokazala razlike u taksonomskoj razlučivosti između različitih referentnih baza. Referentne baze Silva i CIMPhy18 taksonomski su odredile veći broj rodova u odnosu na PR2 ([Slika 3.4](#)). Referentnom bazom CIMPhy18 taksonomski je određen veći broj rodova za fitoplanktonske skupine Bacillariophyta (46), Chlorophyta (21) i ostale Ochrophyta (24) u odnosu na druge referentne baze, dok je Silva pokazala veću detekciju rodova iz skupina Dinophyta (80) i Haptophyta (14). U slučaju Cryptophyta, referentne baze Silva i PR2 detektirale su jednak broj rodova (7), dok je pomoću CIMPhy18 zabilježen jedan rod manje (*Proteomonas*) (Prilog 7).



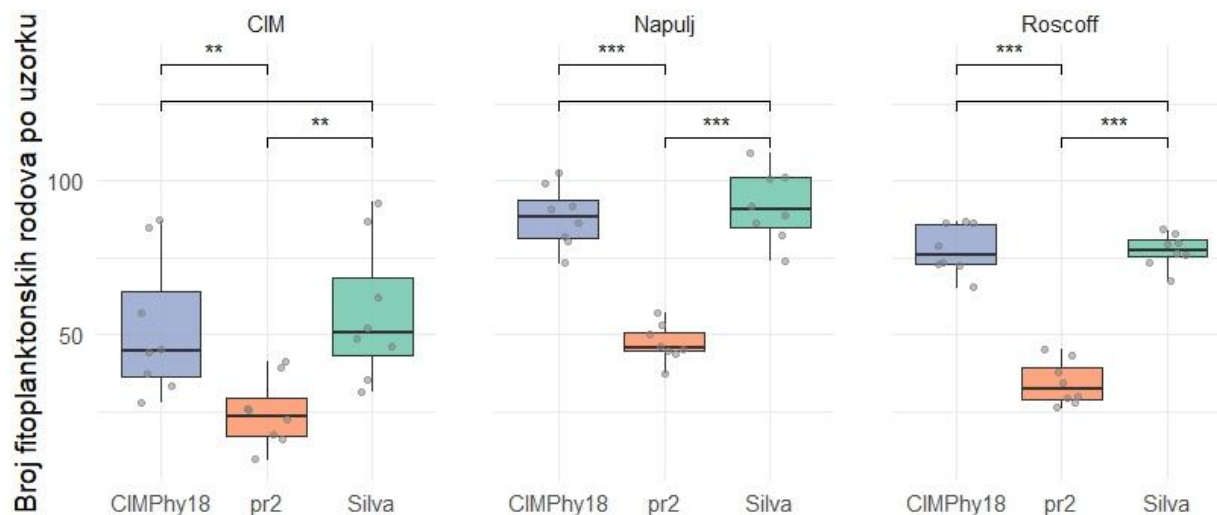
Slika 3.4 Prikaz brojnosti taksonomski određenih rodova šest glavnih fitoplanktonskih skupina korištenjem tri različite referentne baze: CIMPhy18, PR2, i Silva

Najviše rodova zajednički klasificiranih na temelju sve tri referentne baze pokazuju skupine Bacillariophyta (27, 46,55%) i Dinophyta (43, 45,75%), dok je najmanje zajedničkih rodova pripada skupini ostalih Ochrophyta (7, 25,93%). U slučaju skupine Dinophyta, na temelju CIMPhy18 nisu taksonomski klasificirana 24 roda: 2 detektirana pomoću Silva i PR2, 5 detektirana samo s PR2 i 17 detektiranih isključivo referentnom bazom Silva. U slučaju Bacillariophyta, 12 rodova nije taksonomski određeno na temelju CIMPhy18, 2 detektirana u preostale dvije referentne baze (*Papiliocellulus* i *Fragilariopsis*), 2 svojstvena samo za PR2 i 8 za Silva referentnu bazu. Ukupno dva roda koji pripadaju skupini Chlorophyta detektirani su isključivo referentnom bazom Silva, dok kod ostalih Ochrophyta dva roda su detektirana isključivo na temelju Silva i dva isključivo na temelju PR2. U slučaju Cryptophyta po jedan rod koji nije detektiran na temelju CIMPhy18 detektiran je isključivo na temelju Silva ili PR2 ili im je zajednički. Četiri roda iz skupine Haptophyta nisu detektirani na temelju CIMPhy18, jedan zajednički za preostale dvije referentne baze, jedan isključivo na temelju PR2 i dva isključivo na temelju Silva ([Prilog 7](#)).

Referentnom bazom PR2 taksonomski je određen najmanji broj rodova u analiziranim uzorcima iz svih izvora u odnosu na druge dvije referentne baze. Ukupan broj fitoplanktonskih rodova značajno se razlikovao među korištenim referentnim bazama na temelju Kruskal-Wallis testa ($\chi^2 = 40,39$, $df = 2$, $p < 0,001$). Analiza na temelju Dunn *post hoc* testa pokazala je da su razlike u broju

detektiranih rodova između baza CIMPhy18 i PR2, kao i između PR2 i Silva, bile statistički značajne ($p < 0,001$). Nasuprot tome, između baza CIMPhy18 i Silva nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Također, provedena je i analiza u broju detektiranih fitoplanktonskih rodova po uzorku među referentnim bazama unutar pojedinih fitoplanktonskih skupina. Rezultati su pokazali značajnu razliku u broju detektiranih rodova po uzorku s obzirom na referentnu bazu kod svih fitoplanktonskih skupina ($p < 0,001$), osim Cryptophyta gdje je utjecaj referentne baze za detekciju rodova manji ($p = 0,045$). Dunn *post hoc* test pokazao je da su razlike u broju detektiranih rodova po uzorku među referentnim bazama najčešće uključivale PR2 kao bazu koja se značajno razlikuje od CIMPhy18 i/ili Silva. Kod skupina Bacillariophyta, Chlorophyta, Dinophyta, Haptophyta i ostalih Ochrophyta zabilježene su značajne razlike u broju rodova između PR2 i CIMPhy18 ($p < 0,001$), kao i između PR2 i Silva ($p < 0,001$), dok razlike između CIMPhy18 i Silva u tim skupinama nisu bile statistički značajne ($p > 0,5$). Kod Cryptophyta, značajna razlika u broju rodova zabilježena je isključivo između PR2 i Silva ($p = 0,047$), dok razlike između CIMPhy18 i drugih baza nisu bile statistički značajne.

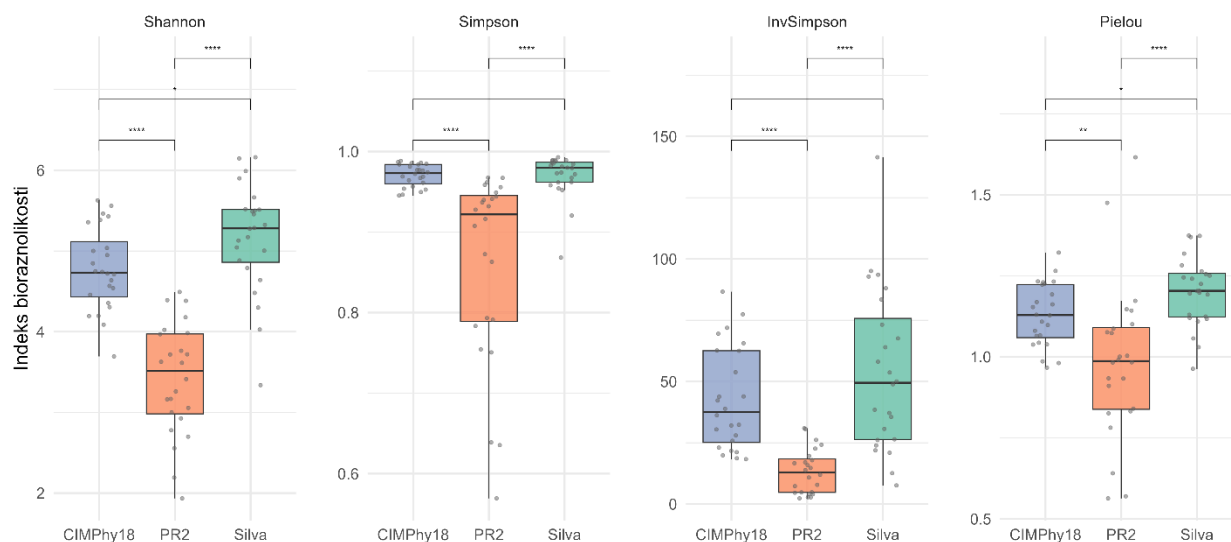
Također, rezultati Kruskal-Wallis testa ukazuju na značajne razlike u broju detektiranih fitoplanktonskih rodova na temelju korištenih referentnih baza unutar svih izvora uzoraka: CIM ($p = 0,0035$), Napulj ($p < 0,001$) i Roscoff ($p < 0,001$). Dunn *post hoc* test pokazao je da se rezultati dobiveni na temelju PR2 značajno razlikuju od CIMPhy18 i/ili Silva u uzorcima iz svih izvora, dok razlike između CIMPhy18 i Silva nisu bile značajne ($p > 0,05$) ([Slika 3.5](#)).



Slika 3.5 Usporedba broja detektiranih fitoplanktonskih rodova za tri skupine uzoraka (CIM, Napulj, Roscoff) koristeći tri referentne baze za anotaciju (CIMPhy18, pr2 i Silva). (bez zvjezdice – nije statistički značajno, ** - $p \leq 0,01$ - vrlo značajno, ***- $p \leq 0,001$, visoko statistički značajno)

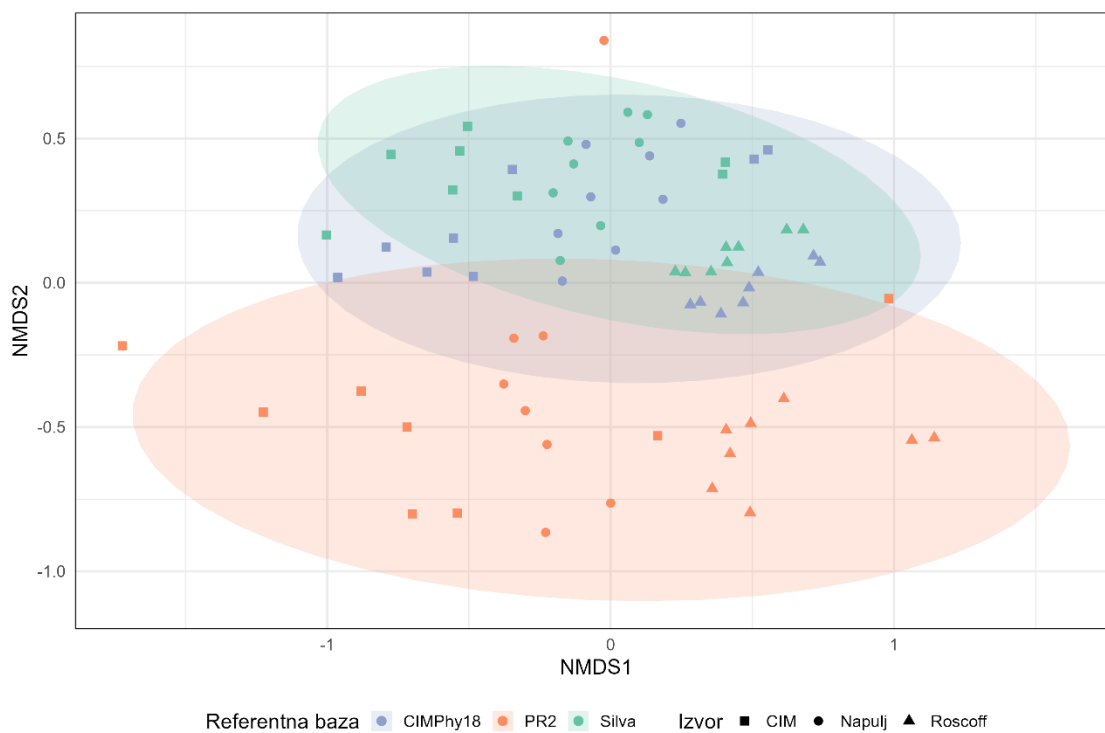
Analiza indeksa alfa raznolikosti također ukazuje na jasne razlike u opisu fitoplanktonske raznolikosti ovisno o korištenoj referentnoj bazi (Slika 3.6). Procijenjeni indeksi uključivali su Shannon, Simpson, inverzni Simpson i Pielou indeks. Referentna baza korištena za taksonomsku anotaciju imala je izražen utjecaj na vrijednosti svih promatranih indeksa alfa raznolikosti. Referentna baza PR2 sustavno je davala niže vrijednosti svih indeksa u odnosu na CIMPhy18 i Silva. Shannon indeks bio je najniži na temelju referentne baze PR2, posebice u uzorcima iz Roscoffa (npr. Shannon = 1,93), dok su uzorci analizirani sa Silva referentnom bazom u pravilu imali više vrijednosti Shannon indeksa (do 6,15). Sličan obrazac uočen je i za Simpson i inverzni Simpson indeks, gdje su uzorci iz PR2 baze imali niže vrijednosti. Pielou indeks ravnomjernosti također je bio viši u CIMPhy18 i Silva uzorcima, dok su PR2 uzorci imali niže vrijednosti (Slika 3.6). Referentna baza imala je statistički značajan utjecaj na sve analizirane indekse alfa raznolikosti. Kruskal-Wallis test potvrdio je značajne razlike u vrijednostima svih indeksa raznolikosti na temelju referentnih baza CIMPhy18, PR2 i Silva (Pielou, $p = 0,00003$, ostali $p < 0,0001$). Dunn *post hoc* test pokazao je najizraženije razlike između referentne baze PR2 i ostale dvije, dok između CIMPhy18 i Silva nije bilo značajnih razlika za nijedan od indeksa. Najniže vrijednosti indeksa dosljedno su pripadale PR2, značajno niže za Shannon, Simpson, inverzni Simpson ($p < 0,001$) u odnosu na preostale dvije referentne baze. Pielou indeks također je bio

značajno niži u PR2 nego u drugim bazama (CIMPhy18 - PR2: $p = 0,0206$, PR2 - Silva: $p = 0,000019$) ([Prilog 8a](#)).



Slika 3.6 Usporedba indeksa alfa raznolikosti (Shannon, Simpson, inverzni Simpson (InvSimpson) i Pielou) među evaluacijskim okolišnim uzorcima taksonomski određenih na temelju sastava fitoplanktonskih rodova dobivenih taksonomskom identifikacijom referentnim bazama CIMPhy18, PR2 i Silva. (bez zvjezdice – nije statistički značajno, ** - $p \leq 0,01$ - značajno, **** - $p \leq 0,001$, visoko statistički značajno)

Analiza nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja (engl. *Non-Metric Multidimensional Scaling* - *NMDS*) pokazala je razdvajanje fitoplanktonskih zajednica na temelju sastava i raznolikosti fitoplanktonskih rodova s obzirom na korištenu referentnu bazu (Silva, PR2, CIMPhy18), pri čemu su najizraženije razlike uočene kod PR2 ([Slika 3.7](#)). Analiza varijacija u strukturi zajednice (PERMANOVA, Bray-Curtis, 999 permutacija) pokazala je da izbor referentne baze ima statistički značajan utjecaj na sastav fitoplanktonske zajednice ($R^2 = 0,121$, $F = 4,75$, $p = 0,001$). *Post hoc* analiza (Tukey test) identificirala je značajnu razliku između Silva i PR2 baza ($p = 0,008$), dok su razlike između CIMPhy18 i drugih baza nisu bile statistički značajne ($p > 0,23$) ([Prilog 8b](#)). Međutim, test homogenosti multivarijatne disperzije (betadisper) također je pokazao značajne razlike u varijabilnosti unutar grupa ($F = 4,73$, $p = 0,017$). To sugerira da dio PERMANOVA signala može biti posljedica ne samo razlika u strukturi zajednica, već i razlika u raspršenosti unutar svake grupe. Stoga, iako PERMANOVA potvrđuje statistički značajne razlike među referentnim bazama, rezultati zahtijevaju interpretaciju s oprezom.



Slika 3.7 Prikaz razlika u strukturi fitoplanktonskih zajednica detektiranih na temelju sastava i raznolikosti fitoplanktonskih rodova s obzirom na korištenu referentnu bazu CIMPhy18, PR2 i Silva (Bray-Curtis udaljenosti). Svaka elipsa prikazuje sličnosti u strukturi fitoplanktonskih zajednica s obzirom na referentnu bazu na temelju uzoraka iz Centra za istraživanje mora Rovinj, Zoološke stanice Anton Dhorn Napulj i Biološke istraživačke stanice Roscoff

3.2 Osnovne karakteristike metabarkodiranog seta podataka fitoplanktona sjevernog Jadrana

Skup podataka metabarkodiranja sjevernog Jadrana ostvaren je kroz ukupno 53 terenska uzorkovanja, od čega se 35 uzorkovanja odnosi na mjesečna uzorkovanja (siječanj 2020. - prosinac 2022.) na postajama LTRV, 10 sezonskih uzorkovanja (ljetno 2020. - proljeće 2022.) na PO postajama te 8 višednevnih uzorkovanja na području Kvarnera i zapadne obale Istre ([Prilog 10](#)).

Od ukupno sakupljenih 312 uzoraka fitoplanktona sjevernog Jadrana, laboratorijska obrada te sekvenciranje markerom za V4 regiju 18S bilo je uspješno za ukupno 281 uzorak kroz tri godine. Od ukupnog broja uspješno sekvenciranih uzoraka, 123 uzorka prikupljena su fitoplanktonskom mrežom (43,77% svih uzoraka), dok je Niskinovim crpcem prikupljeno ukupno 158 uzoraka, odnosno 56,23% ([Tablica 3.3](#)). Od ukupnog broja sekvenciranih uzoraka prikupljenih crpcem, 78 se odnosi na uzorke prikupljene na dubini od 5 m, dok se 79 odnosi na uzorke prikupljene na dubini od 20 m. Skupu podataka je pridodano i 19 kontrolnih uzoraka (3 pozitivne i 16 negativnih kontrola).

Tablica 3.3 Ukupan broj uzoraka sakupljenih fitoplanktonskom mrežom i Niskinovim crpcem i uspješno sekvenciranih kroz tri godine po uzorkovanim postajama sjevernog Jadrana.

Naziv postaje	Naziv terena	Broj uzoraka mrežom	Broj uzoraka crpcem	Ukupno
RV001	LTRV	35	72	107
RV001	PO	4	0	4
RV004	LTRV	34	74	108
SJ107	PO	6	0	6
SJ101	PO	4	0	4
SJ108	PO	6	12	18
ZI012	RC	5	0	5
ZI052	RC	5	0	5
RI019	RC	8	0	8
JPA23	RC	5	0	5
FPA34	RC	6	0	6
CR001	RC	5	0	5
Ukupno		123	158	281

Najveći broj uzoraka, 215 (76,51%) prikupljen je na mjesečnim uzorkovanjima LTRV postaja RV001 (107 uzoraka) i RV004 (108 uzoraka) dok su na PO terenima prikupljena 32 uzorka, a na postajama Kvarnera i zapadne obale Istre 34 uzorka.

Također, uspješnost sekvenciranja s obzirom na terensko istraživanje ukazuje na višu stopu uspješnih sekvenciranih uzoraka prikupljenih na postajama LTRV (93,28% za RV001 te 99,08% za postaju RV004) u odnosu na postaje transekta prema rijeci Po te postajama Kvarnera i Zapadne Istre, kao i za uzorke prikupljene Niskinovim crpcima (98,75%) u odnosu na uzorke prikupljene fitoplanktonskom mrežom (76,87%).

3.2.1 Rezultati bioinformatičke analize

Ukupan set podataka sastojao se od 300 uzoraka od čega je 281 uzorak iz morskog okoliša te 19 kontrolnih uzoraka. U ukupnom setu od 300 sekvenciranih uzoraka generirano je ukupno 19 519 668 sirovih sekvenci. Nakon uklanjanja sirovih sekvenci niske kvalitete, 16 396 413 sekvenci spareno je u kontige (84,00%). U 281 uzorku morskog okoliša spareno je 16 146 217 sekvenci. Najveći broj sparenih sekvenci po uzorku bio je 183 804, dok je uzorak s najmanje imao 5 176 sparenih sekvenci (medijan = 56 781) ([Prilog 10](#), [Prilog 11](#)).

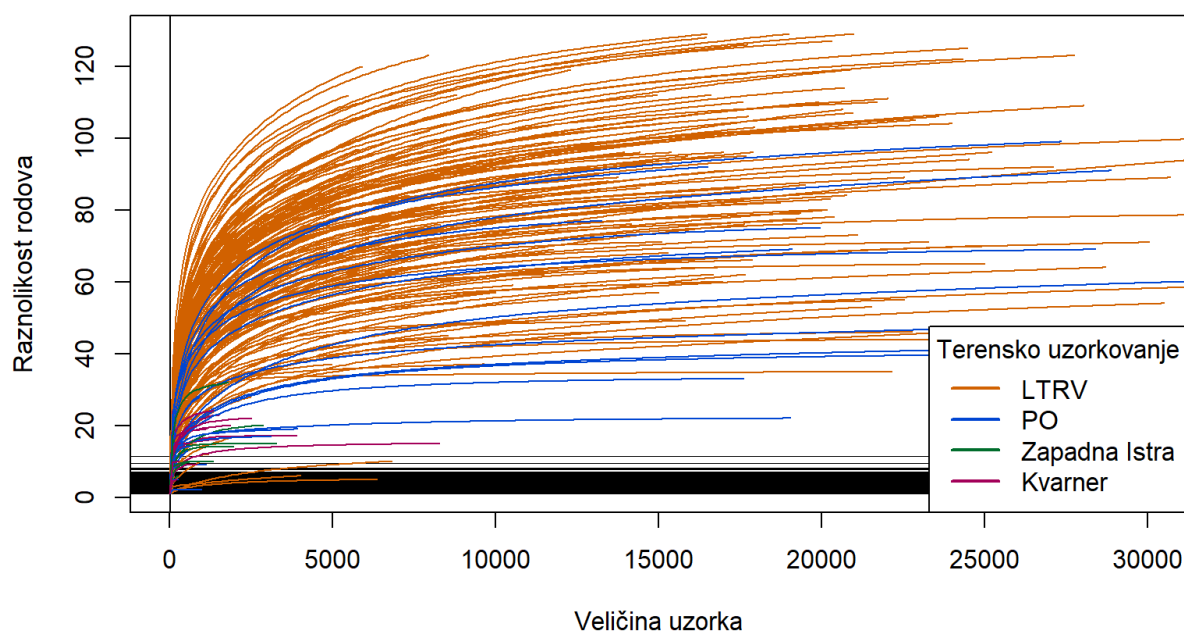
Uklanjanjem duplikata, preostalo je 4 220 850 jedinstvenih sekvenci. Uklonjeno je dodatnih 6 747 sekvencikraćih od 250 pb, dok je poravnanjem s referentnom bazom podataka zaostalo 4 005 724 jedinstvenih sekvenci. Nakon uklanjanja kimernih sekvenci, uklonjeno je dodatnih 455 583 sekvenci (11,37%). Ukupno je generirano 3 158 581 jedinstvenih ASV-ova s tolerancijom od jednog nukleotida razlike unutar svakog pojedinog ASV klastera.

Taksonomskom anotacijom, ukupno 601 339 ASV-a (19,06%) i pripadajućih 2 963 639 sekvenci pripalo je nekoj od fitoplanktonskih taksonomskih skupina, sa sigurnošću anotacije na razini vrste ili roda od 80%. Najveći zabilježeni broj klasificiranih fitoplanktonskih ASV-ova po uzorku bio je 16 733 (uzorak LTRV192, siječanj 2022. s postaje RV004, uzorkovano crpcem na dubinod 20 m), dok je uzorak LTRV121 (iz svibnja 2021. s postaje RV001, uzorkovano fitoplanktonskom mrežom) imao zabilježen najmanji broj ASV-ova klasificiranih kao fitoplanktonski (jedan). Ukupno 13 uzoraka iz seta podataka sjevernog Jadrana ([Prilog 12](#), [Prilog 13](#)) sadržavalo je vrlo niski broj fitoplanktonskih sekvenci (<20) te su oni uklonjeni iz daljnje obrade čime je u setu podataka

preostalo 268 uzoraka, s medijanom od 2 472 ASV-a te 7 744 pripadajućih fitoplanktonskih sekvenci ([Prilog 13](#)).

Najbrojniji ASV u setu podataka bio je zastupljen sa 22 687 sekvenci. U ukupnom setu podataka, 5% najbrojnijih ASV-ova činilo je značajan udio ukupnog broja sekvenci seta podataka ($> 75\%$) dok su preostali ASV-ovi bili zastupljeni s manjim brojem sekvenci (< 4 sekvence). Od ukupnog broja ASV-ova u setu podataka, 66 657 ASV-ova (11,08%) bilo je prisutno u više od jednog uzorka. Najveći broj uzoraka u kojem je zabilježen isti ASV je 88 (32,84%), dok je 445 740 ASV-ova zabilježeno kao sekvence koje se pojavljuju samo jednom u setu podataka (engl. *singleton*), ukupno 74,12%.

Krivulja rarefakcije (engl. *rarefaction curve*) pokazala je zadovoljavajuću dubinu sekvenciranja za većinu uzoraka koja je bila dovoljna za prikladan opis raznolikosti fitoplanktona za proučavano područje sjevernog Jadrana ([Slika 3.8](#)).



Slika 3.8 Krivulja rarefakcije na temelju broja zabilježenih rodova po uzorku. Različite boje krivulja upućuju na terensko uzorkovanje pripadajućeg uzorka

5.3 Taksonomski sastav fitoplanktona

Ukupni set podataka metabarkodiranja sjevernog Jadrana (268 uzoraka) taksonomski je klasificiran u 27 razreda, 84 reda, 156 porodica te 291 rod od ukupno 6 fitoplanktonskih skupina (nabroji ih ovdje). Najveći broj ASV-ova pripada skupini dinoflagelata (69,64%), dok su ostale skupine poput dijatomeja, zelenih algi, kriptofita, haptofita i ostalih predstavnika Ochrophyta koji nisu dijatomeje zastupljene u manjem udjelu ([Prilog 14](#)). Osim po broju taksonomski određenih ASV-ova, Dinophyta dominiraju i ukupnim brojem fitoplanktonskih sekvenci (75,18%) dok su ostale skupine zastupljene u manjem udjelu; Bacillariophyta (7,21%), Cryptophyta (4,72%), Haptophyta (3,46%) te ostali Ochrophyta (3,25%). Dominacija dinoflagelata uočena je tijekom cijelokupnog istraživanog razdoblja od tri godine. U skupini Dinophyta najučestaliji redovi su heterotrofni Gymnodinales, Syndinales te Peridinales, koji se pojavljuju u više od 90% od ukupnog broja uzoraka ([Prilog 16](#)). Najbrojniji rodovi Dinophyta su *Gyrodinium* i *Amoebophrya* s 25,07% i 15,59% taksonomski klasificiranih sekvenci Dinophyta, dok su u uzorcima najčešće zastupljeni rodovi *Karlodinium* (prisutan u 249 uzoraka ili 92,91%) i *Amoebophrya* (prisutan u 244 uzorka ili 91,05%) ([Prilog 15a](#)).

Bacillariophyta su druga najučestalija fitoplanktonska skupina s ukupno 7,21% klasificiranih ASV-ova i 8,84% taksonomski klasificiranih fitoplanktonskih sekvenci. Taksonomski su određeni u 27 redova i 43 porodice koje su predstavljene s ukupno 56 rodova. U skupini Bacillariophyta najučestaliji redovi su Chaetocerotales (33,75%), Thalassiosirales (25,06%) te Bacillariales (10,12%). Red Chaetocerotales pojavljuje se u najvećem broju uzoraka, 215 (80,22%) dok se redovi Bacillariales i Thalassiosirales pojavljuju u 186, odnosno 69,40% uzoraka. Najveći broj sekvenci iz skupine Bacillariophyta pripada rodovima *Chaetoceros* (31,04%), *Mediolabrus* (14,59%) te *Pseudo-nitzschia* (9,07%). Također, *Chaetoceros* (prisutan u 211 uzoraka, 78,73%) i *Pseudo-nitzschia* (prisutan u 180 uzoraka, 67,16%) prisutni su u najvećem broju uzoraka ([Prilog 15b](#)).

Ostale fitoplanktonske skupine zastupljene su s manjim udjelima sekvenci u odnosu na Dinophyta i Bacillariophyta. Chlorophyta s ukupinom udjelom od 6,18% fitoplanktonskih sekvenci, taksonomski su određeni u 9 razreda i 29 porodica koje predstavlja ukupno 50 rodova. U skupini Chlorophyta najučestaliji su Mamiellophyceae (79,77%) i Chlorodendrophyceae (12,17%), dok su najučestaliji rodovi *Micromonas* (38,48%), *Bathycoccus* (33,81%) i *Tetraselmis* (12,12%) ([Prilog](#)

[15c](#)). Skupina Cryptophyta zastupljena je sa dva reda, od kojih dominira Pyrenomonadales (97,55%). Od pet porodica kojima su Pyrenomonadales predstavljeni, Geminigeraceae je najučestalija porodica, a *Teleaulax* najučestaliji rod. Skupina Haptophyta zastupljena je sa 7 redova, 12 porodica i 19 rodova ([Prilog 15e](#)). Najbrojniji redovi skupine Haptophyta su Prymnesiales (70,81%) i Isochrysidales (14,45%). Od rodova, kod Haptophyta dominiraju *Chrysochromulina* (40,90%), *Prymnesium* (15,12%) i *Gephyrocapsa* (14,41%) ([Prilog 15d](#)).

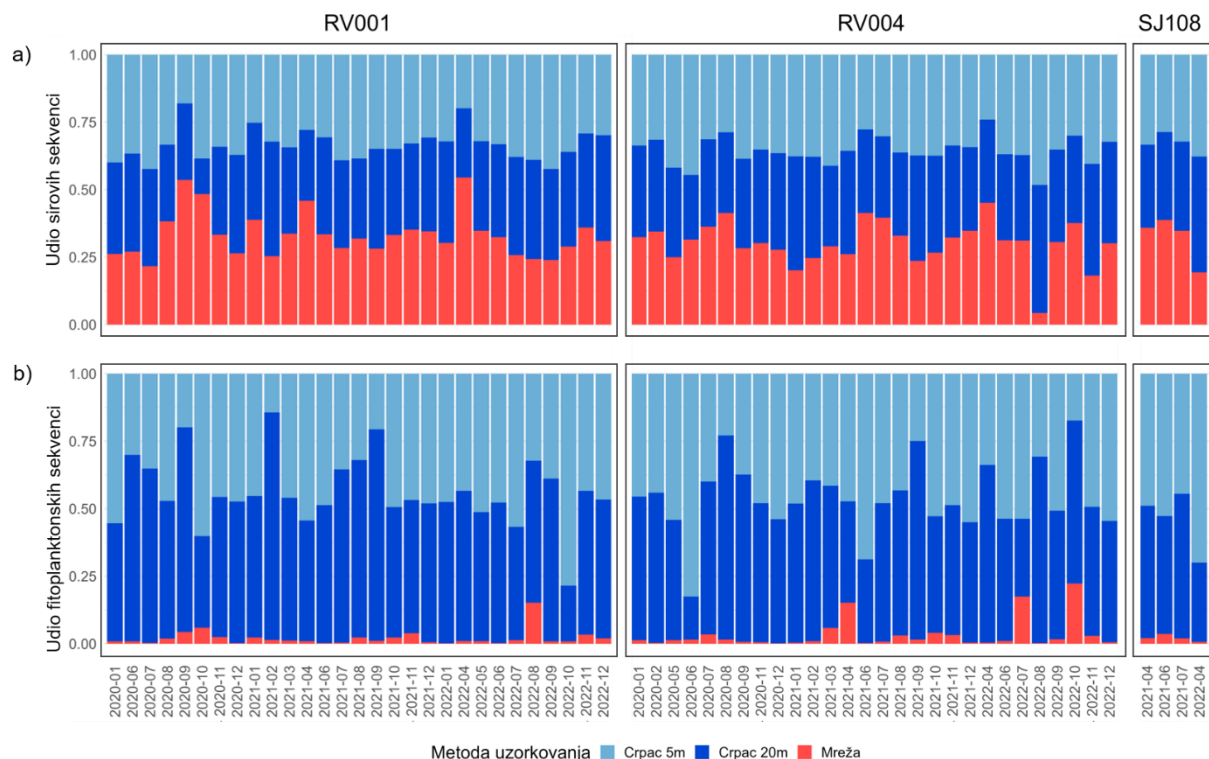
Ostali Ochrophyta zastupljeni su u setu podataka sjevernog Jadrana s ukupnim udjelom od 4,55% fitoplanktonski klasificiranih ASV-ova te 3,55% ukupnog broja fitoplanktonskih sekvenci. Najučestaliji razred unutar skupine ostalih Ochrophyta su Dictyochophyceae kojima je pripalo 45,56% ukupnog broja sekvenci ostalih Ochrophyta. Unutar skupine Dictyochophyceae, najučestaliji je red Dictyochaes (57,57%) s dva predstavnika na razini roda *Dictyocha* i *Vicicitus*. Razredu Pelagophyceae taksnomski je pridruženo 36,04% sekvenci ostalih Ochrophyta. Najučestaliji red unutar ovog razreda su Pelagomonadales (99,93%), s najučestalijim rodovima *Pelagomonas* (67,39%) i *Aureococcus* (32,57%). Razred Chrysophyceae zastupljen je s 13,68% ukupnih sekvenci ostalih Ochrophyta, dok su najučestaliji redovi unutar razreda Paraphysomonadales (55,66%) i Ochromonadales (43,26%) s rodovima *Paraphysomonas* i *Spumella*. Ostali razredi unutar skupine ostali Ochrophyta zastupljeni su s manjim udjelom sekvenci; Chrysomerophyceae (2,69%) s rodovima *Chrysowaernella*, Bolidophyceae (1,78%) s predstavnicima *Bolidomonas* i *Triparma* te Raphidophyceae (0,14%) s rodovima *Heterosigma*. te razred Eustigmatophyceae (0,001%) s rodovima *Nannochloropsis* ([Prilog 15f](#)).

3.4 Usporedba metoda uzorkovanja - fitoplanktonska mreža i Niskinov crpac

Set podataka za usporedbu dviju različitih metoda uzorkovanja fitoplanktona sjevernog Jadrana sastojao se od uzorkovanja s tri postaje (RV001, RV004 te SJ108) na kojima su za svako zadano uzorkovanje usporedno prikupljeni uzorci Niskinovim crpcem te mrežni uzorci. Na taj način, set podataka za usporedbu metoda sastojao se od ukupno 174 uzorka, od kojih je 162 pripadalo terenu LTRV (84 uzorka s postaje RV001 i 78 uzoraka s postaje RV004) te 12 uzoraka terenskom uzorkovanju PO (postaja SJ108). Set podataka sastojao se od 58 uzoraka prikupljenih fitoplanktonskom mrežom i 116 uzoraka iz Niskinovog crpca. Iz ukupnog seta podataka korištenih za usporedbu među metodama, na postajama terenskog uzorkovanja LTRV, 47,39% zabilježenih fitoplanktonskih sekvenci pridruženo je postaji RV001, 42,08% postaji RV004, dok se na postaju SJ108 terenskog uzorkovanja PO odnosi 10,53% zabilježenih fitoplanktonskih sekvenci.

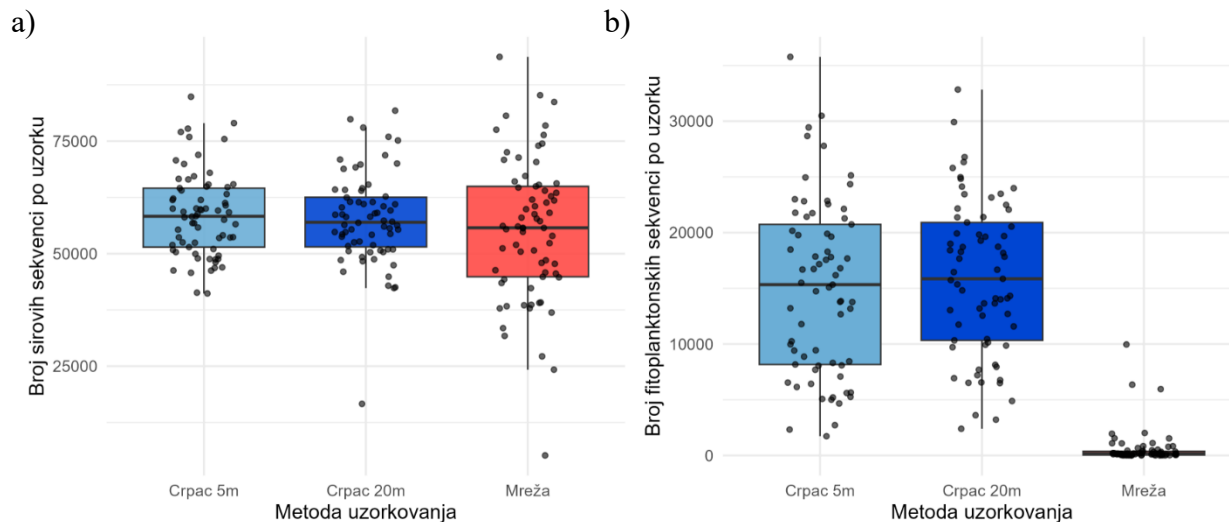
3.4.1 Usporedba fitoplanktonske brojnosti i raznolikosti dvjema metodama uzorkovanja

Rezultati statističke analize načina uzorkovanja Kruskal-Wallis, uz Dunnov post hoc test na temelju broja sirovih sekvenci pokazuju da nema značajne razlike između sekvenciranih uzoraka s obzirom na način uzorkovanja te su se srednje vrijednosti sirovih sekvenci kretale od 58 353 ($\pm 9\ 658$) za uzorke dobivene iz crpca s dubine od 5 m, 59 573 ($\pm 17\ 336$) za uzorke s 20 m te 54 930 ($\pm 15\ 019$) za uzorke dobivene fitoplanktonskom mrežom, $p = 0,387$ ([Prilog 17a](#)). Udio ukupnih sirovih sekvenci za sva tri načina uzorkovanja pokazao je ravnomjieran odnos učestalosti; 33,96% i 33,58% sirovih sekvenci dolazi iz uzoraka s 5 m i 20 m uzorkovanih Niskinovim crpcem te 32,45% sirovih sekvenci pripalo je uzorcima dobivenih fitoplanktonskom mrežom ([Slika 3.9a](#), [Slika 3.10a](#)).



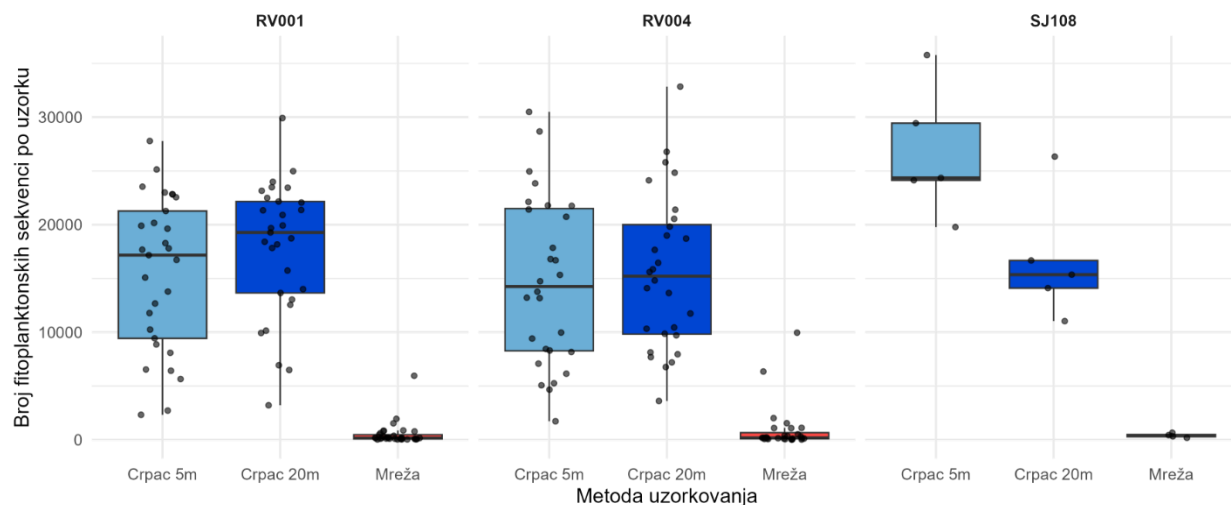
Slika 3.9 Raspodjela udjela sirovih sekvenci (a) i fitoplanktonskih sekvenci (b) u uzorcima seta podataka sjevernog Jadrana s obzirom na metodu uzorkovanja. Uzorci su organizirani u skupine prema postajama uzorkovanja (RV001 i RV004 koje pripadaju terenskom uzorkovanju LTRV te SJ108 terenskog uzorkovanja PO). Plavo su označeni udjeli dobiveni uzorkovanjem pomoću crpaca (svjetlo plavo – 5 m, tamno plavo – 20 m), crveno su označeni udjeli dobiveni uzorkovanjem pomoću fitoplanktonske mreže

Rezultati statističke analize načina uzorkovanja Kruskal-Wallis, uz Dunnov *post hoc* test na temelju broja generiranih fitoplanktonskih rodova pokazuju da nema značajne razlike u broju detektiranih fitoplanktonskih rodova u uzorcima iz crpaca za dubine od 5 m ($15\,598 \pm 7\,886$) i 20 m ($15\,889 \pm 6\,722$), $p = 0,72$, no zato postoji statistički značajna razlika uzmu li se u obzir uzorci dobiveni iz fitoplanktonske mreže ($1\,024 \pm 2\,088$), $p \ll 0,001$ ([Slika 3.9b](#), [Slika 3.10b](#), [Prilog 17b](#)).



Slika 3.10 Prikaz broja sirovih sekvenci (A) i fitoplanktonskih sekvenci (B). u uzorcima s obzirom na metodu uzorkovanja. 5 m (svjetlo plavo) i 20 m (tamno plavo) predstavljaju dubine uzorkovane Niskinovim crpcem, a vodeni stupac (crveno) predstavlja ukupni vodeni stupac uzorkovan fitoplanktonskom mrežom.

Ukupna raspodjela fitoplanktonskih sekvenci u skupu podataka s obzirom na promatrane načine uzorkovanja ukazuje na uočljivo veći udio fitoplanktonskih sekvenci u uzorcima koji su uzorkovani Niskinovim crpcem na 5 m (48,87%) i 20 m (49,00%) u odnosu na fitoplanktonsku mrežu (2,13%). Također, s obzirom na metodu uzorkovanja, na svim postajama zabilježen je značajno manji broj detektiranih fitoplanktonskih sekvenci po uzorku dobivenih fitoplanktonskom mrežom ([Slika 3.11](#), [Prilog 17c](#)). Postaja RV001 bilježi 1,72% sekvenci dobivnih uzorkovanjem fitoplanktonskom mrežom, postaja RV004 3,05% te s postaje SJ108 0,74% fitoplanktonskih sekvenci dolazi iz uzorkovanja fitoplanktonskom mrežom.



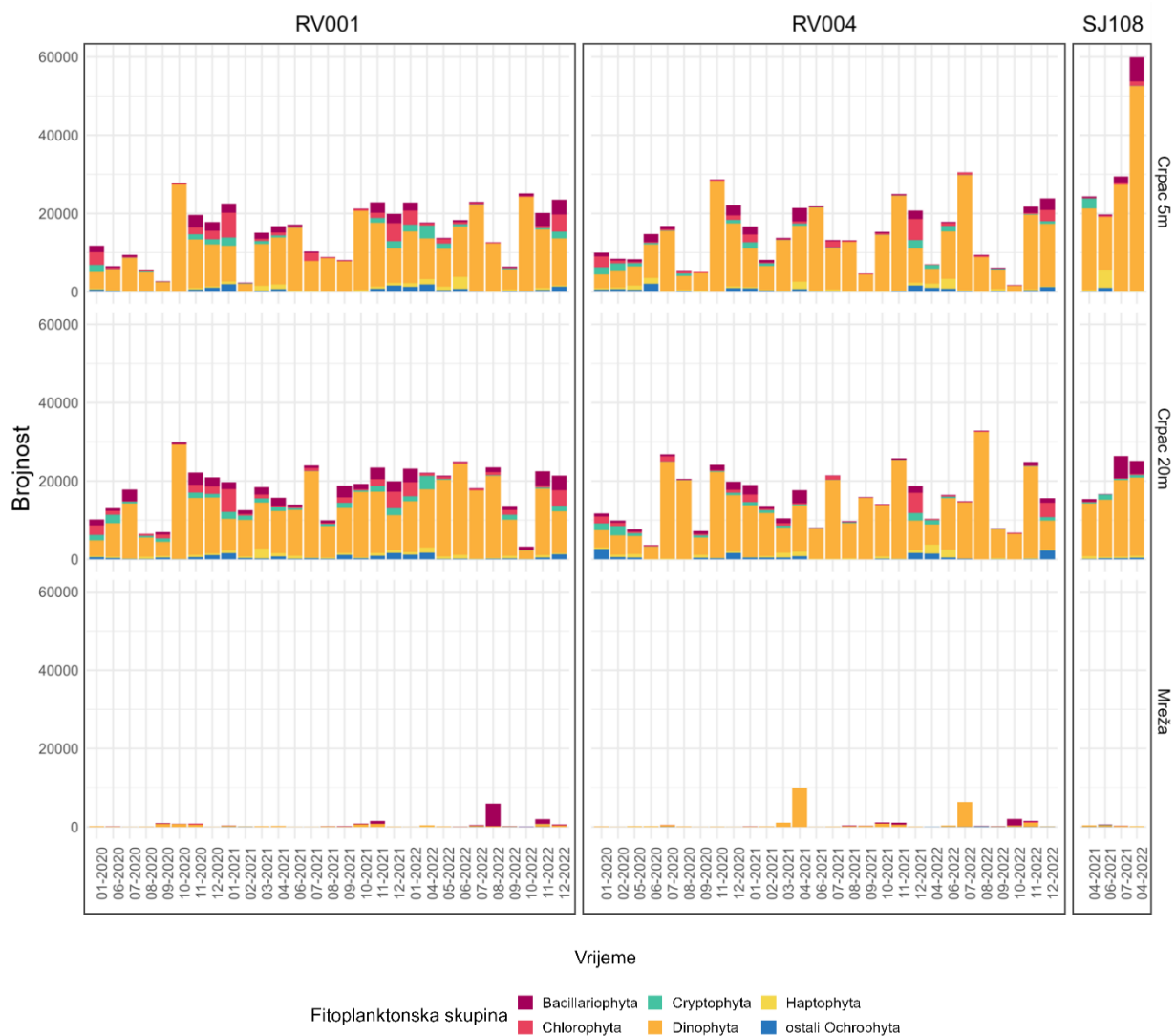
Slika 3.11 Broj fitoplanktonskih sekvenci za svaku postaju s obzirom na metodu uzorkovanja. 5 m (svjetlo plavo) i 20 m (tamno plavo) predstavljaju dubine uzorkovane Niskinovim crpcem, a vodeni stupac (crveno) predstavlja ukupni vodeni stupac uzorkovan fitoplanktonskom mrežom.

Za obje metode uzorkovanja najučestalija skupina bila je Dinophyta sa udjelima u fitoplanktonskoj zajednici uzoraka crpaca od 78,14% na 5 m te 77,46% na 20 m dok je te udio Dinophyta u mrežnim uzorcima bila nešto niža (68,32%). Suprotno tome, za skupinu Bacillariophyta uočena je viša učestalost u mrežnim uzorcima (28,62%) u odnosu na učestalost u uzorcima iz crpaca na 5 m (5,83%) i 20 m (6,53%). Manje skupine poput Chlorophyta, Cryptophyta i Haptophyta učestaliye su u uzorcima iz crpaca, dok su u njihovi mreži udjeli bili izrazito niski (Tablica 3.4).

Tablica 3.4 Relativna učestalost glavnih fitoplanktonskih skupina s obzirom na način uzorkovanja. 5 i 20 m predstavljaju dubine uzorkovane Niskinovim crpcem, dok je Mreža označava učestalost fitoplanktonskih skupina kroz cijeli vodeni stupac.

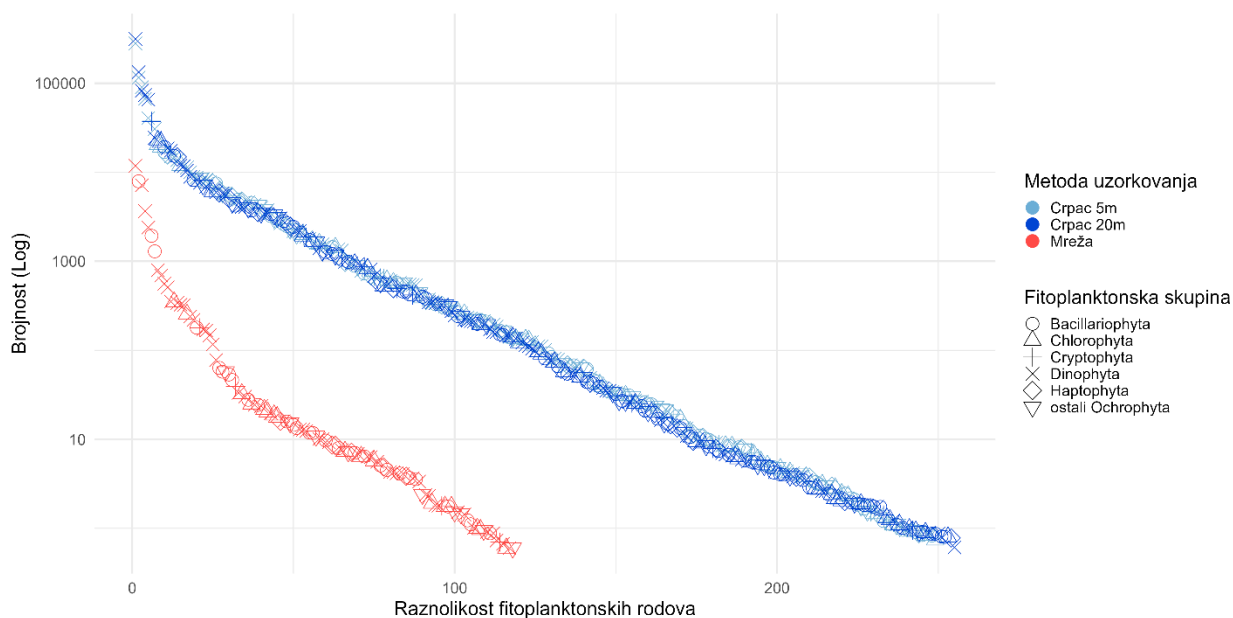
Skupina	Crpac 5m	Crpac 20m	Mreža	Ukupno po skupini
Bacillariophyta	5,83%	6,53%	28,62%	6,66%
Chlorophyta	7,31%	7,03%	1,97%	7,06%
Cryptophyta	4,14%	4,44%	0,74%	4,22%
Dinophyta	78,14%	77,46%	68,32%	77,59%
Haptophyta	2,23%	1,78%	0,13%	1,97%
ostali Ochrophyta	2,36%	2,76%	0,21%	2,51%
Ukupan set podataka	100%			

Značajno veći udio fitoplanktonskih sekvenci u uzorcima prikupljenim Niskinovim crpcem u odnosu na fitoplanktonsku mrežu karakterističan je za cijelo promatrano razdoblje. Također, ova razlika bila je izražena i na svim istraživanim postajama. U uzorcima prikupljenim Niskinovim crpacem brojnost i raznolikost svih fitoplanktonskih skupina stabilne su i očuvane na svim postajama tijekom čitavog istraživanog razdoblja dok su za uzorke iz fitoplanktonske mreže karakteristična viša odstupanja i specifična raznolikost i/ili učestalost fitoplanktonskih skupina ([Slika 3.12](#)).



Slika 3.12 Brojnost fitoplanktonskih skupina u istraživanom razdoblju i postajama s obzirom na metodu uzorkovanja fitoplanktonskih zajednica. 5m i 20m predstavljaju dubine uzorkovanja Niskinovim crpcem, dok Mreža predstavlja uzorkovanje cijelog vodenog stupca fitoplanktonskom mrežom.

Uočeno je da se niska brojnost detektiranih fitoplanktonskih sekvenci mrežnih uzoraka odražava i na ukupnu učestalost i taksonomsku raznolikost fitoplanktona u njima. Tako su distribucije učestalosti fitoplanktonskih vrsta po skupinama potvrdile da fitoplanktonske zajednice iz uzoraka crpaca od 5 i 20 m pokazuju vrlo sličan profil raspodjele brojnosti i raznolikosti, dok su mrežni uzorci pokazuju naglo smanjenje brojnosti većine rodova, kao i znatno manji njihov broj ([Slika 3.13](#)), na svim postajama i dubinama ([Prilog 20](#)). Uzorci dobiveni pomoću Niskinovog crpca na 5 m i 20 m pokazuju stalnu i ujednačeniju raspodjelu fitoplanktonskih skupina tijekom vremena, s izraženim i stabilnim udjelima više taksonomskih skupina unutar svakog pojedinačnog uzorka. Nasuprot tome, uzorkovanje fitoplanktonskom mrežom iz vodenog stupca rezultiralo je izraženijom dominacijom pojedinih skupina, posebice dinoflagelata i dijatomeja, u odnosu na ostale. Navedena raspodjela fitoplanktonskih skupina karakteristična je za sva uzorkovana vremenska razdoblja te sve uzorkovane postaje ([Prilog 18](#)).

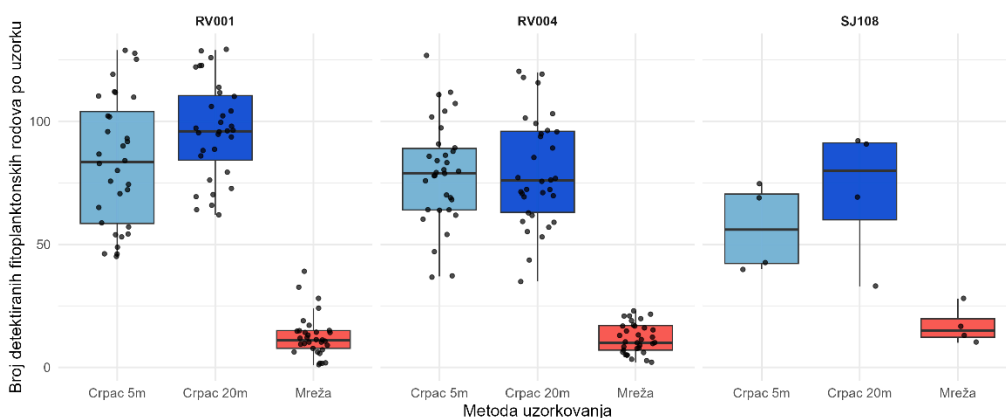


Slika 3.13 *Krivulja dominantnosti i raznolikosti (Whittaker plot) fitoplanktonskih skupina*. Vrlo jasna razlika u bogatstvu i učestalosti uočena je između uzoraka s 5 m i 20 m dubine u usporedbi s uzorcima iz vodenog stupca uzorkovanih fitoplanktonskom mrežom. Najveći broj taksona, kao i njihova ukupna brojnost, zabilježeni su na dubinama od 5 i 20 m, pri čemu se taksoni iz 20 m (tamno plava) ističu najvišom učestalošću pojedinačnih varijanti. Dinophyta i Bacillariophyta predstavljaju većinu visoko zastupljenih rodova, dok su Chlorophyta, Cryptophyta i ostale skupine uglavnom prisutne među rjeđim taksonima.

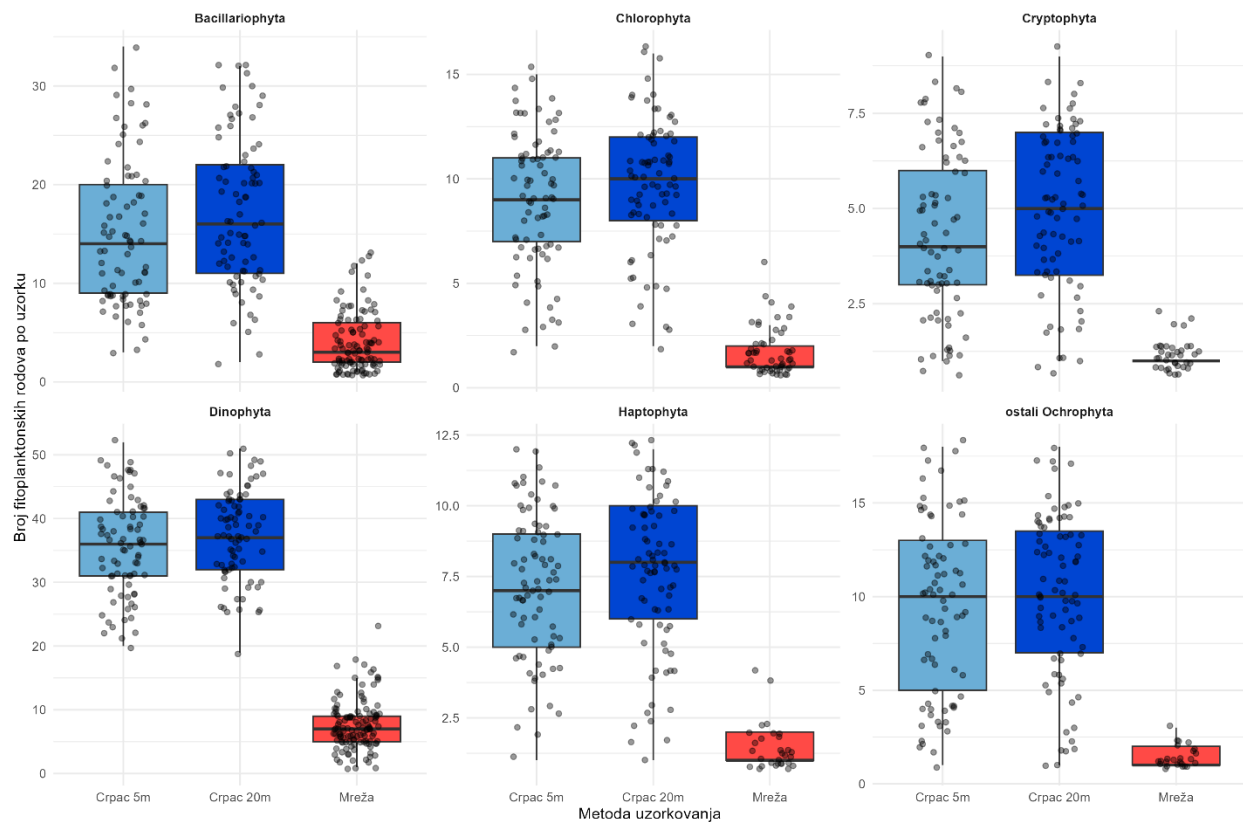
Usporedba broja detektiranih fitoplanktonskih rodova pokazala je jasne razlike između korištenih metoda uzorkovanja. Uzorci prikupljeni crpcima na dubinama od 5 i 20 metara pokazali su znatno

višu taksonomsku raznolikost u odnosu na uzorke fitoplanktonske mreže ([Slika 3.14](#)). Uzorci crpaca su kroz cijeli period uzorkovanja i za sve fitoplanktonske skupine imali znatno veći broj klasificiranih rodova, nego uzorci mreža ([Prilog 19](#)). Broj detektiranih rodova prilikom uzorkovanja crpcima bio je $79,89 \pm 22,18$ (za dubinu 5 m) te $87,13 \pm 23,65$ (za dubinu 20 m), dok je broj detektiranih rodova u uzorcima fitoplanktonske mreže bio $13,87 \pm 6,62$ ([Slika 3.14](#)).

Na temelju neparametarskog Kruskal-Wallis testa praćenog Dunn *post hoc* usporedbama za različite skupine fitoplanktona pokazano je da za sve skupine postoje statistički značajne razlike u broju rodova između uzorkovanja fitoplanktonskom mrežom i crpcem ($p \ll 0,01$), na objema dubinama ([Slika 3.15](#)). Nasuprot tome, nisu otkrivene značajne razlike između uzoraka prikupljenih crpcima s 5 m i 20 m kod nijedne skupine ($p > 0,05$), iako skupina Cryptophyta pokazuje trendove prema divergenciji ($p \approx 0,07$).



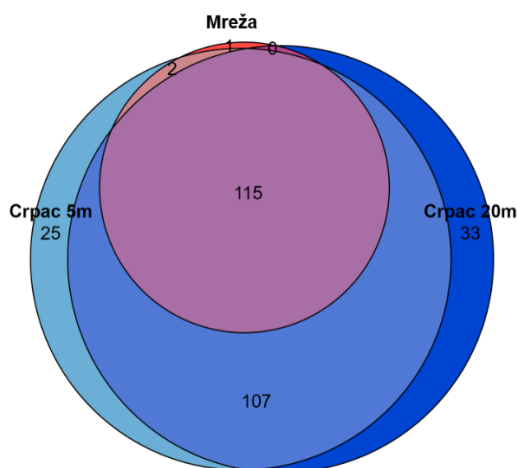
Slika 3.14 Broj rodova po postajama s obzirom na metodu uzorkovanja. 5 m i 20 m predstavljaju dubine uzorkovane Niskinovim crpcem, a vodeni stupac predstavlja ukupni vodeni stupac uzorkovan fitoplanktonskom mrežom.



Slika 3.15 Prikaz broja rodova po skupinama s obzirom na metodu uzorkovanja. 5 m i 20 m predstavljaju dubine uzorkovane Niskinovim crpcem, a vodeni stupac predstavlja ukupni vodeni stupac uzorkovan fitoplanktonskom mrežom

U korištenom setu podataka za usporedbu metoda uzorkovanja pomoću crpca i fitoplanktonske mreže detektirano je ukupno 279 fitoplanktonskih rodova. Uzorkovanjem fitoplanktonskom mrežom uspješno je detektirano 119 fitoplanktonskih rodova, 42,65%. Uzorkovanjem crpcima na obje dubine zabilježeno je ukupno 278 fitoplanktonskih rodova, 99,64%. Crpcima je na dubini od 5 m zabilježeno ukupno 249 fitoplanktonskih rodova (89,25%), dok je na dubini od 20 m zabilježeno 255 fitoplanktonskih rodova (91,40%). Ukupan broj fitoplanktonskih rodova koji su zajednički za sva tri načina uzorkovanja je 116 (41,58%) (Slika 3.16). Uzorci fitoplanktonske mreže i uzorci iz crpca detektirali su ukupno 118 zajedničkih fitoplanktonskih rodova uzorkovanjem na 5 m i 116 zajedničkih rodova uzorkovanjem na 20 m. U uzorcima iz crpaca na 5 m i 20 m detektirano je 226 zajedničkih fitoplanktonskih rodova (81,00%). Uzorkovanje crpcem na 5 m identificiranje 21 fitoplanktonski rod koji nije detektiran fitoplanktonskom mrežom i crpcem na 20 m te 29 fitoplanktonskih rodova koji su detektirani crpcem na 20 m, ali nisu zabilježeni drugim uzorkovanjima. 110 fitoplanktonskih rodova zajedničkih uzorcima iz crpaca

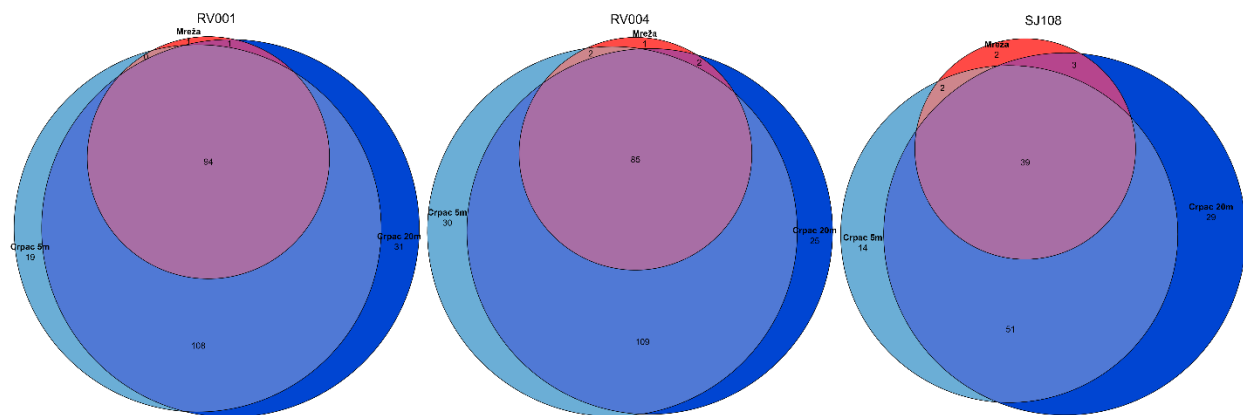
nije detektirano u fitoplanktonskoj mreži. U mrežnim uzorcima i uzorcima iz crpaca s 5 m zabilježena su dva roda koja nisu prisutna u uzorcima iz crpaca na 20 m.



Slika 3.16 Prikaz broja detektiranih zajedničkih fitoplanktonskih rodova s obzirom na metodu uzorkovanja. Plavo je prikazan broj rodova detektiran crpcima (svjetlo plavo – na dubini od 5 m te tamno plavo – na dubini od 20 m) te fitoplanktonskom mrežom (crveno)

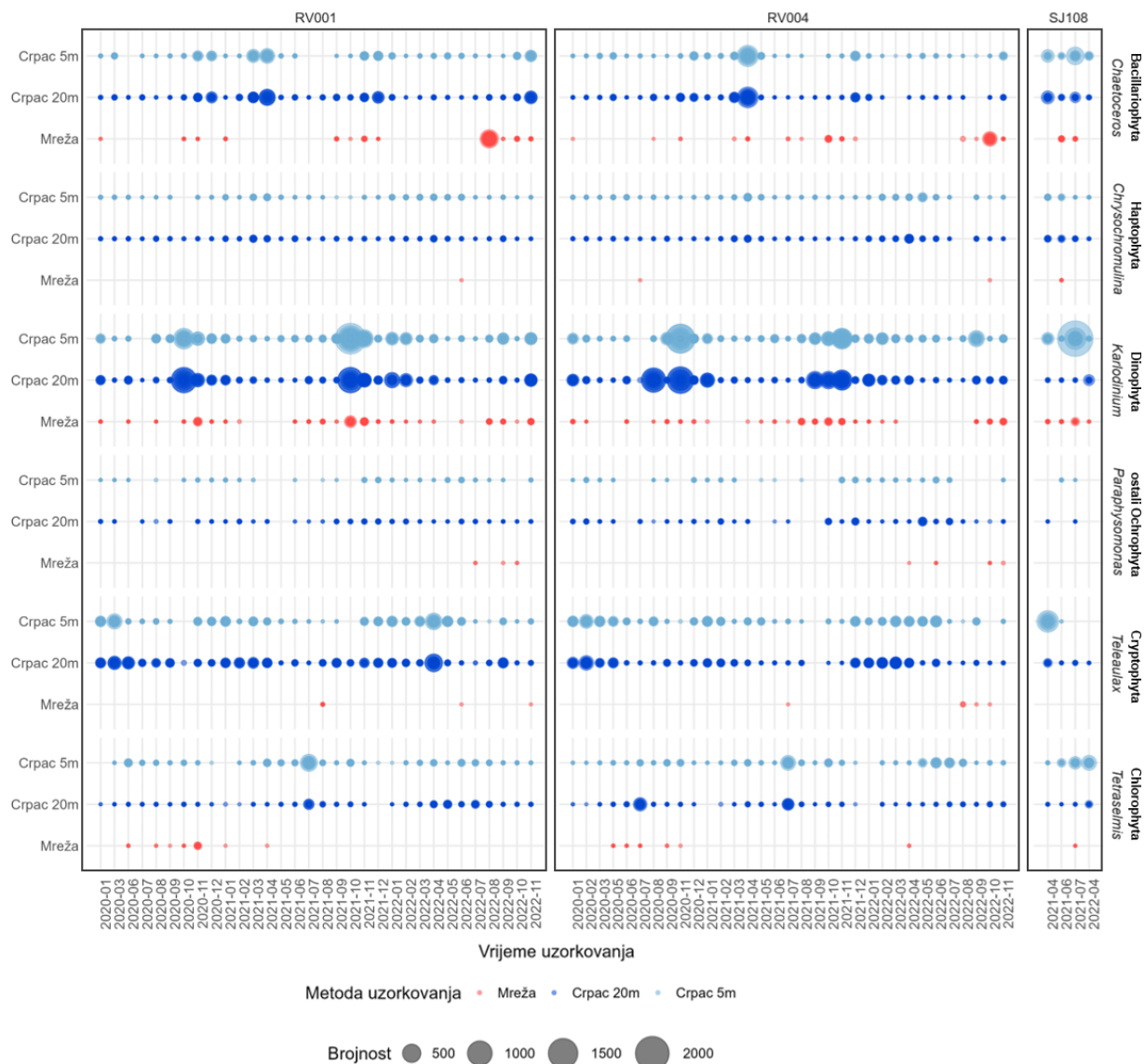
Na svakoj postaji pojedinačno zabilježen je sličan obrazac omjera fitoplanktonskih rodova jedinstvenih i zajedničkih metodama uzorkovanja kao i kod obrazaca ukupnog seta podataka. Na postaji RV001 detektirano je 253, na RV004 ukupno 251, dok je na postaji SJ108 detektirano 147 fitoplanktonskih rodova. 37,55% (95 rodova) fitoplanktonskih rodova na postaji RV001 zajedničko je svim metodama uzorkovanja, na postaji RV004 ukupno 35,06% (88 rodova), a na postaji SJ108 ukupno 27,21% (40 rodova) je zajedničko ([Slika 3.17](#)).

Od ukupno 279 detektiranih fitoplanktonskih rodova, 98 pripada skupini Dinophyta, 75 pripada skupini Bacillariophyta, 45 Chlorophyta, 19 čine Haptophyta, 12 Cryptophyta, dok su ostali Ochrophyta zastupljeni s 30 rodova. Samo je rod *Mychonastes* iz skupine Chlorophyta detektiran isključivo u fitoplanktonskoj mreži, dok *Elliptochloris* i *Nannochloris* nisu zabilježeni u uzorcima iz crpaca s 20 m. Kod svih ostalih skupina svi rodovi detektirani u fitoplanktonskoj mreži, detektirani su i na obje dubine uzorkovanja crpcem. Tako je udio rodova Dinophyta detektiranih za sva uzorkovanja 57,14%, Bacillariophyta 37,33%, Chlorophyta 31,11%, ostali Ochrophyta 30,00%, Haptophyta 26,32%. Najmanji udio detekcije fitoplanktonskom mrežom te ujedno i najmanji udio zajedničkih rodova za sva uzorkovanja ima skupina Cryptophyta (25,00%) s tri detektirana roda ([Prilog 19](#)).



Slika 3.17 Prikaz broja detektiranih zajedničkih fitoplanktonskih rodova po postaji s obzirom na metodu uzorkovanja. 5 m, svjetlo plavo i 20 m, tamno plavo predstavljaju dubine uzorkovane Niskinovim crpcem, dok crveno predstavlja uzorkovanje fitoplanktonskom mrežom

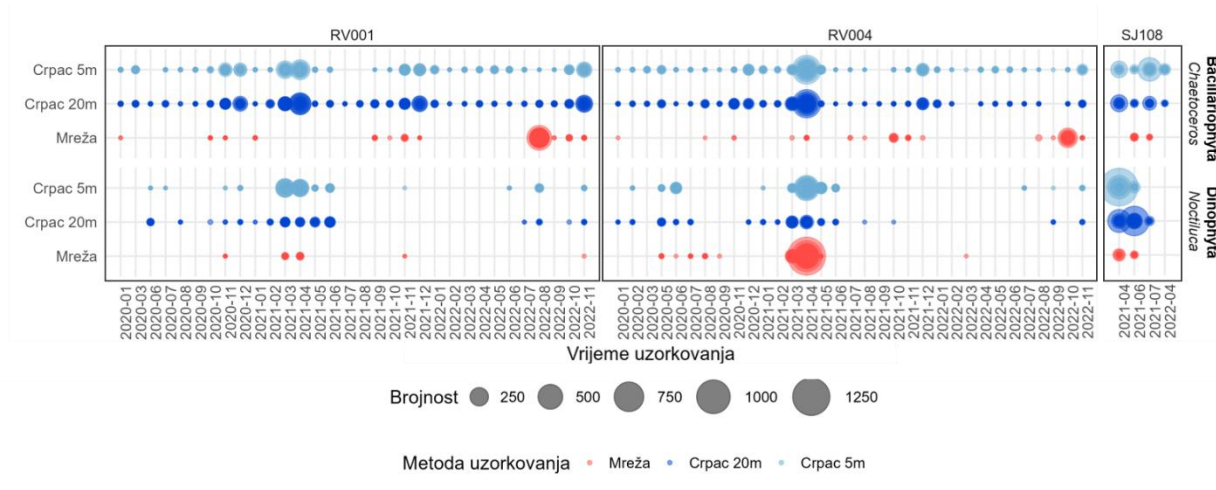
Vremenske i prostorne distribucije pojedinih fitoplanktonskih rodova potvrdile su razlike u raznolikosti i brojnosti korištenjem različitih metoda uzorkovanja. Na svim istraživanim postajama, uzorkovanja crpcima na 5 m i 20 m pokazuju slične obrasce prisutnosti dominantnih rodova. Prisutnost tih rodova u uzorcima iz crpaca relativno je stalna te prati vremensku dinamiku, odnosno relativnu učestalost pojedinog fitoplanktonskog roda kroz vrijeme. Nasuprot tome, uzorci prikupljeni fitoplanktonskom mrežom, a predstavljaju zajednicu cijelog vodenog stupca, u većini slučajeva pokazali su znatno niže relativne udjele dominantnih rodova. Detekcija vremenske dinamike većine fitoplanktonskih rodova bila je ograničena, sa značajno manjim brojem generiranih fitoplanktonskih sekvenci po uzorku, a u nekim slučajevima detekcija pojedinih rodova iz uzoraka fitoplanktonske mreže je i u potpunosti izostala ([Slika 3.18](#)).



Slika 3.18 Prostorna i vremenska brojnost ukupnog broja sekvenci najučestalijeg roda pojedine fitoplanktonske skupine u uzorcima s obzirom na metodu uzorkovanja. Oznake 5 m (svjetlo plavo) i 20 m (tamno plavo) predstavljaju dubine uzorkovane Niskinovim crpcem, a vodeni stupac (crveno) predstavlja ukupni vodeni stupac uzorkovan fitoplanktonskom mrežom.

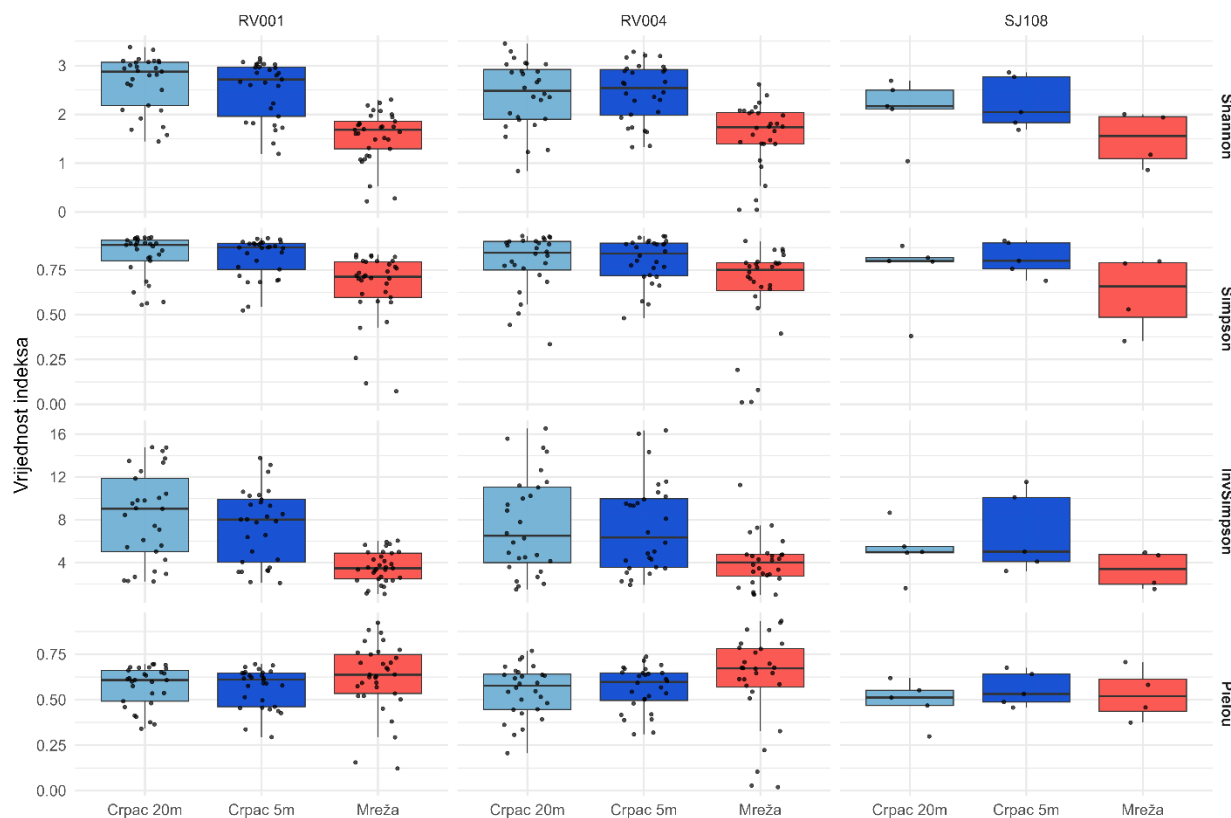
Rod je iz skupine dinoflagelata, *Noctiluca*, imao je najveću ukupnu brojnost od svih rodova u mrežnim uzorcima. U većim brojnostima zabilježen je i dijatomejski rod *Chaetoceros*, dok su ostali rodovi u uzorcima fitoplanktonske mreže bili zastupljeni u manjoj brojnosti ili za pojedina uzorkovanja nisu uopće detektirani. Iako najčešće zastupljeni u fitoplanktonskoj mreži, brojnost sekvenci rodova *Chaetoceros* i *Noctiluca*, kroz vrijeme također ukazuju na različit raspored detekcije, s obzirom na to da njihova detekcija povremeno izostaje. Za pojedina uzorkovanja na

postajama RV001 (kolovoz 2022.) i RV004 (listopad 2022.) brojnost sekvenci roda *Chaetoceros* te roda *Noctiluca* (RV004, travanj 2021.) pokazala se viša u uzorcima fitoplanktonske mreže ([Slika 3.19](#)).



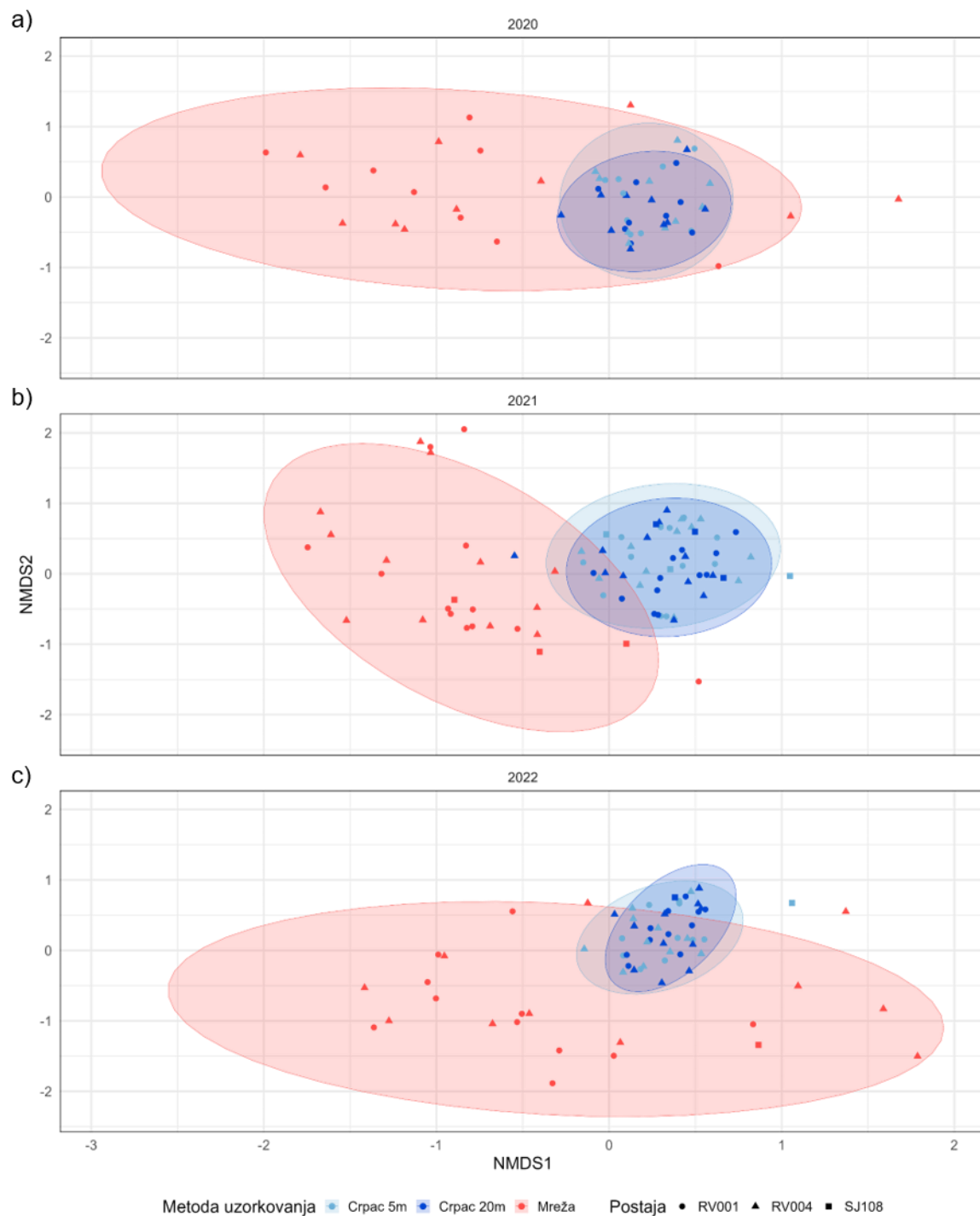
Slika 3.19 Brojnost sekvenci rodova *Chaetoceros* i *Noctiluca* kao najučestalijih rodova iz uzoraka fitoplanktonske mreže na tri postaje kroz vrijeme s obzirom na metodu uzorkovanja. Uzorkovanja (5 m (svjetlo plavo) i 20 m (tamno plavo) predstavljaju dubine uzorkovane Niskinovim crpcem, crveno predstavlja uzorkovanje fitoplanktonskom mrežom).

Analiza indeksa alfa raznolikosti također ukazuje na jasne razlike u opisu fitoplanktonske raznolikosti ovisno o korištenoj metodi uzorkovanja ([Slika 3.20](#)). Srednje vrijednosti Shannon indeksa, koji uzima u obzir brojnost i ravnomjernost rodova uzorkovanja crpcem na 5 m ($2,46 \pm 0,58$) i 20 m ($2,49 \pm 0,64$) više su u odnosu na uzorkovanje fitoplanktonskom mrežom ($1,55 \pm 0,59$). Slične razlike pokazane su za Simpson indeks koji je također viši za uzorke crpaca na 5 i 20 m (srednja vrijednost $0,80 \pm 0,15$ i $0,81 \pm 0,12$) u odnosu na mrežni uzorak ($0,65 \pm 0,22$) Pielou indeks s druge strane, niži je za uzorke iz crpaca na 5 i 20 m ($0,56 \pm 0,13$ i $0,56 \pm 0,11$) u odnosu na uzorke iz mreže ($0,61 \pm 0,22$). Kruskal-Wallis test ukazuje statistički značajne razlike za sve analizirane indekse: Shannon indeks, razlikovao se među metodama uzorkovanja s vrlo visokom statističkom značajnošću ($\chi^2 = 63,24$, $df = 2$, $p < 0,001$), kao i Simpson indeks ($\chi^2 = 37,70$, $df = 2$, $p < 0,001$) te Pielou indeks ($\chi^2 = 9,92$, $df = 2$, $p = 0,007$).



Slika 3.20 Usporedba indeksa α raznolikosti (Shannon, Simpson, Inverse Simpson i Pielou) po postajama RV001, RV004 i SJ108 s obzirom na način uzorkovanja. Uzorkovanja (5 m (svjetlo plavo) i 20 m (tamno plavo) predstavljaju dubine uzorkovane Niskinovim crpcem, a vodeni stupac (crveno) predstavlja ukupni vodeni stupac uzorkovan fitoplanktonskom mrežom).

Jasne razlike u strukturi fitoplanktonskih zajednica s obzirom na metodu uzorkovanja vidljive su i na temelju NMDS analize što ukazuje na dosljedno različit sastav zajednica između ovih dviju metoda tijekom sve tri godine ([Slika 3.21](#)). Suprotno tome, uzorci iz crpca s 5 m i 20 m kroz sve tri godine pokazuju znatno veći stupanj konzistentnosti, s grupiranjem koje odražava stabilniju i predvidljiviju fitoplanktonsku zajednicu. Statistička analiza permutacijske analize varijance (PERMANOVA) provedena funkcijom `adonis()` pokazala je značajne razlike u sastavu fitoplanktonskih zajednica između metoda uzorkovanja ($F = 25,06$, $R^2 = 0,254$, $p = 0,001$, permutacije = 999). Uzorci su se razlikovali i u unutargrupnoj varijabilnosti, što je potvrđeno testom homogenosti multivarijatnih disperzija (`betadisper`). Utvrđena je značajno veća disperzija unutar mrežnih uzoraka u odnosu na uzorke prikupljene crpcima, što je u NMDS prostoru vizualizirano širim elipsama za mrežne uzorke i užim elipsama za uzorke sakupljene Niskinovim crpcem u sve tri godine uzorkovanja ([Prilog 21](#)).



Slika 3.21 Prikazi varijacija sastava i relativne učestalosti fitoplanktonskih zajednica na postajama RV001 i RV004, terenskog uzorkovanja LTRV kroz mjesečna uzorkovanja u periodu od tri istraživane godine te na postaji SJ108 terenskog uzorkovanja PO s obzirom na metodu uzorkovanja na temelju Bray-Curtis udaljenosti. Svaka elipsa prikazuje sličnosti u strukturi zajednice za pojedini način uzorkovanja: plavo – uzorkovanje crpcem (svjetlo plavo - 5 m, tamno plavo – 20 m) i crveno – uzorkovanje fitoplanktonskom mrežom

3.4 Vremenski i prostorni obrasci fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana

Za analizu vremenske i prostorne strukture fitoplanktonskih zajednica, korišten je skup podataka iz 261 uzorka. Najveći ukupni broj klasificiranih fitoplanktonskih sekvenci imao je uzorak PO171 (35 770 fitoplanktonskih sekvenci) prikupljenom krajem travnja, 2022. Niskinovim crpcem na dubini od 5 m, na postaji SJ108 na terenskom uzorkovanju PO te uzorku LTRV248 (32 840) iz kolovoza, 2022. na dubini od 20 m uzorkovano crpcem na postaji RV004 terenskog uzorkovanja LTRV.

Kada se govori o skupini Dinophyta, najučestaliji brojnošću sekvenci uzorci su PO171 (34 359 sekvenci dinoflagelata ili 96,06%) prikupljeni krajem travnja, 2022., crpcem na dubini od 5 m, na postaji SJ108 na terenskom uzorkovanju PO, uzorak LTRV248 (32 454 ili 98,83% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci uzorka) iz kolovoza, 2022. na dubini od 20 m uzorkovan crpcem na postaji RV004 terenskog uzorkovanja LTRV te PO125 na postaji RI019 fitoplanktonskom mrežom u rujnu 2021. (10 104 sekvence ili 91,64%). Dinoflagelati nisu zabilježeni samo u jednom uzorku, prikupljenom fitoplanktonskom mrežom s postaje SJ108, iz srpnja, 2020. (PO7), dok su u četiri mrežna uzorka zabilježeni isključivo dinoflagelati (LTRV105, PO143, PO153, PO155).

Uzorak s najvećom brojnosti sekvenci određenih kao Bacillariophyta je PO161 (ukupno 5 863 sekvence, 24,29%), prikupljen crpcem na terenskom uzorkovanju PO početkom travnja 2022. na postaji SJ108 na 5 m dubine, dok je najveća brojnost na terenu LTRV s 5 752 sekvenci Bacillariophyta bila u uzorku fitoplanktonske mreže na postaji RV001, u kolovozu 2022. (uzorak LTRV241). Na terenskim uzorkovanjima Kvarner i Zapadna Istra, najučestaliji je mrežni uzorak iz listopada, 2022 na postaji ZI012 (PO195 s 2 291 sekvenci). U mrežnom uzorku PO7 iz srpnja 2020 s postaje SJ108 zabilježene su isključivo sekvence skupine Bacillariophyta, a nisu zabilježene u ukupno osam uzoraka, svi uzorkovani fitoplanktonskom mrežom.

Kod ostalih skupina, Chlorophyta su se pokazali najučestaliji u dva uzorka crpaca iz siječnja 2021. na postaji RV001 (uzorci LTRV93 i LTRV94) kojima pripada 6 308 i 5 776 klasificiranih sekvenci Chlorophyta te su ujedno i najučestaliji s 27,97% i 29,34% fitoplanktonskih sekvenci koje pripadaju ovoj skupini. Najveći broj sekvenci klasificiranih u skupinu Cryptophyta pripada uzorku LTRV214 iz travnja, 2022. iz uzorka crpca s 20 m, postaje RV001 (3 412 sekvenci ili 15,47%), dok se ta skupina s klasificiranih 30,43% fitoplanktonskih sekvenci, pokazala najučestalija u ožujku 2022. na postaji RV004 (LTRV208). Obje skupine nisu detektirane u ukupno 64 uzorka.

Najveća brojnost sekvenci koje pripadaju skupini Haptophyta zabilježeno je u uzorku PO107 (4 560 sekvenci) iz lipnja 2021. iz uzorka crpca s 5 m i postaje SJ108 te je to ujedno i uzorak gdje je ova skupina bila najučestalija (23,06% pripadajućih fitoplanktonskih sekvenci). Sekvence koje pripadaju skupini Haptophyta nisu pronađene u 67 uzoraka.

U istraživanom razdoblju, ukupan broj zabilježenih fitoplanktonskih taksona po postajama bio je u rasponu od 32 (SJ107) do 260 (RV001). Najveći broj rodova zabilježen je na postajama RV001 (260), RV004 (257) i SJ108 (161), dok je najmanji broj rodova zabilježen na postajama SJ107 (32), ZI052 (34) i SJ101 (35). Srednja vrijednost zabilježenih rodova po uzorku bila je najviša na postajama RV001 (65,88), RV004 (61,44) i SJ108 (49,33), dok su najniže srednje vrijednosti zabilježene na postajama SJ107 (11,80), ZI052 (11,60) i CR001 (13,20). Standardna devijacija pokazuje najveću varijabilnost unutar uzorka na postajama uzorkovanja crpcima i fitoplanktonskom mrežom, RV001 (sd = 40,85), RV004 (sd = 34,80) i SJ108 (sd = 30,79). Najniže vrijednosti standardne devijacije zabilježene su na postajama SJ107 (sd = 4,60), SJ101 (sd = 4,44) i ZI052 (sd = 5,03) gdje su uzorkovanja provedena isključivo fitoplanktonskom mrežom.

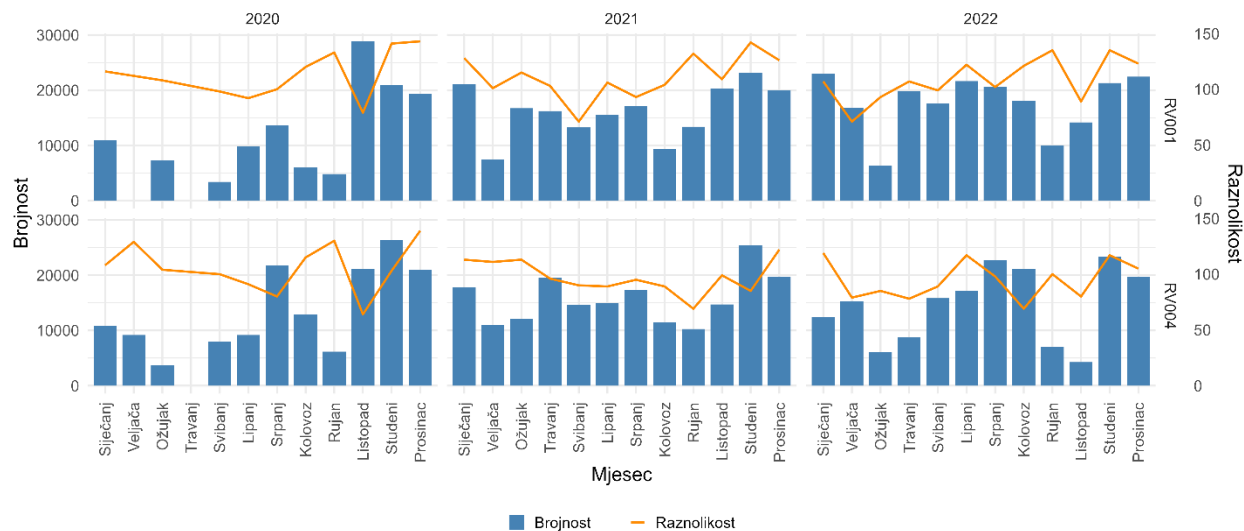
3.4.1 Vremenska i prostorna dinamika fitoplanktonskih zajednica uzorkovano Niskinovim crpcima

Za procjenu dinamike fitoplanktonskih zajednica na temelju uzorkovanja Niskinovim crpcima korišten je set od 145 uzoraka terenskog uzorkovanja LTRV te 12 uzoraka terenskog uzorkovanja PO. Cilj je bio identificirati promjene u sastavu zajednica kroz prostor (horizontalno/vertikalno) i vrijeme (sezonski i godišnji trendovi) uzimajući u obzir brojnost i raznolikost zajednice.

3.4.1.1 Vremenska i prostorna dinamika fitoplanktonskih zajednica uzorkovano Niskinovim crpcima na postajama terenskog uzorkovanja LTRV

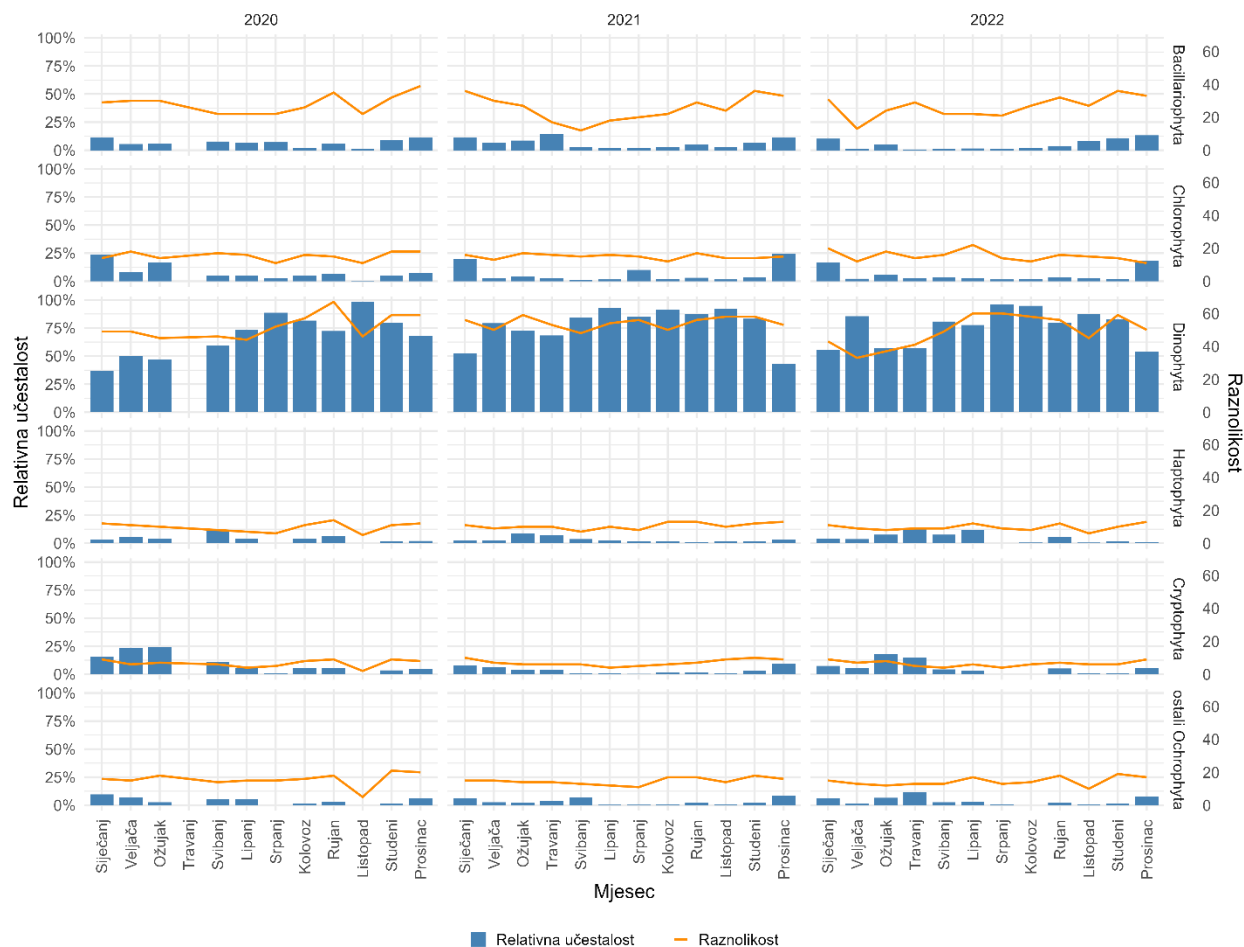
Mjesečni obrasci brojnosti (normalizirani broj sekvenci) i raznolikosti (broj rodova) dominantnih fitoplanktonskih skupina (Dinophyta, Bacillariophyta, Chlorophyta, Cryptophyta, Haptophyta te ostalih Ochrophyta) poslužili su za opis njihovih sezonskih varijacija u metabarkodiranom setu sjevernog Jadrana. Najveća brojnost fitoplanktonskih sekvenci kroz sve tri godine javlja se krajem godine (studeni, prosinac) te u ljetnim mjesecima (lipanj-kolovoz), dok je u proljeće (ožujak-travanj) i početkom jeseni (rujan) prisutan pad brojnosti fitoplanktonskih sekvenci. Raznolikost, izražena kroz broj zabilježenih fitoplanktonskih rodova, u promatranom razdoblju uglavnom je pratila promjene u brojnosti fitoplanktonske zajednice pa su tako uočene niže vrijednosti raznolikosti u jesen, a više tijekom ljetnih i zimskih mjeseci. Tijekom srpnja i listopada 2020. na

obje postaje uzorkovanja LTRV te kolovoza 2020, na postaji RV004 primjećen je porast brojnosti uz pad raznolikosti dok je krajem ljeta uglavnom prisutna veća raznolikost uz manju brojnost ([Slika 3.22](#)).



Slika 3.22 Prikaz odnosa brojnosti fitoplanktonskih sekvenci (stupičasti dijagram) i raznolikosti na razini roda (linijski dijagram) kroz vremenski period od tri godine na postajama terenskog uzorkovanja LTRV – kombiniranim uzorkovanjem fitoplanktonskom mrežom i Niskinovim crpcima na dvije dubine

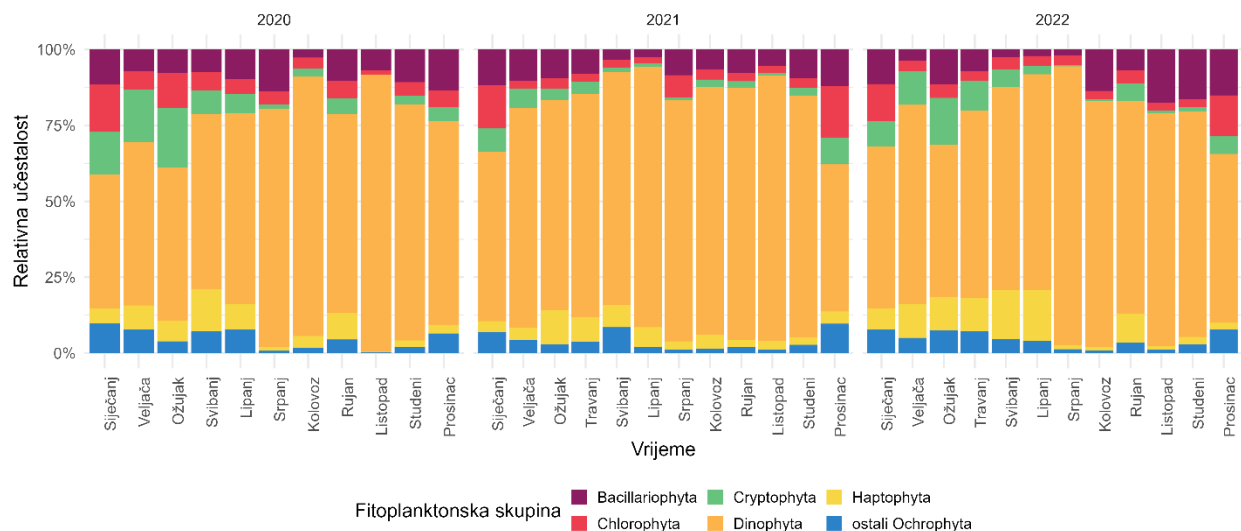
Obrazac pada raznolikosti broja fitoplanktonskih rodova tijekom jeseni zamijećen je kod svih istraživanih skupina, kroz sve istraživane godine ([Slika 3.23](#)). Najizraženije sezonske promjene brojnosti fitoplanktonskih sekvenci zabilježene su kod diatomeja i dinoflagelata, koje je karakterizirala i najveća raznolikost rodova. Za dinoflagelate prisutan je bio porast raznolikosti tijekom ljeta, a za diatomeje u ranu jesen te zimu. Ostale fitoplanktonske skupine karakterizirala je u istraživanom razdoblju relativno niska brojnost i raznolikost uz blagi porast tijekom zime.



Slika 3.23 Odnos brojnosti (stupičasti dijagram) i raznolikosti fitoplanktonskih skupina (linijski dijagram) kroz razdoblje od tri godine (2020, 2021, 2022) uzorkovanjem Niskinovim crpcima (5 i 20 m) na terenskom uzorkovanju LTRV (postaje RV001 i RV004)

Brojnost dinoflagelata imala je izraženu sezonsku dinamiku, s najvišim vrijednostima brojnosti zabilježenima u ljetnim mjesecima (lipanj–kolovoz) tijekom sve tri istraživane godine (2020, 2021, 2022). Tijekom istraživanog razdoblja doprinos Dinophyta ukupnoj fitoplanktonskoj zajednici bio je 70–90% (Slika 3.24, Prilog 15a). U ljetnim mjesecima zabilježena je dominacija rodova *Gyrodinium*, *Karlodinium* i *Phalacrothrix*, a za kasno ljeto i rod *Gymnodinium*. U proljetnim mjesecima, od dinoflagelata, zabilježena je visoka brojnost roda *Torodinium*. Dominacija heterotrofnih dinoflagelata poput najbrojnijeg takvog roda *Aboebophyta*, bila je karakteristična za zimske i mjesece ranog proljeća. Osim sezonskih, kod skupine dinoflagelata, zabilježene su i godišnjepromjene u sastavu i brojnosti pojedinih rodova. U odnosu na ostale istraživane godine, u 2022. godini zabilježena je veća brojnost roda *Dinophysis*, a u 2020. rodova

Protoperidinium i *Ceratoperidinium*. Tijekom 2020 i 2022 je pojavnost roda *Dinophysis* zabilježena u jesenskim, a tijekom 2021. godine u ljetnim mjesecima. Visoka brojnost roda *Noctiluca* obilježila je travanj 2020. i 2021. godine, a roda *Alexandrium* svibanj 2021. (Slika 3.25).

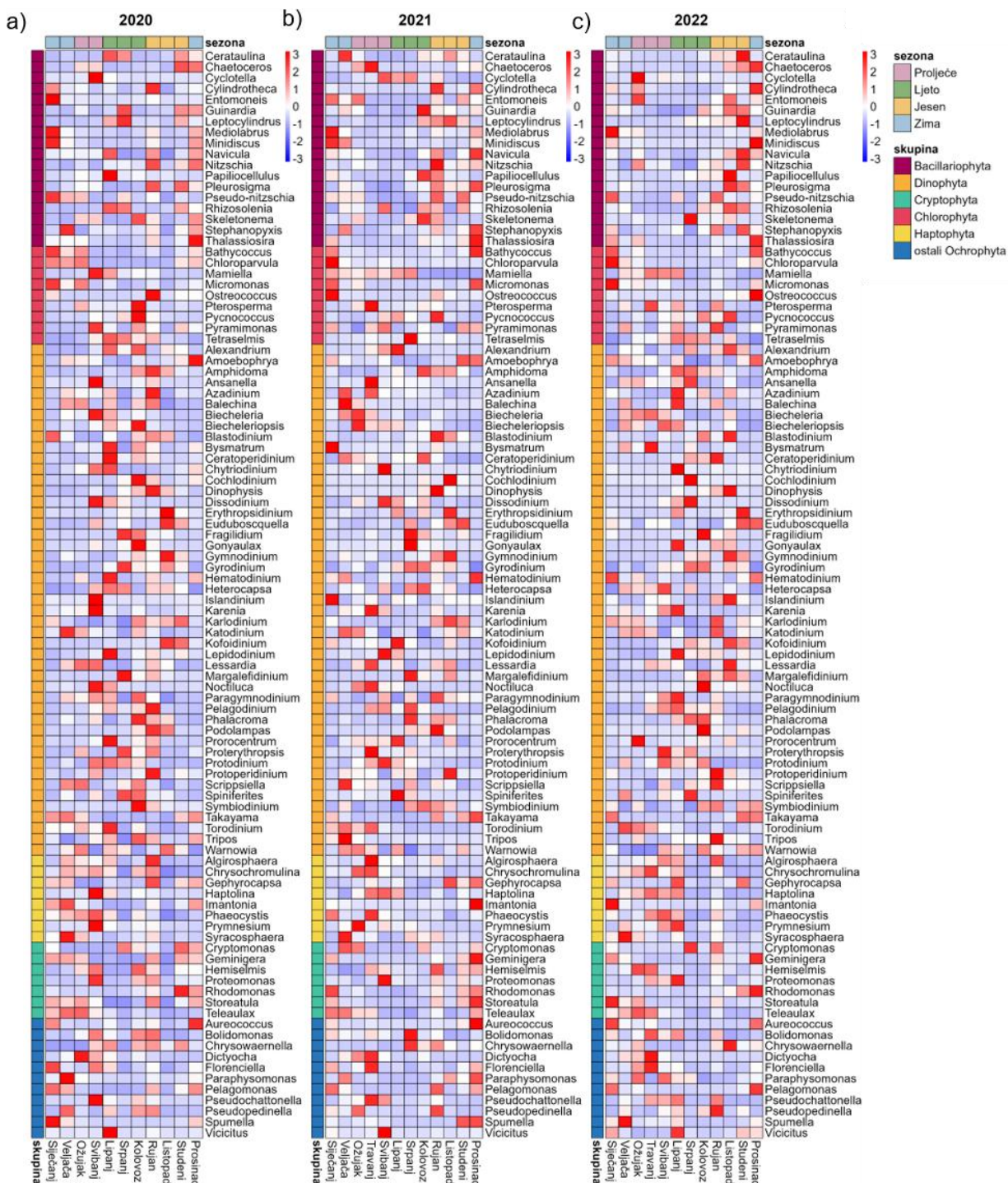


Slika 3.24 Relativna učestalost fitoplanktonskih skupina u istraživanom razdoblju od tri godine.

Na temelju relativne učestalosti, Bacillariophyta u istraživanom razdoblju čine fitoplanktonske zajednice tijekom cijele godine, ali s izraženijim ulogama u zimskim i proljetnim mjesecima, osobito tijekom siječnja, veljače i ožujka svih godina, kada je relativni udio dosezao i do 20%. Ljeti i u ranoj jeseni njihova se učestalost značajno smanjivala, dok su tijekom studenog ponovno zabilježene više vrijednosti (Slika 3.24). Najbrojniji dijatomejski rodovi u istraživanom setu podataka bili su *Chaetoceros*, *Pseudo-nitzschia*, *Cyclotella*, *Thalassiosira*, *Mediolabrus*, *Rhizosolenia*, *Leptocylindrus* i *Cerataulina*. Prisutnost roda *Chaetoceros* zabilježena je kroz čitavo istraživano razdoblje, ali u većoj učestalosti tijekom ranog proljeća i kasne jeseni (Slika 3.25). Tako je tijekom ožujka i travnja 2021. relativna učestalost roda *Chaetoceros* unutar skupine Bacillariophyta iznosila je 88,92%. Rod *Pseudo-nitzschia* najučestaliji je bio tijekom ljetnih mjeseci, sa visokim brojnostima zabilježenima početkom 2020. godine. Za proljetne mjesece, kroz sve tri godine, karakteristična je bila povećana učestalost roda *Cyclotella* dok se rod *Cerataulina* najčešće pojavljivao u kasno ljeto. Povećana relativna učestalost roda *Leptocylindrus* je u istraživanom setu sjevernog Jadrana zabilježena u ljeto (2020. i 2022. godina) i jesen (2021. godina). U 2021. godini zabilježena je veća učestalost dijatomeja u ljetnom razdoblju u odnosu na

ljetni prediod, a najučestaliji je bio rod *Pseudo-nitzschia*. Dijatomejski rodovi manje veličinske frakcije poput *Mediolabrus* i *Minidiscus* prisutni su bili tijekom cijele godine, ali se javljaju u većoj učestalosti u zimskim mjesecima, posebice siječnju ([Prilog 15b](#)).

Analizom sastava fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana potvrđena je prisutnost predstavnika skupine Chlorophyta u gotovo svim uzorcima istraživanog seta podataka, s izraženim prostorno-vremenskim razlikama u doprinosu brojnosti ukupne fitoplanktonske zajednice pa je tako u pojedinim uzorcima taj doprinos dosezao do 10% ([Slika 3.24](#)). Učestalost skupine Chlorophyta bila je najveća u razdoblju od prosinca do travnja u cijelom istraživanom razdoblju, ali ipak s malo višom učestalosti (osobito veljača i ožujak) tijekom 2020 i 2022, nego 2021. godine. U ostalim mjesecima učestalost Chlorophyta bila je relativno niska (< 2% fitoplanktonskih sekvenci po uzorku), tek uz manji porast u rujnu. Za skupinu Chlorophyta su u setu podataka sjevernog Jadrana uočeni različiti godišnji obrasci raznolikosti i brojnosti rodova ([Prilog 15c](#)). Rod *Micromonas* dominirao je brojnošću unutar skupine Chlorophyta u gotovo svim uzorcima kroz sve tri godine istraživanja ([Prilog 15c](#)). Najvišu relativnu abundanciju *Micromonas* je imao tijekom zimskih i proljetnih mjeseci, u nekim uzorcima doprinoseći i do 80% ukupnog udjela sekvenci Chlorophyta. Uz *Micromonas*, u skupini Chlorophyta veću učestalost tijekom sve tri godine imali su i rodovi *Tetraselmis* tijekom toplog dijela godine i *Pyramimonas* tijekom hladnog dijela godine ([Slika 3.25](#)). Općenito, tijekom ljetnih mjeseci, zajednicom Chlorophyta dominirali su rodovi *Tetraselmis* i *Pycnococcus*, a tijekom zimskih mjeseci rodovi *Micromonas* i *Bathycoccus*.



Slika 3.25 Raznolikost i brojnost zabilježenih rodova fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana terenskog uzorkovanja LTRV. Prikazano je 100 najučestalijih rodova fitoplanktonske zajednice. Fitoplanktonski rodovi grupirani su prema pripadnosti fitoplanktonskoj skupini, naznačenoj okomito uz prikaz roda. Pripadnost određenoj sezoni kao i za svaki mjesec naznačeni su vodoravno od prikaza.

U istraživanom setu podataka sjevernog Jadrana, skupina Haptophyta bila je stalno prisutna, ali u nižoj učestalosti u odnosu na ostale fitoplanktonske skupine. Uz Chlorophyta, predstavnici Haptophyta su bili najčešće zabilježeni tijekom zime i proljeća kad su u pojedinim uzorcima doprinosili ukupnoj brojnosti fitoplanktona do 10%. Tijekom ljeta i jeseni (uz iznimku rujna), njihov je udio bio manji, ali i dalje prisutan u većini uzoraka. Na razini roda, za skupinu Haptophyta zabilježena je znatna raznolikost (19 detektiranih rodova) s promjenjivim sezonskim i godišnjim obrascima brojnosti. Najučestaliji rod skupine Haptophyta bio je *Chrysochromulina* tijekom cijelog razdoblja istraživanja (40,88% ukupnih sekvenci Haptophyta). Izraženija sezonska dinamika uočena je kod rodova *Phaeocystis* i *Imantonia* (visoko učestali/brojni u zimskom razdoblju kada više od 20%) te *Prymnesium* i *Haptolina* (visoko zastupljeni/brojni u ljetnom razdoblju kada čine 30–40% ukupne učestalosti Haptophyta). Rod *Gephyrocapsa*, kao predstavnik kokolitoforida (Prymnesiophyceae) također je imao sezonsku dinamiku pojavnosti i brojnosti, a veću učestalost u zajednici imao je tijekom ljeta i zime kada dostiže učestalost i do 50% ukupne brojnost Haptophyta .

Skupina Cryptophyta, predstavljena s 12 rodova, u istraživanom je setu podataka zabilježena u nižim brojnostima, ali prisutna tijekom sve tri godine i sa prisutnim sezonskim obrascem. Uočljiv je bio karakterističan obrazac veće učestalosti tijekom zime i proljeća te niže učestalost tijekom ljetnog i jesenskog razdoblja. Kod skupine Cryptophyta izrazito dominantan rod bio je *Teleaulax* koji je predstavljao 78,26% ukupnih sekvenci Cryptophyta, prisutan u gotovo svim uzorcima, a osobito tijekom 2020. i 2021. godine. Uz *Teleaulax* su kod skupine Cryptophyta, tijekom čitavog istraživanog razdoblja, zabilježeni i drugi rodovi kao što su *Geminigera* (13,82%) i *Cryptomonas* (2,37% ukupnih Haptophyta), ali u znatno nižoj učestalosti. Rodovi skupine Cryptophyta sa sezonskom pojavnosti bili su *Geminigera* i *Rhodomonas*, sa većom učestalosti tijekom jeseni i zime kada dosežu učestalost do 30% i 10%. Za rod *Cryptomonas* bila je karakteristična pojava isključivo tijekom ljeta (srpanj 2022.), ali tada je zabilježen u izrazito velikom udjelu te je činio 69,94% ukupnog udjela sekvenci Cryptophyta.

Unatoč tome što se u ukupnim udjelima sekvenci ne pojavljuju kao dominantni, ostali Ochrophyta pokazuju visoku raznolikost, s izraženim sezonskim i među-godišnjim obrascima pojavljivanja. Najčešće se pojavljuju tijekom zime i proljeća, te su zabilježeni u nešto višoj brojnosti tijekom rujna. Razlog tome su *Pelagomonas* (24,37% ukupnih sekvenci ostalih Ochrophyta) i *Aureococcus*

(11,73%) kao predstavnici skupine Pelagophyceae pokazuju najveći udio u brojnosti sekvenci ostalih Ochrophyta upravo u zimskim razdobljima i tijekom rujna (do 40% za *Pelagomonas* i do 30% za *Aureococcus*) te *Dictyocha* kao predstavnik skupine Dictyochophyceae pokazuje izrazitu sezonalnost i pojavu u proljetnim mjesecima (do 50% učestalosti sekvenci ostalih Ochrophyta). Ostali predstavnici ove skupine karakterizirani su velikom varijabilnošću te se pojavljuju nedosljedno, često u većoj učestalosti.

Na temelju vremenskog praćenja vrijednosti četiri indeksa alfa raznolikosti dobiven je i detaljan uvid u mjesečne, sezonske i godišnje varijacije u sastavu fitoplanktonskih zajednica unutar dvije postaje, RV001 i RV004 ([Slika 3.26, Prilog 22](#)). Procijenjeni su opći obrasci raznolikosti fitoplanktonskih zajednica, pomoću Shannon indeksa, Simpson indeksa, inverznog Simpson indeksa i Pielouovog indeksa ujednačenosti, pokazala je izraženu sezonsku dinamiku. Uočene su izražene sezonske varijacije u vrijednostima svih indeksa, pri čemu najniže vrijednosti raznolikosti prevladavaju u ljetnom razdoblju, osobito izražene kod Shannon i Simpson indeksa.

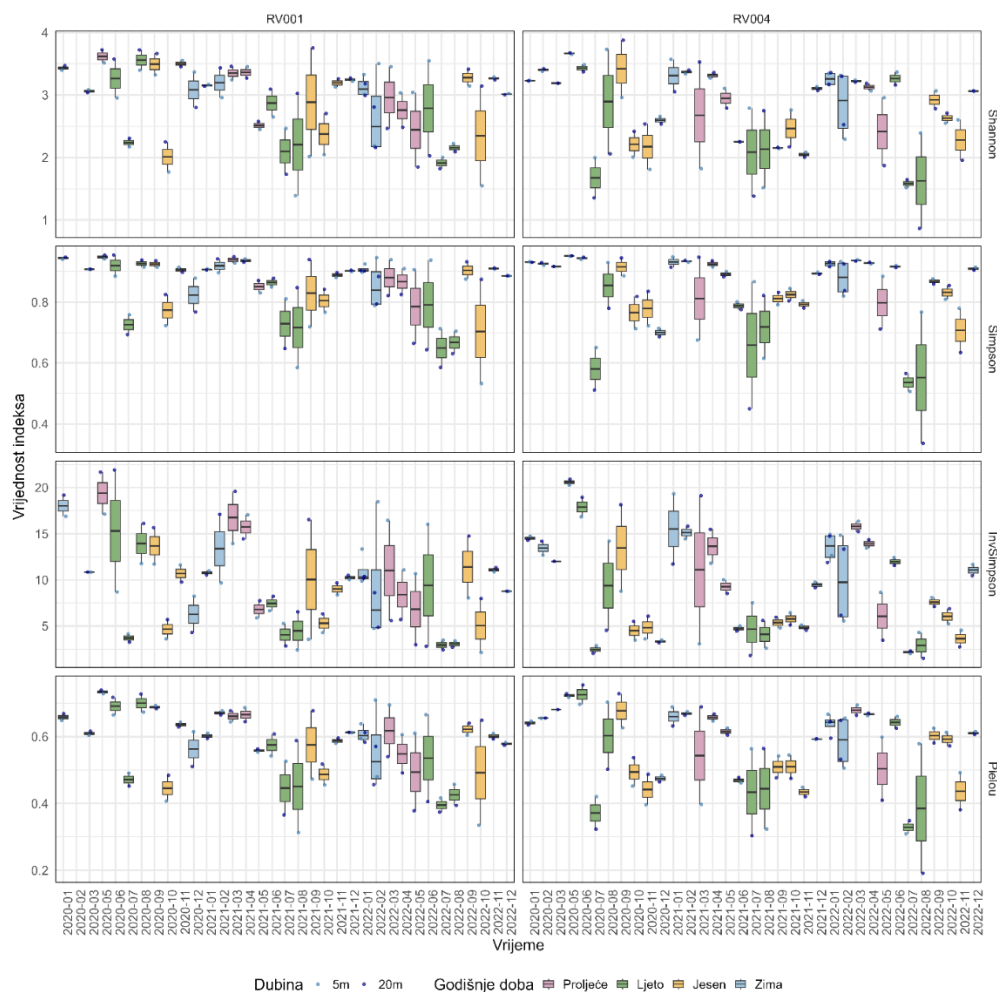
Najviša prosječna raznolikost na temelju Shannon indeksa zabilježena je u svibnju 2020. ($3,641 \pm 0,09$), uz minimalnu vrijednost od 3,514 i maksimalnu 3,724. Visoke vrijednosti su također zabilježene u rujnu ($3,457 \pm 0,402$) i veljači iste godine ($3,400 \pm 0,028$). Nasuprot tome, najniže vrijednosti uočene su u srpnju ($1,747 \pm 0,210$) i kolovozu ($1,891 \pm 0,696$) 2022. s minimalnim Shannon indeksom od svega 0,863 na 20 m s postaje RV004. S obzirom na sezone najviše vrijednosti Shannon indeksa javljaju se zimi ($3,096 \pm 0,347$) i u proljeće ($3,034 \pm 0,521$), dok su tijekom jesenskih i ljetnih mjeseci ($2,702 \pm 0,641$ i $2,446 \pm 0,784$) vrijednosti niže.

Simpson indeks dominacije također ukazuje na sezonsku strukturu fitoplanktonskih zajednica. Najviše vrijednosti zabilježene su također u svibnju ($0,950 \pm 0,005$) i siječnju ($0,938 \pm 0,008$) 2020.. Najniže vrijednosti zabilježene su u srpnju ($0,593 \pm 0,087$) i kolovozu ($0,610 \pm 0,191$) 2022., što sugerira povećanu dominaciju jedne ili nekoliko vrsta. Ukupno gledano prema sezonama, Simpson indeks varirali su između 0,593 i 0,950, s jasno nižim vrijednostima tijekom ljeta ($0,752 \pm 0,162$).

Najviše vrijednosti inverznog Simpson indeksa efektivne raznolikosti zabilježene su svibnju ($19,993 \pm 2,001$) i lipnju ($16,597 \pm 5,664$) 2020, dok se najniže vrijednosti pokazale u srpnju ($2,555 \pm 0,637$) i kolovozu ($2,974 \pm 0,637$) 2022.. U više navrata tijekom ljeta i jeseni, vrijednosti su padale ispod 5, što ukazuje na snažnu neravnotežu u sastavu zajednica. Ti podaci pokazuju

ekstremne sezonske kontraste u broju ko-dominantnih vrsta, gdje su ljetni mjeseci ($6,921 \pm 5,586$) dosljedno povezani s niskim efektivnim brojem taksona, dok proljeće ($12,397 \pm 5,409$) i zima ($11,296 \pm 4,188$) ukazuju na višestruku dominaciju i veću strukturnu složenost zajednice.

Ravnomjernost raspodjele abundancije, procijenjena Pielou indeksom, pokazala je najniže vrijednosti u srpnju ($0,362 \pm 0,045$) i kolovozu ($0,406 \pm 0,162$) 2022., dok su najviše vrijednosti zabilježene u svibnju ($0,729 \pm 0,009$) i lipnju ($0,709 \pm 0,038$) 2020. U većini proljetnih i zimskih mjeseci vrijednosti Pielou indeksa prelazile su 0,60 ($0,621 \pm 0,095$ i $0,608 \pm 0,095$), dok su ljetni mjeseci ($0,505 \pm 0,148$) bili ispod te granice. Varijabilnost između mjeseci naglašena je i standardnim devijacijama, osobito u srpnju i kolovozu, gdje se bilježe veće oscilacije u zajednici ($SD > 0,12$).

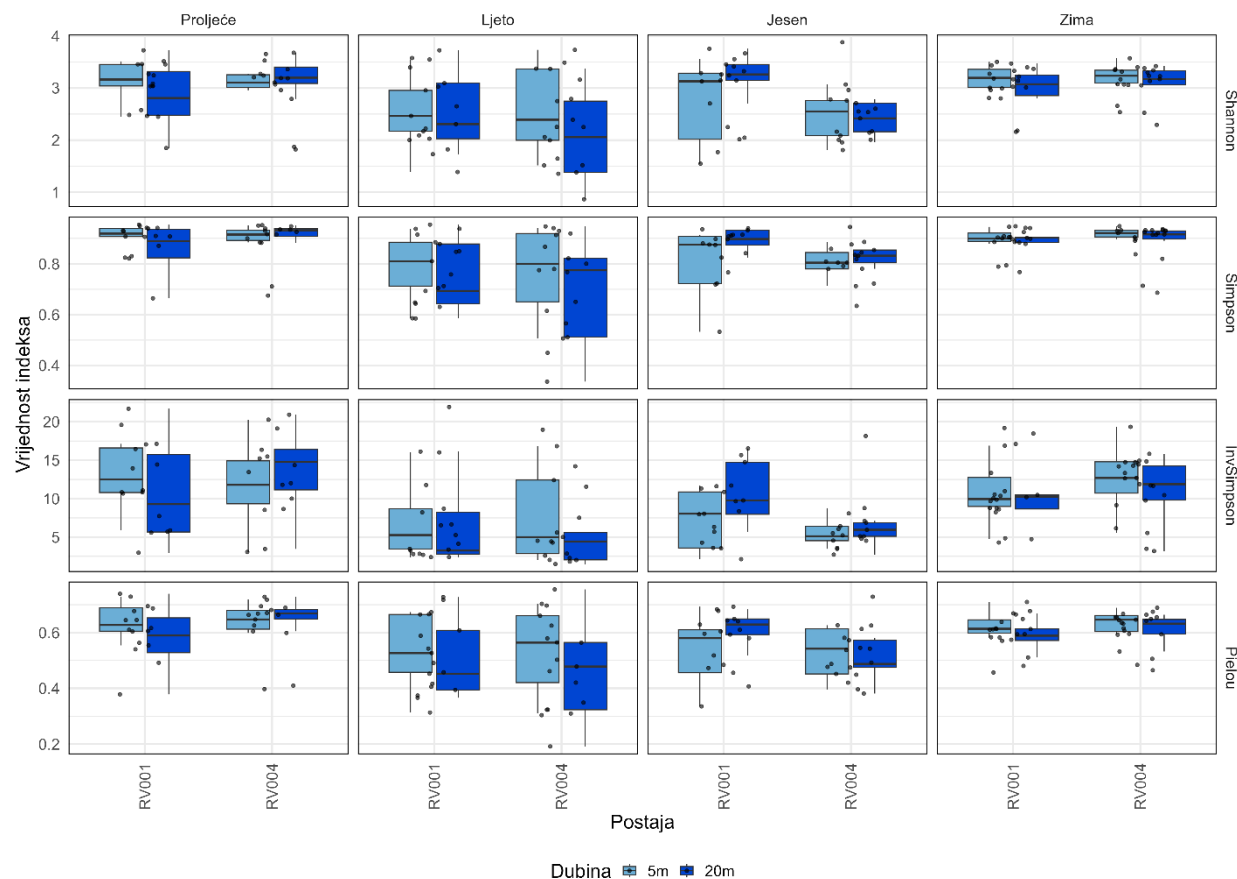


Slika 3.26 Vremenska dinamika indeksa bioraznolikosti na postajama RV001 i RV004. Prikazane su vrijednosti četiri indeksa bioraznolikosti (Shannon, Simpson, Inverse Simpson i Pielou) za dvije postaje

(RV001 i RV004) u razdoblju od 2020. do 2022. godine. Vrijednosti su prikazane s obzirom na mjesece, godišnja razdoblja i dubine.

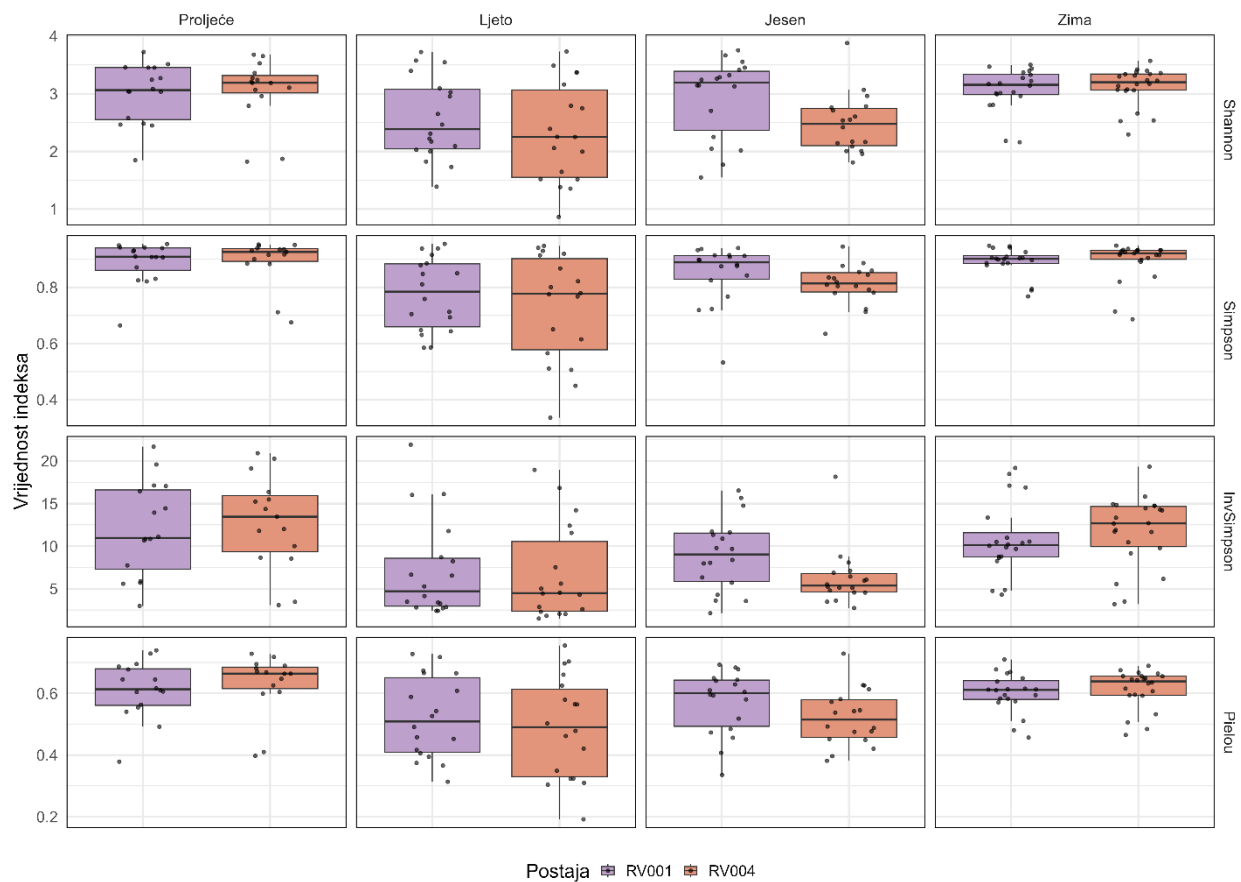
je i na dvije dubine uzorkovanja (5 m i 20 m), kroz četiri sezonska razdoblja (proljeće, ljeto, jesen, zima) za dvije analizirane postaje, RV001 i RV004 ([Slika 3.2](#)). Razlike po dubinama unutar postaja proveden je Kruskal-Wallis testom unutar svake postaje i sezone.

Alfa raznolikost fitoplanktonske zajednice procijenjena je na temelju razlika u vrijednostima indeksa između podpovršinskog sloja (5 m) i dubljeg sloja (20 m) Kruskal-Wallis testom unutar svake postaje i sezone ([Prilog 23](#), [Prilog 24](#)). Razlike su bile najuočljivije tijekom ljetnih i ranih jesenskih mjeseci. Tijekom tih razdoblja, Shannon i inverzni Simpson indeksi redovito su pokazivali niže vrijednosti na dubini od 5 m u usporedbi s 20 m. Za Shannon indeks, iako su pojedine postaje (npr. RV001 u jeseni) imale nešto niže p-vrijednosti ($p = 0,085$), niti jedna usporedba nije dosegla statističku značajnost. Time se sugerira relativna vertikalna homogenost raznolikosti u vodenom stupcu. Simpson indeks pokazao je sličan obrazac. Sve usporedbe po dubinama unutar sezona i postaja dale su rezultate koji nisu statistički značajni, što implicira da dubina nije presudna za dominaciju vrsta u ovom skupu podataka. Kod inverznog Simpson indeksa, unatoč ponešto većim varijacijama χ^2 vrijednosti u ljetnim uzorcima, p vrijednosti i dalje ostaju visoke i ne potvrđuju značajne dubinske razlike. Primjerice, tijekom ljeta 2021. na postaji RV001, vrijednosti InvSimpson indeksa na 5 m pale su ispod 5, dok su na 20 m zabilježene vrijednosti iznad 10. Pielou indeks ravnomjernosti također nije pokazao značajne razlike između dubina u niti jednoj sezoni ili postaji - sve p vrijednosti bile su iznad granice značajnosti ($p > 0,05$) ([Prilog 24](#)). Analizom podataka na 5 m i 20 m dubine utvrđene su određene razlike u raznolikosti, s time da su one izraženije u ljetnim i jesenskim mjesecima. Ipak, Kruskal-Wallis testovi po postaji i sezoni nisu pokazali statistički značajne razlike između slojeva ($p > 0,1$).



Slika 3.27 Sezonske promjene vrijednosti indeksa bioraznolikosti (Shannon, Simpson, Inverse Simpson i Pielou) na različitim dubinama (5 m i 20 m) za postaje RV001 i RV004

Usporedba između postaja RV001 i RV004 otkrila je dosljedno više vrijednosti svih indeksa raznolikosti na postaji RV001 tijekom ljeta i jeseni te na postaji RV004 tijekom proljeća i zime (Slika 3.28). Te razlike bile su osobito izražene tijekom jeseni na dubini od 20 m, gdje su svi indeksi ukazivali na višu raznolikost i ravnomjernost zajednica na RV001. Kruskal-Wallis testom potvrđene su statistički značajne razlike između postaja isključivo tijekom jeseni na dubini od 20 m za sve indekse; Shannon ($\chi^2 = 5,07$, $p = 0,024$), Simpson ($\chi^2 = 5,07$, $p = 0,024$), InvSimpson ($\chi^2 = 5,90$, $p = 0,015$), Pielou ($\chi^2 = 4,68$, $p = 0,030$). U ostalim godišnjim razdobljima i dubinama razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$), što sugerira da su zajednice između postaja općenito bile homogeno strukturirane, osim tijekom jeseni kada dolazi do izraženijih razlika među zajednicama.

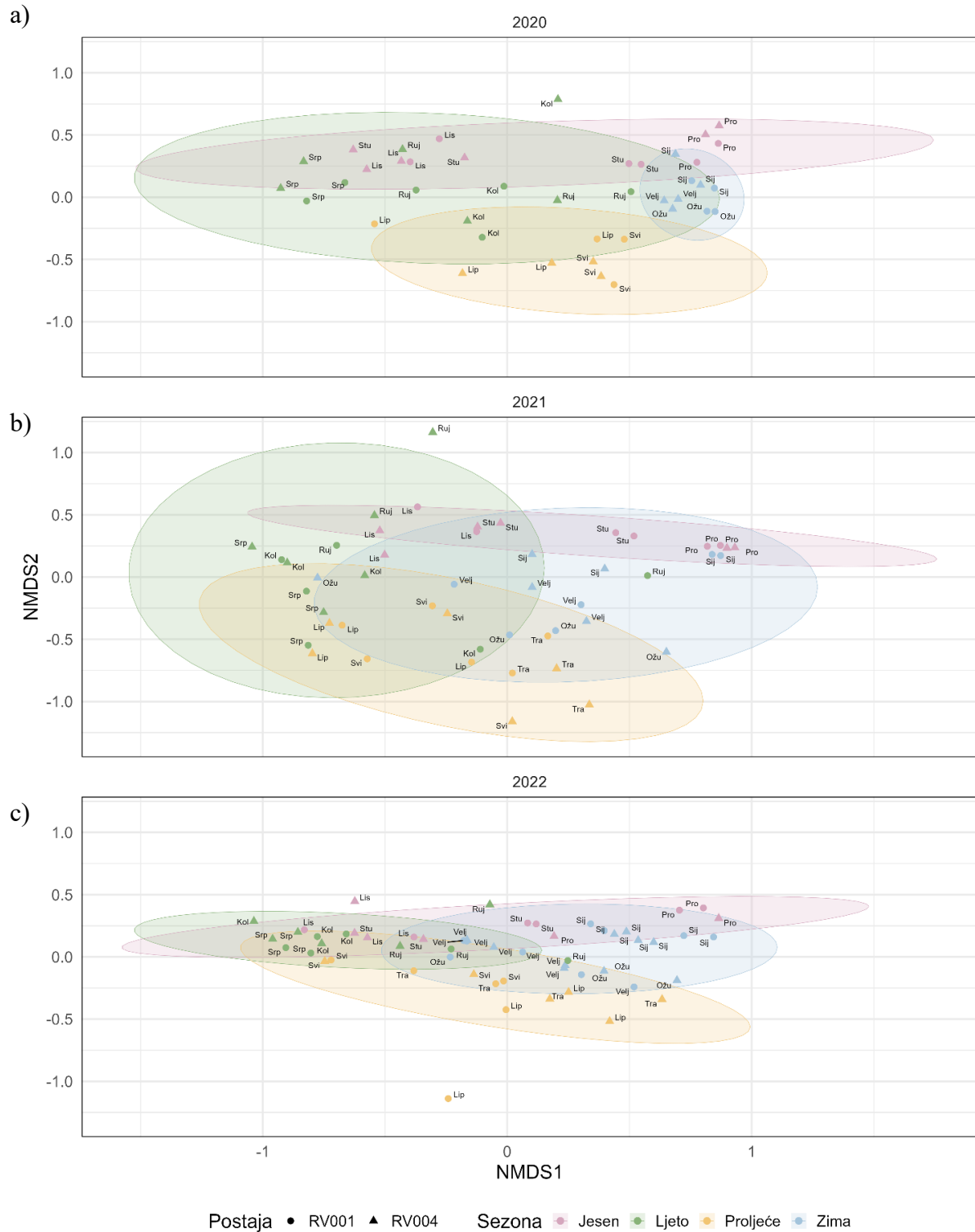


Slika 3.28 Sezonska usporedba indeksa bioraznolikosti (Shannon, Simpson, Inverse Simpson i Pielou) između postaja RV001 i RV004

Kako bi se dodatno istražila sezonska komponenta u zajednici, provedena je multivarijatna analiza (nMDS) temeljena na Bray-Curtis udaljenostima ($\text{stres} = 0,1525861$). Elipse pouzdanosti (95%) korištene su za vizualizaciju stupnja varijabilnosti i preklapanja zajednica unutar sezona ([Slika 3.29](#)). Tijekom sve tri godine, zimski i proljetni uzorci grupiraju se kompaktnije, uz relativno manju unutargrupnu disperziju, što upućuje na stabilniji taksonomski sastav zajednice u tim razdobljima. Ljetni uzorci pokazuju najveću varijabilnost, s jasno odvojenim elipsama i višestrukim klasterima unutar pojedine godine, što sugerira dinamične i disruptivne promjene zajednice. Jesen pokazuje međupoziciju – elipse su šire od zimskih i proljetnih, ali ipak stabilnije od ljetnih. Posebno u 2021., jesenska zajednica pokazuje šire preklapanje s ostalim sezonama. Godine se međusobno razlikuju po stupnju preklapanja između sezonskih skupina gdje se u 2020., elipse više preklapaju (osobito zima-proljeće); u 2021., jasno je razgraničenje između zime i ljeta, dok u 2022., dolazi do kompresije zajednica prema središtu ordinacijskog prostora, što može

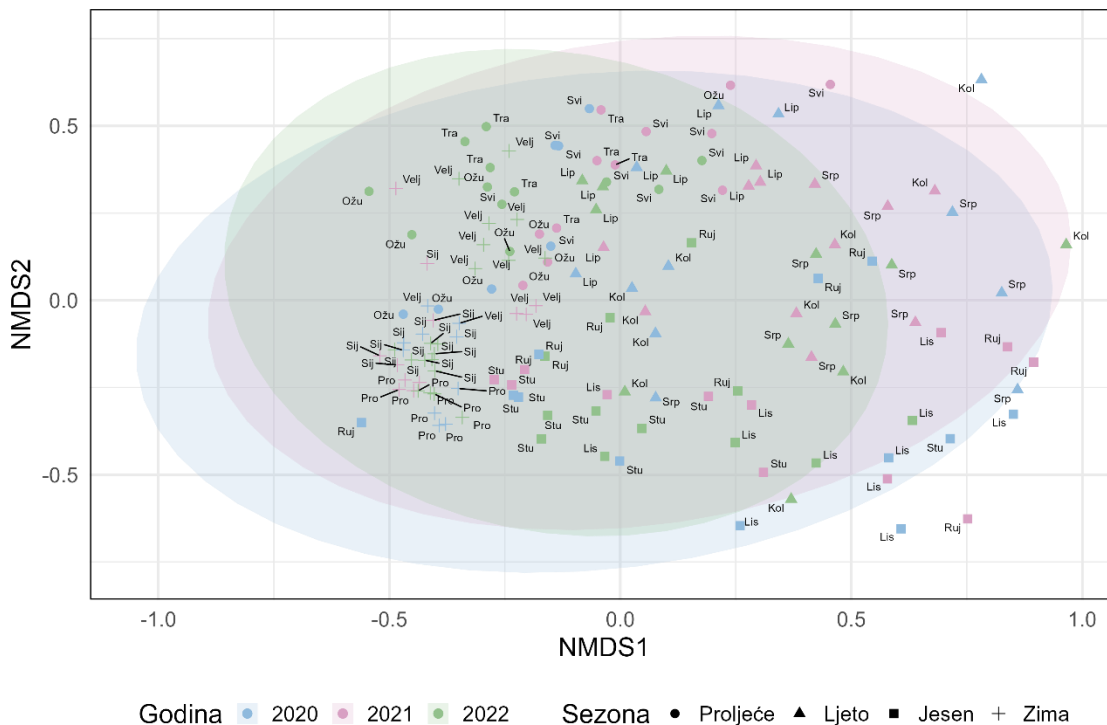
ukazivati na smanjenje ukupne raznolikosti. Ovi nalazi dodatno podupiru kvantitativne rezultate indeksa raznolikosti – sezonske promjene su jasno izražene, a ljetni mjeseci dosljedno pokazuju najveće unutargrupne varijacije te potencijalne odstupanja od uobičajenih zajedničkih obrazaca. To je potvrđeno iPERMANOVA analizom (adonis2, Bray-Curtis, 999 permutacija). Rezultati Turkey *post hoc* analize između parova ukazuju na statistički značajan utjecaj sezone na strukturu zajednice ($F = 18,89$, $p = 0,001$, $R^2 = 27,6$), što potvrđuje izraženu sezonsku dinamiku u sastavu fitoplanktona. Dubina uzorkovanja pokazala je slabiji, ali ipak statistički značajan utjecaj na sastav zajednice ($F = 2,42$, $p = 0,028$, $R^2 = 1,2$), čime se potvrđuje da se fitoplanktonska struktura blago razlikuje između površinskog (5 m) i dubljeg sloja (20 m). Suprotno tome, razlike između postaja nisu bile statistički značajne ($F = 1,81$, $p = 0,074$, $R^2 = 0,9$) ([Prilog 25](#)).

Rezultati SIMPER analize su pokazali da se razlike između zime i proljeća, kao i ljeta i jeseni, temelje na relativno malom broju taksona s dominantnim doprinosom. Primjerice, u usporedbi zima – proljeće, najveći doprinos imao je rod *Amoebophrya* (5,7%), praćen rodovima *Alexandrium*, *Ansanella* i *Tripos*, čiji je zajednički kumulativni doprinos dosegno gotovo 35%. Između ljeta i jeseni, razlikovne taksone činili su *Dinophysis*, *Prorocentrum minimum* i *Pseudo-nitzschia spp.*, s jasno izraženom dominacijom u ljetnim mjesecima. Značajno je da su neki rodovi, poput *Amoebophrya* i *Alexandrium*, pokazivali konzistentan doprinos u više sezonskih parova, što upućuje na njihovu ulogu kao ključnih pokazatelja sezonske promjene unutar zajednice. Iako je ukupna raznolikost zajednice vrlo složena i razmjerno distribuirana među brojnim rijetkim taksonima, 10–15 taksona u svakom sezonskom paru kumulativno je objašnjava između 60 i 75% ukupnih različitosti.



Slika 3.29 Prikazi sezonskih varijacija sastava i relativne učestalosti fitoplanktonskih zajednica na postajama RV001 i RV004, terenskog uzorkovanja LTRV kroz mjesečna uzorkovanja u periodu od tri istraživane godine na temelju Bray-Curtis udaljenosti. Svaka elipsa prikazuje sličnosti u strukturi zajednice za pojedinu sezonu

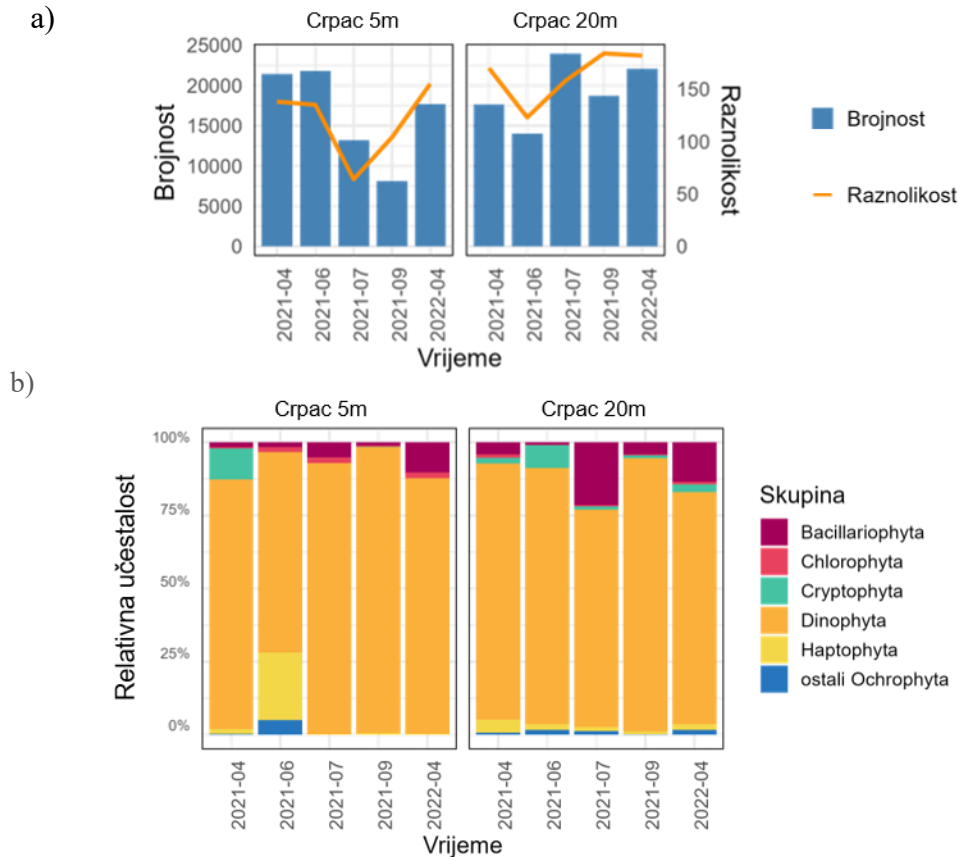
Također, analiza među-godišnjih varijacija u sastavu fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana na temelju rezultata mjesečnog uzorkovanja crpcem na dubini od 5 i 20 m pokazuje da je godina uzorkovanja također imala značajan utjecaj ($F = 4,69$, $p = 0,001$, $R^2 = 4,6$) ([Slika 3.30](#)).



Slika 3.30 Razlike u sastavu i relativnoj učestalosti fitoplanktonskih zajednica na postajama terenskog uzorkovanja LTRV uzorkovanim crpcima na dubinama od 5 i 20 m na temelju Bray-Curtis udaljenosti. Svaka elipsa prikazuje sličnosti u strukturi zajednice za pojedinu godinu

3.4.1.2 Sastav i dinamika zajednica uzorkovanim Niskinovim crpcima na postaji SJ108 terenskog uzorkovanja PO

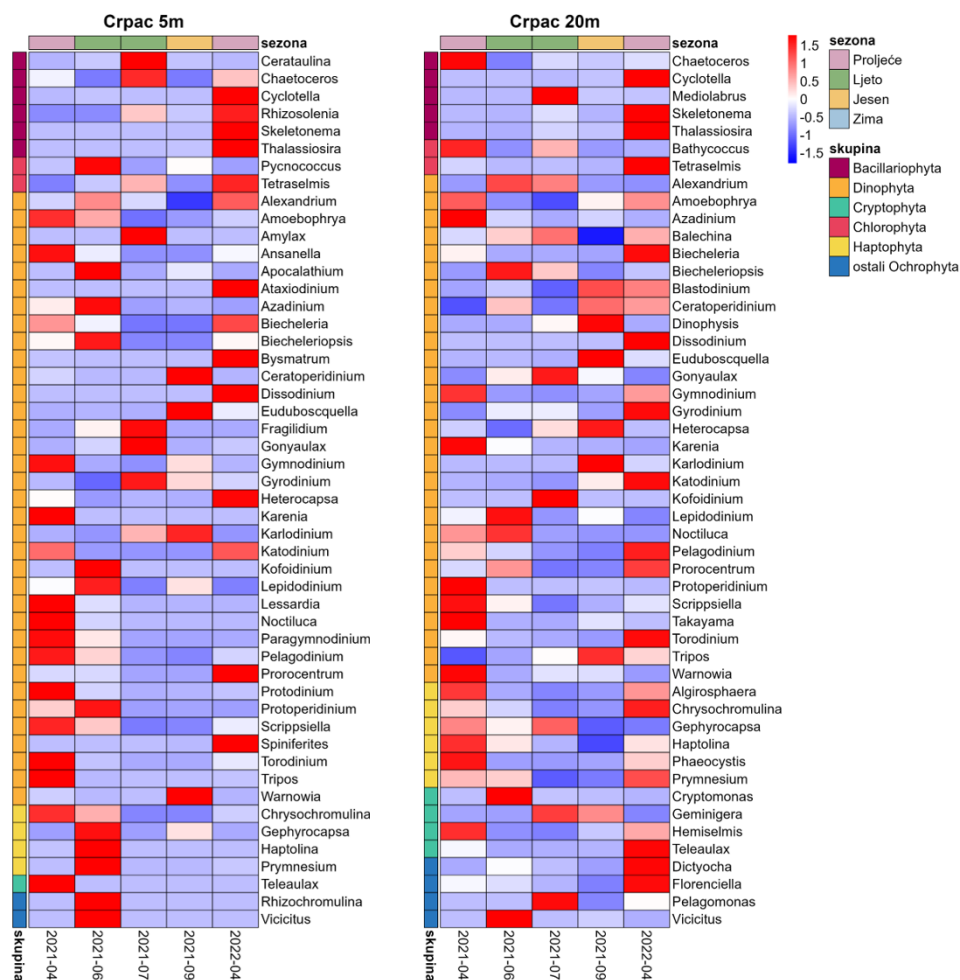
Sastav zajednica na postaji SJ108 pokazuje slične obrasce dinamike fitoplanktonskih zajednica kao i postaje LTRV. Najizraženije sezonske fluktuacije u brojnosti zabilježene su kod dijatomeja i dinoflagelata, koji ujedno pokazuju i najveću raznolikost. Također, skupina Dinophyta je bila dominantna grupa tijekom cijelog ispitivanog razdoblja, dok su druge grupe poput Bacillariophyta, Cryptophyta, Chlorophyta i Haptophyta bile povremeno prisutne i uglavnom manje zastupljene. Zamijećeni su različiti vertikalni obrasci učestalosti na istraživanoj postaji. Cryptophyta pokazuju višu učestalost u potpovršinskom sloju (5 m) u lipnju, što nije zamijećeno u dubljim slojevima (20 m), dok skupina Bacillariophyta u srpnju pokazuje veću učestalost u dubljim slojevima koja nije zapažena u potpovršinskom sloju. ([Slika 3.31](#)).



Slika 3.31 Dinamika fitoplanktonskih zajednica postaje SJ108 terenskog uzorkovanja PO s obzirom na dubinu. Odnos brojnosti i raznolikosti fitoplanktonskih zajednica (a) i relativna učestalost pojedine fitoplanktonske skupine (b).

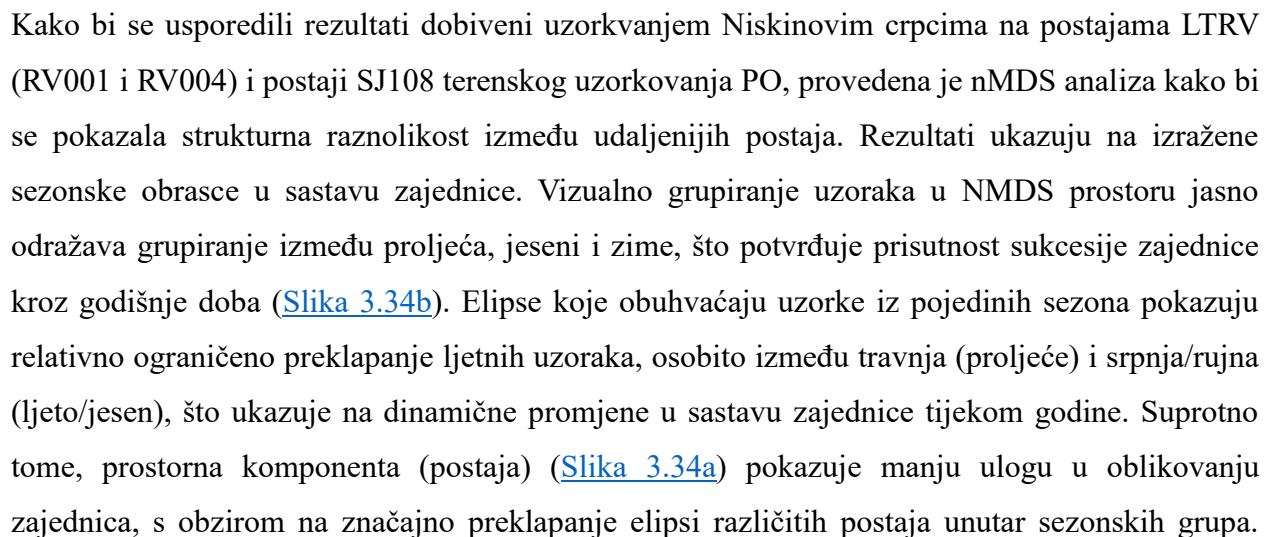
Najučestaliji predstavnik Dinophyta je *Gyrodinium*, također pokazuje različite vertikalne obrasce na postaji SJ108; tijekom lipnja 2021. i travnja 2022 ([Slika 3.32](#)). pokazuje veću učestalost u dubljim slojevima, dok tijekom srpnja i rujna njegova učestalost istovjetna na obje dubine. Tijekom travnja 2021. uočena je na obje dubine niža učestalost ovog roda. Predstavnici skupine Bacillariophyta također pokazuju razlike u vertikalnoj distribuciji. Najučestaliji rod *Chaetoceros* dominantno je zastupljen na obje dubine tijekom travnja 2021., nakon čega je dominacija ovog roda vidljiva samo u dubljim slojevima. Tijekom srpnja, dominacija je izražena samo u potpovršinskom sloju, dok se je u dubljim slojevima primijećena izrazita dominacija roda *Minidiscus*, koja slabi tijekom rujna, dok je njegova prisutnost na 5 m gotovo potpuno izostala. Najučestaliji predstavnik skupine Chlorophyta, *Tetraselmis*, pokazuje veću učestalost u potpovršinskom sloju za sva istraživana razdoblja. Za dublje slojeve karakteristična je veća prisutnost roda *Bathycoccus*. Skupinom Haptophyta najčešće prevladava *Chrysochromulina*,

posebice u dubljim slojevima, za razliku od roda *Prymnesium* čija je povećana prisutnost karakteristična za potpovršinski sloj. Također, uočen je prijelaz dominacije roda *Gephyrocapsa* iz dubljih slojeva (srpanj) u površinske (rujan). Dominacija roda *Teleaulax* (Cryptophyta) koja je prisutna tijekom travnja (2021. i 2022.) u oba sloja, tijekom ljetnih mjeseci migrira u potpovršinski sloj, dok je u dubljim slojevima u ljetnom razdoblju izražena dominacija roda *Cryptomonas*. Ostali Ochrophyta također pokazuju razlike u vertikalnoj distribuciji. U potpovršinskom sloju prevladavaju rodovi poput *Vicicitus*, *Dinobryon* i *Florenziella*, dok u dubljim slojevima su to rodovi *Pelagomonas* i *Dictyocha*.

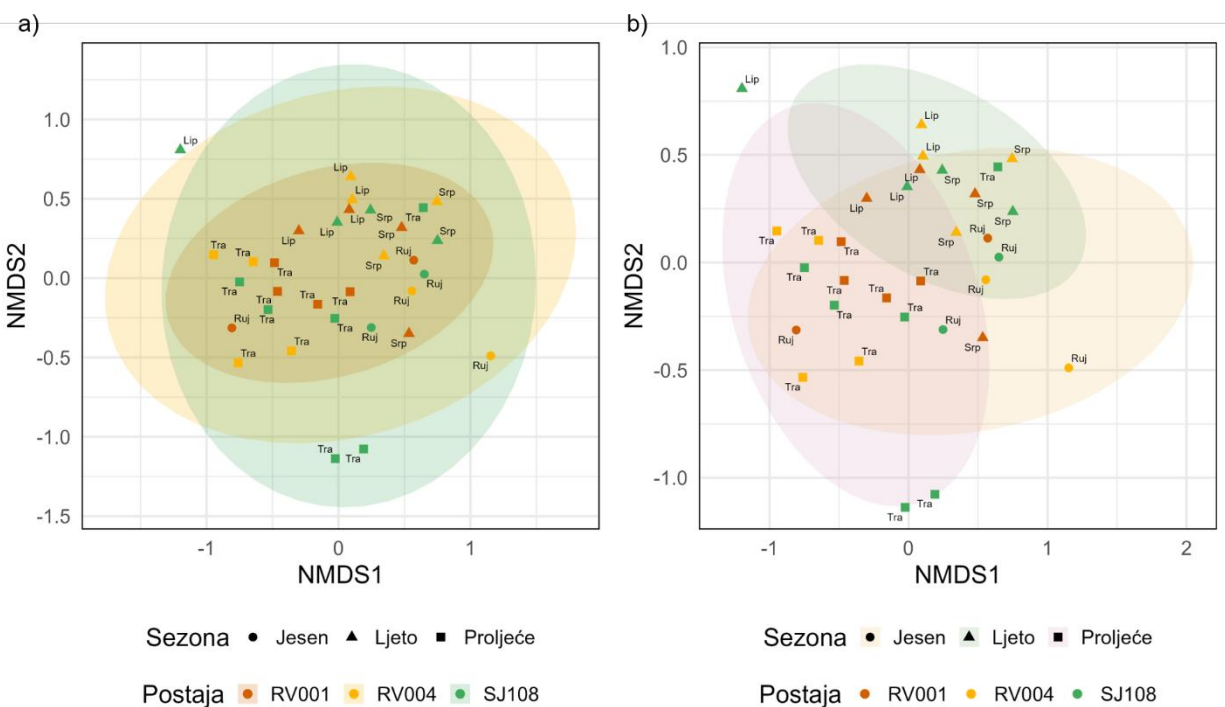


Slika 3.32 Raznolikost i brojnost zabilježenih rodova fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana uzorkovano Niskinovim crpcima na postaji SJ108, terenskog uzorkovanja PO. Prikazano je 50 najučestalijih rodova fitoplanktonske zajednice grupiranih su prema pripadnosti fitoplanktonskoj skupini, naznačenoj okomito uz prikaz roda. Pripadnost određenoj sezoni s obzirom na vrijeme uzorkovanja naznačeni su vodoravno od prikaza.

Slika 3.33 Razlike u sastavu i relativnoj učestalosti fitoplanktonskih zajednica na postaji SJ108 terenskog uzorkovanja PO uzorkovanim crpcima na dubinama od 5 i 20 m na temelju Bray-Curtis udaljenosti. Svaka elipsa prikazuje sličnosti u strukturi zajednice za pojedinu dubinu uzorkovanja



Permutacijska analiza varijance (PERMANOVA, 999 permutacija, adonis2) potvrdila je statistički značajan učinak sezonskih promjena ($R^2 = 0,248$, $p < 0,001$) na sastav zajednice, dok je i utjecaj postaje bio značajan, iako znatno slabiji ($R^2 = 0,021$, $p = 0,011$). No, *post hoc* analiza (Tukey) nije pokazala statistički značajne razlike u unutargrupnim razlikama između parova postaja, iako je razlika između SJ108 i RV001 bila blizu značajnosti ($p = 0,101$), što je u skladu s većom disperzijom uzoraka s postaje SJ108 u NMDS prostoru. Dodatna analiza homogenosti multivarijatnih disperzija (PERMDISP) pokazala je da razlike među grupama nisu posljedica heterogenosti varijance ($F = 2,29$, $p = 0,105$), što dodatno potvrđuje validnost PERMANOVA rezultata ([Prilg 26](#)).

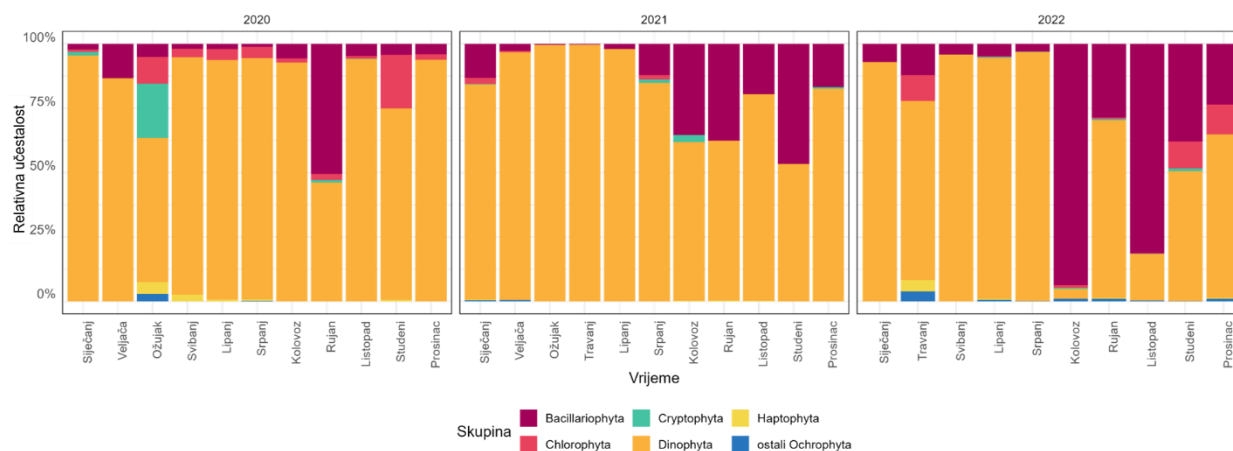


Slika 3.34 Razlike u sastavu i relativnoj učestalosti fitoplanktonskih zajednica među postajama RV001, RV004 terenskog uzorkovanja LTRV i postaje SJ108 terenskog uzorkovanja PO uzorkovanim crpcima na dubinama od 5 i 20 m na temelju Bray-Curtis udaljenosti. Elipse prikazuju utjecaj postaja (a) te sezonalnosti (b) na sastav fitoplanktonske zajednice (lijevo)

3.5.2 Sastav fitoplanktonskih zajednica na postajama uzorkovanih fitoplanktonskom mrežom

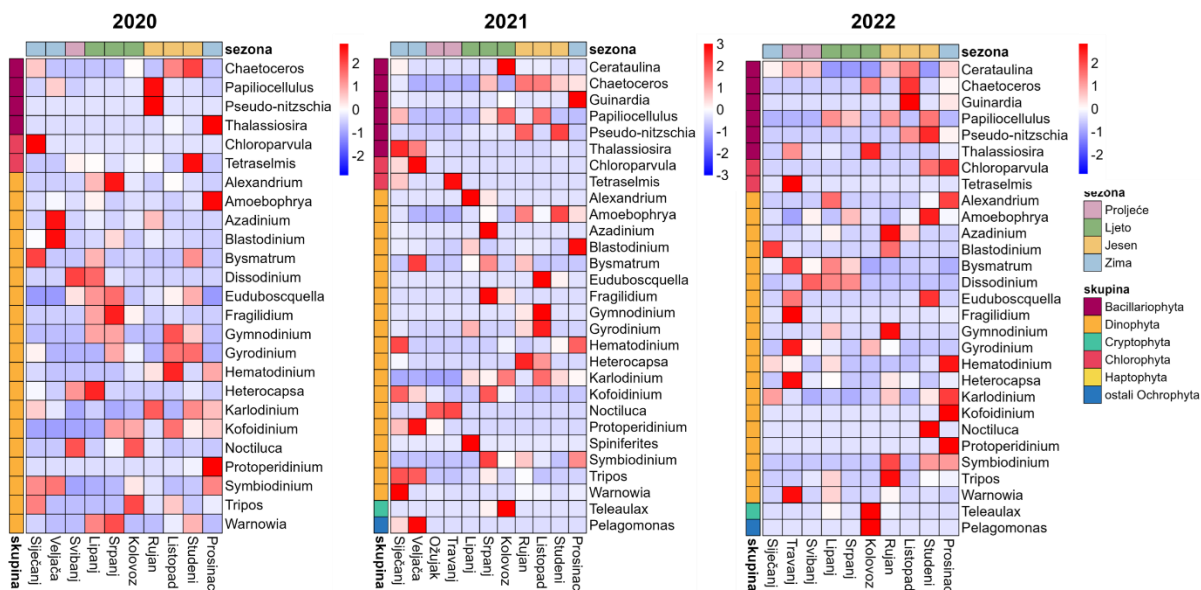
U skupu podataka dobivenog mjesečnim uzorkovanjem fitoplanktonskom mrežom kroz tri godine na dvije postaje LTRV, najveću relativnu učestalost pokazana je kod skupine Dinophyta (68,46%) i Bacillariophyta (24,83%), dok su ostale skupine bile zastupnjene u relativno malim udjelom (<

4%). Dinophyta su u najvećem udjelu bili prisutni tijekom ožujka i travnja 2021. gdje čine više od 99% ukupnog broja fitoplanktonskih sekvenci, kod je najmanji udio zabilježen tijekom kolovoza 2022. Najveću učestalost pokazao je rod *Noctiluca*, koji iako rijetko prisutan, tijekom proljeća 2021. pokazao je izrazitu dominaciju i udjelom više od 95% fitoplanktonskih sekvenci tih uzoraka. Također, rod *Dissodinium* javlja se u značajnoj učestalosti tijekom proljetnih mjeseci 2020. i 2022., dok je *Karlodinium* izražen u veći perioda, isključujući proljeće. Izražena prisutnost sekvenci Bacillariophyta primjetna je u jesenskim i zimskim mjesecima, posebice tijekom 2021. i 2022. U kolovozu i listopadu 2022. zabilježene su najveće učestalosti (93,72% i 81,27% ukupnih sekvenci tih uzoraka), dok tijekom proljeća i ljeta zabilježene u vrlo niskim udjelima (< 2%). Najčešći predstavnik je rod *Chaetoceros*, koji se u većoj brojnosti javlja tijekom jeseni, a kolovozu 2022., činio je više od 90% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci ([Slika 3.35](#), [Slika 3.36](#)).



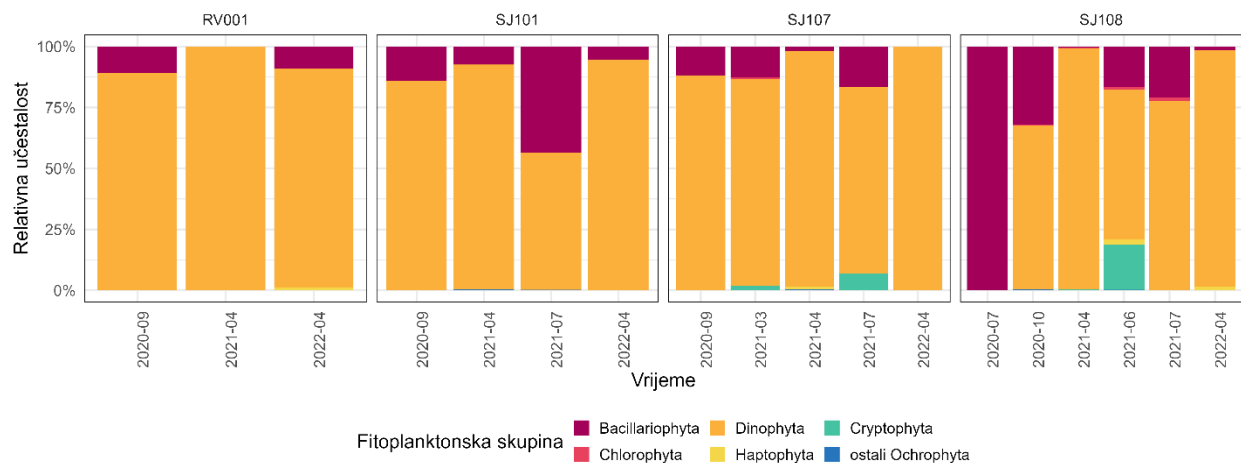
Slika 3.35 Dinamika raznolikosti i relativne učestalosti fitoplanktonskih skupina, kombinirano na postajama RV001 i RV004, mjesečnog terenskog uzorkovanja LTRV kroz vremenski period od tri godine

Chlorophyta su najveću pojavnost bilježile tijekom ožujka 2020. i kasne jeseni 2022. (~10%, rod *Tetraselmis*), dok u trećini uzoraka uopće nisu bili prisutni. Haptophyta također nisu uočeni u polovici uzoraka, uključujući proljeće 2021., dok je njihova najveća učestalost (~4%, rod *Phaeocystis*) detektirana tijekom ožujka 2020. i travnja 2022. Cryptophyta pokazuju veću učestalost tijekom ožujka 2020. kada su činili 20,99% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci koje su pripadale rodu *Teleaulax*, dok u većini drugih razdoblja uopće nisu detektirani. Ostali Ochrophyta u većini uzoraka ili nisu detektirani, ili su detektirani u vrlo niskim udjelima.



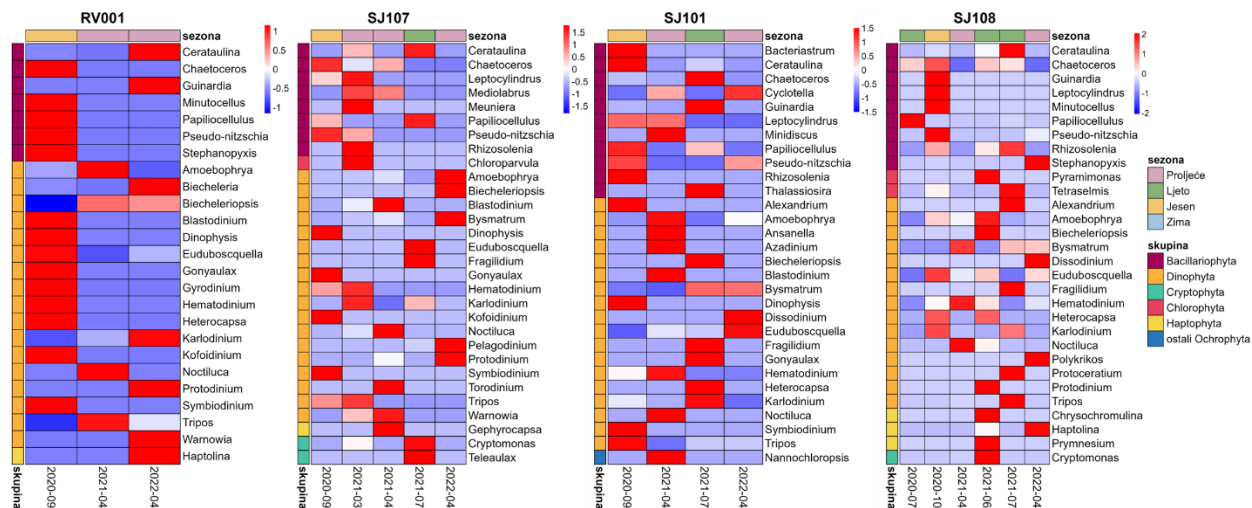
Slika 3.36 Raznolikost i brojnost zabilježenih rodova fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana uzorkovano fitoplanktonskom mrežom, kombinirano na obje postaje (RV001 i RV004), terenskog uzorkovanja LTRV mjesečnim uzorkovanjima kroz tri godine. Prikazano je 50 najučestalijih rodova fitoplanktonske zajednice grupiranih prema pripadnosti fitoplanktonskoj skupini, naznačenoj okomito uz prikaz roda. Pripadnost određenoj sezoni s obzirom na vrijeme uzorkovanja naznačeni su vodoravno od prikaza.

Uzorkovanjem transektu PO, također je uočena dominacija dinoflagelata (66,81%), koji tijekom travnja na svim postajama čine gotovo cijelu detektiranu fitoplanktonsku zajednicu. Gotovo polovica sekvenci dinoflagelata pripala je rodu *Karlodinium* koji je prisutan za sva promatrana razdoblja, te već spomenuti rod *Noctiluca* dominantan u travnju. Dijatomeje su činile 31,80% fitoplanktonskih sekvenci, najviše tijekom srpnja 2020. na postaji SJ108 kada rodovi *Papiliocellulus* (85,37%) i *Chaetoceros* (14,63%) čine ukupnu detektiranu fitoplanktonsku zajednicu ([Slika 3.37](#), [Slika 3.38](#)).



Slika 3.37 Dinamika raznolikosti i relativne učestalosti fitoplanktonskih skupina, na postajama RV001, SJ107, SJ101 i SJ108 terenskog uzorkovanja PO

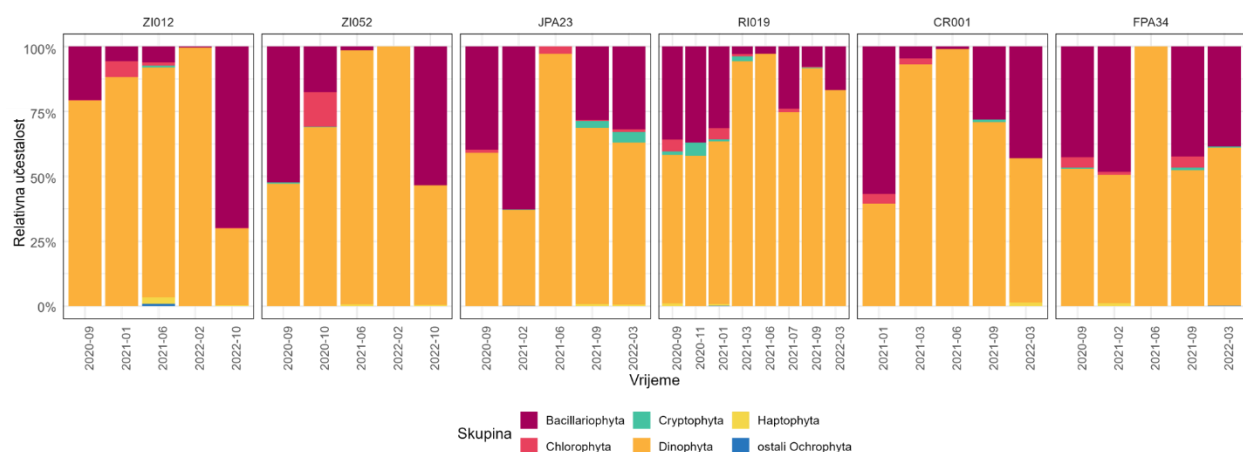
Cryptophyta, iako većinom nedetektirani, ili detektirani u vrlo niskoj učestalosti, pokazuju pojavu roda *Teleaulax* na postaji SJ108 u lipnju 2021. (18,54%) te na postaji SJ107 u srpnju iste godine. Kod ostalih skupina detekcija je u vrlo malim udjelima ili u potpunosti izostaje (Slika 3.37).



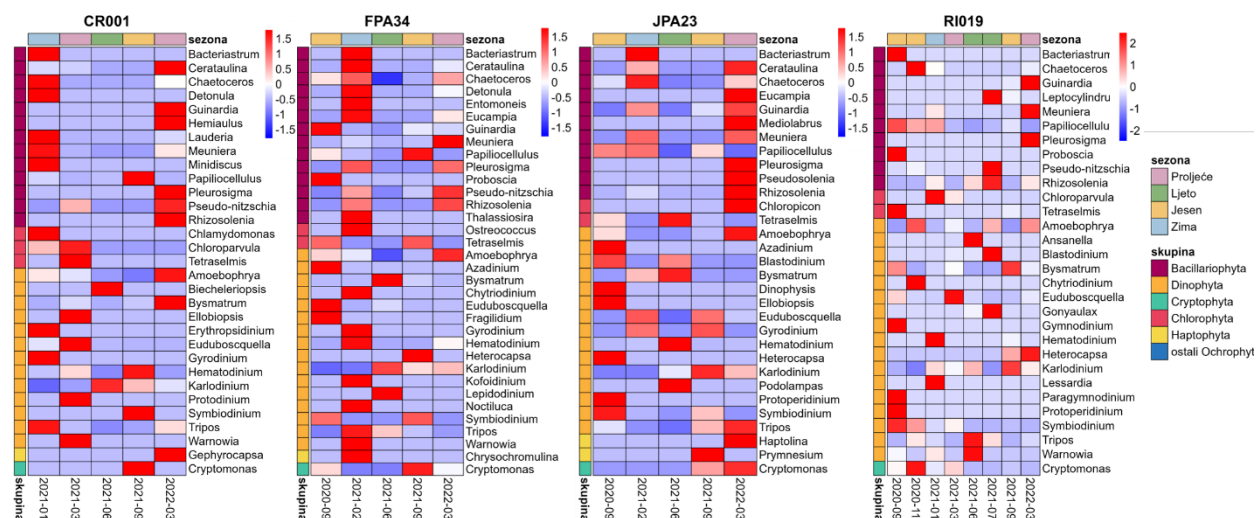
Slika 3.38 Raznolikost i brojnost zabilježenih rodova fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana uzorkovano fitoplanktonskom mrežom, na postajama terenskog uzorkovanja PO (RV001, SJ107, SJ101, SJ108). Prikazano je 50 najučestalijih rodova fitoplanktonske zajednice grupiranih prema pripadnosti fitoplanktonskoj skupini, naznačenoj okomito uz prikaz roda. Pripadnost određenoj sezoni s obzirom na vrijeme uzorkovanja naznačeni su vodoravno od prikaza.

Na svim postajama terenskih uzorkovanja Kvarner i Zapadna Istra također je uočena dominacija dinoglagelata (67,86%), posebice u ljetnom razdoblju kada čine gotovo cjelokupni sastav fitoplanktonske zajednice (Slika 3.39). Ponovo, dominantno je prisutan rod *Karlodinium* u većini

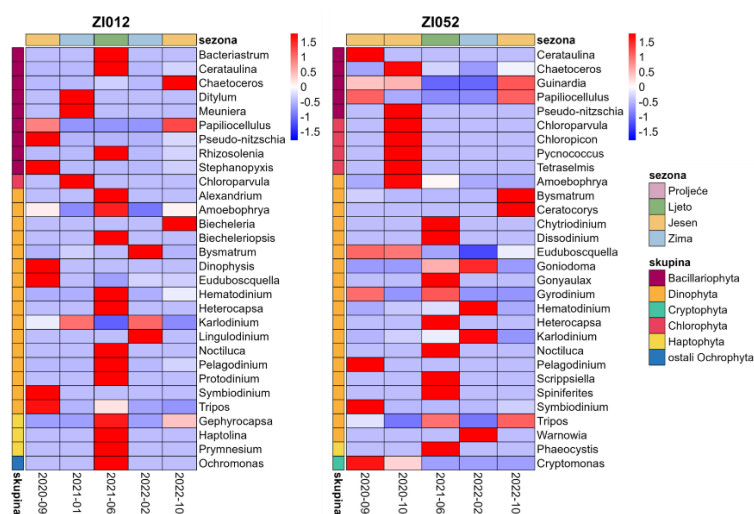
uzoraka ([Slika 3.40](#), [Slika 3.41](#)). Od ostalih ističu se *Symbiodinium* i *Bysmatrium* te heterotrofni *Euduboscquella* i *Amoebophrya*. Bacillariophyta su zastupljene s 29,34% fitoplanktonskih sekvenci, s povišenom učestalošću tijekom jesenskih i zimskih mjeseci na svim istraživačkim postajama, s iznimkom veljače, 2022. kada je na postajama Zapadne istre, ZI012 i ZI052 bila izuzetna dominacija dinoflagelatskog roda *Karlodinium*. Dominantni dijatomejski rodovi na istraživanim postajama bili su *Papiliocellulus* i *Chaetoceros*, dok su se povremeno u nešto višoj brojnosti pojavljivali i *Cerataulina*, *Guinardia* i *Meuniera*. Od ostalih skupina, jedino je rod *Chloroparvula* iz skupine Chlorophyta zabilježen u nešto većoj brojnosti (5-7%) tijekom jeseni 2020. i zime 2021. na postajama zapadne obale Istre, ZI012 i ZI52 ([Slika 3.39](#), [Slika 3.41](#)).



Slika 3.39 Dinamika raznolikosti i relativne učestalosti fitoplanktonskih skupina, na postajama ZI012 i ZI052 terenskog uzorkovanja Zapadna Istra te postaja JPA23, PI019, CR001 i FPA34 terenskog uzorkovanja Kvarner

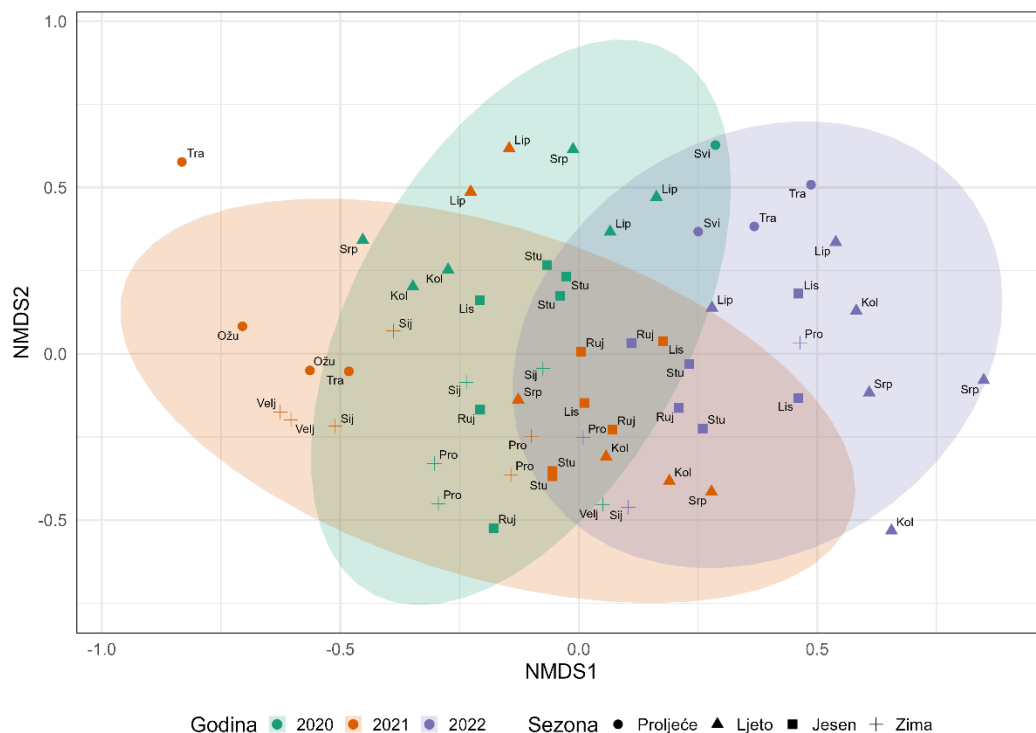


Slika 3.40 Raznolikost i brojnost zabilježenih rodova fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana uzorkovano fitoplanktonskom mrežom, na postajama CR001, FPA34, JPA23, RI019 terenskog uzorkovanja Kvarner. Prikazano je 30 najučestalijih rodova fitoplanktonske zajednice grupiranih prema pripadnosti fitoplanktonskoj skupini, naznačenoj okomito uz prikaz roda. Pripadnost određenoj sezoni s obzirom na vrijeme uzorkovanja naznačeni su vodoravno od prikaza.



Slika 3.41 Raznolikost i brojnost zabilježenih rodova fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana uzorkovano fitoplanktonskom mrežom, na postajama ZI012 i ZI052 terenskog uzorkovanja Zapadna Istra. Prikazano je 30 najučestalijih rodova fitoplanktonske zajednice grupiranih prema pripadnosti fitoplanktonskoj skupini, naznačenoj okomito uz prikaz roda. Pripadnost određenoj sezoni s obzirom na vrijeme uzorkovanja naznačeni su vodoravno od prikaza.

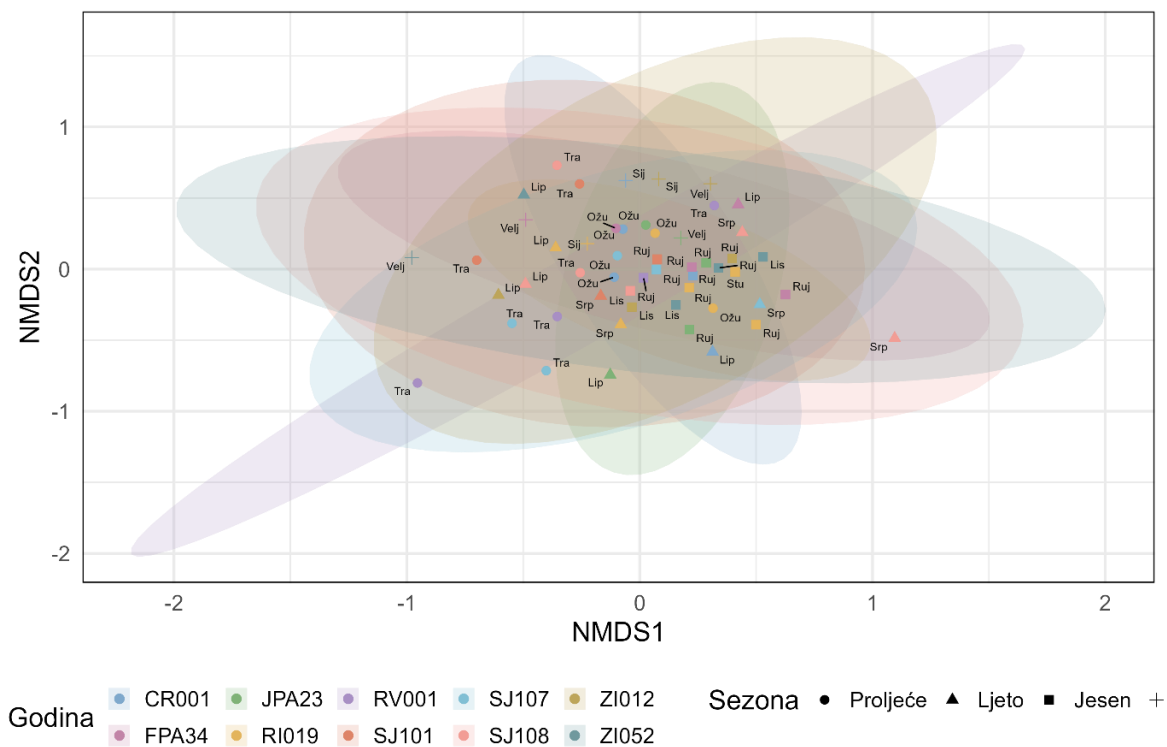
Analiza varijacije zajednica fitoplanktona iz uzoraka fitoplanktonske mreže provedena metodom permutacijske multivarijatne analize varijance (PERMANOVA) na postajma šireg područja sjevernog Jadrana pokazala je da su sezonski čimbenici značajno utjecali na strukturu zajednice (Slika 3.42).



Slika 3.42 Prikaz promjena u strukturi fitoplanktonskih zajednica kroz tri godine na postajama terenskog uzorkovanja LTRV uzorkovanim fitoplanktonskom mrežom na temelju Bray-Curtis udaljenosti. Svaka elipsa prikazuje sličnosti u strukturi zajednice za pojedinu godinu

Najveći doprinos objašnjenjanoj varijanci imalo je mjesec, odnosno sezona uzorkovanja ($R^2 = 0,193$, $p = 0,001$), što ukazuje na snažnu sezonsku sukcesiju fitoplanktonskih zajednica. Također, godine uzorkovanja imale su značajan utjecaj ($R^2 = 0,053$, $p = 0,001$), čime je potvrđena među-godišnja promjenjivost u sastavu zajednica. Lokacija uzorkovanja (postaja) imala nešto slabiji, ali i dalje značajan utjecaj ($R^2 = 0,092$, $p = 0,037$), između pojedinih postaja (Slika 3.43). Usporedbom rezultata s različitim postaja sjevernog Jadrana (PERMANOVA), uočene su slabije statistički značajne razlike ($R^2 = 0,092$, $p = 0,037$), dok je Turkey testom pokazano da postoje slabije, ali statistički značajne razlike između parova postaja terenskog uzorkovanja LTRV i postaja južnijeg djela sjevernog Jadrana, RI019-RV001 ($p = 0,018$), RI019-RV004 ($p = 0,006$), JPA23-RV001 ($p = 0,047$) i JPA23-RV004 ($p = 0,02$) te postaja terenskog uzorkovanja LTRV te najsjevernije postaje postaja ZI012-RV004 ($p = 0,045$). Navedene postaje kvarnerskog dijela sjevernog Jadrana, zajedno s postajama CR001 i FPA34i postajom ZI012 pokazale su najveću razliku u odnosu na druge postaje koje se nalaze na području zapadne obale Istre, ali te razlike nisu statistički značajne ($p > 0,05$). Dodatna analiza homogenosti multivarijatne disperzije (betadisper) otkrila je značajne

razlike u unutargrupnoj varijanci između postaja ($F = 2,23$, $p = 0,021$) što upućuje na to da se varijabilnost zajednica unutar pojedinih postaja razlikuje, što može utjecati na interpretaciju PERMANOVA rezultata ([Prilog 27](#)).



Slika 3.43 Prikaz promjena u strukturi fitoplanktonskih zajednica na postajama terenskog uzorkovanja PO (RV001, SJ107, SJ101, SJ108), terenskog uzorkovanja Zapadna Istra (ZI012 i ZI052) te terenskog uzorkovanja Kvarner (JPA23, FPA34, RI019, CR001) uzorkovanim fitoplanktonskom mrežom na temelju Bray-Curtis udaljenosti. Svaka elipsa prikazuje sličnosti u strukturi zajednice za pojedinu postaju

3.6 Detekcija ekološki značajnih taksona u skupu podataka metabarkodiranja sjevernog Jadrana

3.6.1. Štetni i toksični fitoplanktonski taksoni

Rezultati metabarkodiranja na području sjevernog Jadrana uspoređeni su popisom toksičnih (T) i štetnih, ali ne toksičnih (H) vrsta (zajedničkim imenom HAB, od engl. *Harmful algal blooms*) UNESCO IOC HAB Programme (<https://hab.ioc-unesco.org/>). Od ukupno 627 detektiranih fitoplanktonskih taksona kroz šest fitoplanktonskih skupina, štetni ili potencijalno toksični taksoni zabilježeni su kroz četiri fitoplanktonske skupine (Dinophyta, ostali Ochrophyta, Bacillariophyta, Haptophyta i Chlorophyta). Ukupno je u setu podataka detektirano 59 štetnih/potencijalno toksičnih fitoplanktonskih taksona raspoređenih u 38 fitoplanktonskih rodova ([Prilog 28](#)), od kojih je tri taksonomski klasificirano na razini roda, dok je preostalih 56 klasificirano na razini vrste. Prema UNESCO IOC HAB, 21 takson karakteriziran je kao štetan, ali ne toksičan, dok preostalih 38 ima status toksični. Sekvence koje predstavljaju toksične i štetne takosne čine 13,29% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci, 8,71% pripada toksičnim taksonima, a 4,58% štetnim. U korištenom setu podataka ukupno je 370 447 sekvenci klasificirano kao HAB sekvence: 64,66% kao toksične i 35,34% kao štetne, ali ne toksične.

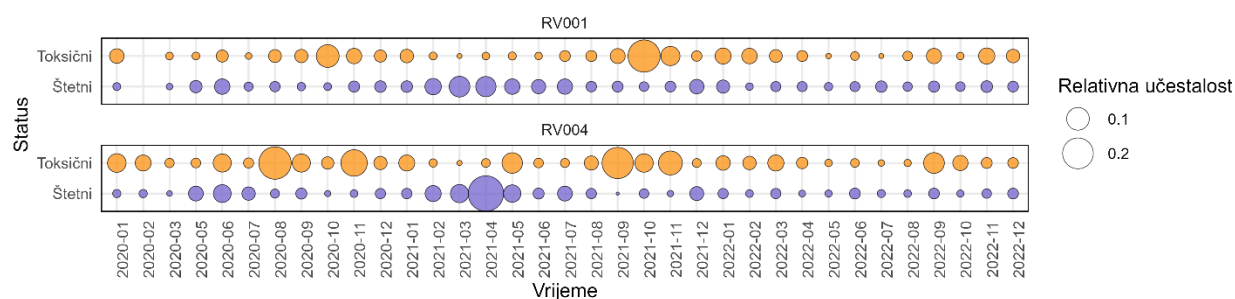
Detektirani toksični taksoni pripadaju skupini dinoflagelata, ostalim Ochrophyta, Haptophyta i dijatomejama, dok su fitoplanktonske skupine predstavljene sa štetnim, ali ne toksičnim predstavnicima dinoflagelati, dijatomeje, Chlorophyta i ostali Ochrophyta. Od predstavnika toksičnih taksona, dinoflagelat *Karlodinium veneticum* (T) pokazao je najveću relativnu učestalost u istraživanom setu podataka u kojem čini 53,25% ukupnih HAB sekvenci te 82,36% sekvenci svih toksičnih taksona. Prema relativnoj učestalosti u broju sekvenci slijede *Vicicitus globosus* (T) i *Dinophysis acuminata* (T) koji čine 5,09% i 4,66% ukupnih sekvenci toksičnih taksona. Ostali taksoni zastupljeni s manjom relativnom učestalošću (< 2%).

Od štetnih, ali ne toksičnih fitoplanktonskih pripadnika, najveću relativnu učestalost pokazuje dinoflagelat *Noctiluca scintillans* (H) koja je klasificirana za 33 625 sekvenci, odnosno 9,07% ukupnih HAB sekvenci te 27,92% sekvenci koje pripadaju štetnim, ali ne toksičnim pripadnicima. Od ostalih štetnih, ali ne toksičnih s najvišim relativnim učestalostima izdvajaju se *Tetraselmis* (H) (16,34%), *Chaetoceros tenuissimus* (H) (12,09%), *Lepidodinium chlorophorum* (H) (10,69%),

Cerataulina pelagica (H) (8,85%), *Aureococcus anophagefferens* (H) (8,69%), *Tripos fusus* (H) (6,79%) i *T. furca* (H) (6,23%). Ostali štetni, ali ne toksični prisutni su u manjoj učestalosti (< 1%).

3.6.1.1 Štetni i toksični fitoplanktonski taksoni s terenskog uzorkovanja LTRV

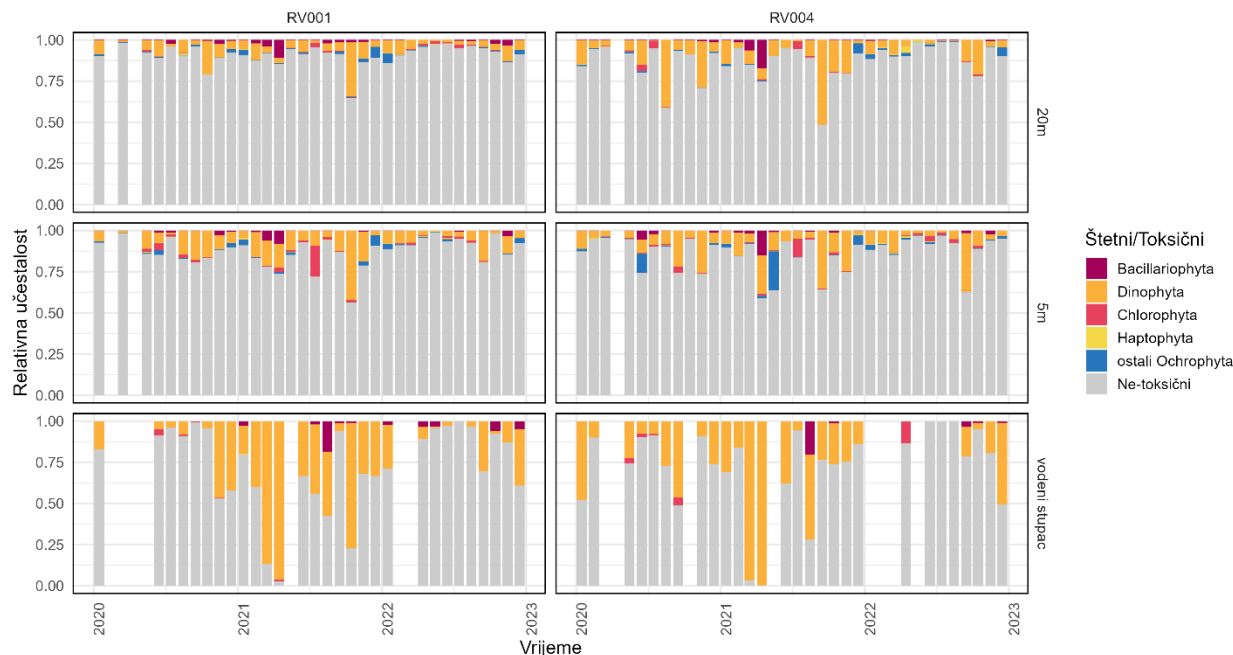
Relativna abundancija HAB taksona ukazuje na sezonalne varijacije na posjama RV001 i RV004 (Slika 3.44). Toksični taksoni u prosjeku najučestaliji su u jesen (15,64%), dok su štetni najučestaliji u proljeće (11,84% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci). U prosjeku, ljeti je detektirana najniža relativna učestalost HAB taksona kada su činili ukupno 8,07% relativne učestalosti zajednice. Također, značajne razlike u relativnoj učestalosti zabilježene su i među godinama: 2022. karakterizirala je niža relativna učestalost HAB taksona (6,99%) u odnosu na 2020. (13,12%), a posebice u odnosu na 2021. (17,28%) (Slika 3.44). Najveće relativne učestalosti HAB taksona na postajama LTRV zabilježene su u travnju 2021. s ukupnom relativnom učešćalošću od 34,96% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci od čega je *N. scintillans* (H) činila 17,49%, a *Chaetoceros tenuissimus* (H) 9,31% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci tog uzorkovanja (Slika 3.44, Slika 3.45, Slika 3.46 i Slika 3.47). Najmanja relativna učestalost HAB taksona zabilježena je tijekom ožujka 2020., kada su činili 2,51% fitoplanktonske zajednice. Također, na postaji RV004 u prosjeku je detektirana viša relativna učestalost HAB taksona (13,44%) u odnosu na postaju RV001 (10,36%).



Slika 3.44 Ukupna relativna učestalost štetnih i toksičnih taksona na postajama RV001 i RV004 terenskog uzorkovanja LTRV mjesečno kroz vrijeme od tri godine

Na terenskom uzorkovanju LTRV, Niskinovim crpcima na dvjema dubinama uzorkovano je 93,91%, a fitoplanktonskom mrežom 6,09% generiranih HAB sekvenci za terensko uzorkovanje LTRV, ali fitoplanktonska mreža pokazuje značajno veću HAB relativnu učestalost toksičnih (26,60%) i štetnih (13,21%) taksona u usporedbi s Niskinovim crpcem koji pokazuje manju relativnu učestalost toksičnih (7,78%) i štetnih (4,17%) (Kruskal-Wallis za štetne, $p = 0,02$, za

toksične $p < 0,001$). Na postajama terenskog uzorkovanja LTRV, kroz skoro sva uzorkovanja relativne učestalosti HAB taksona bile su više u mrežnim uzorcima u odnosu na uzorke iz crpaca. (Slika 3.45).

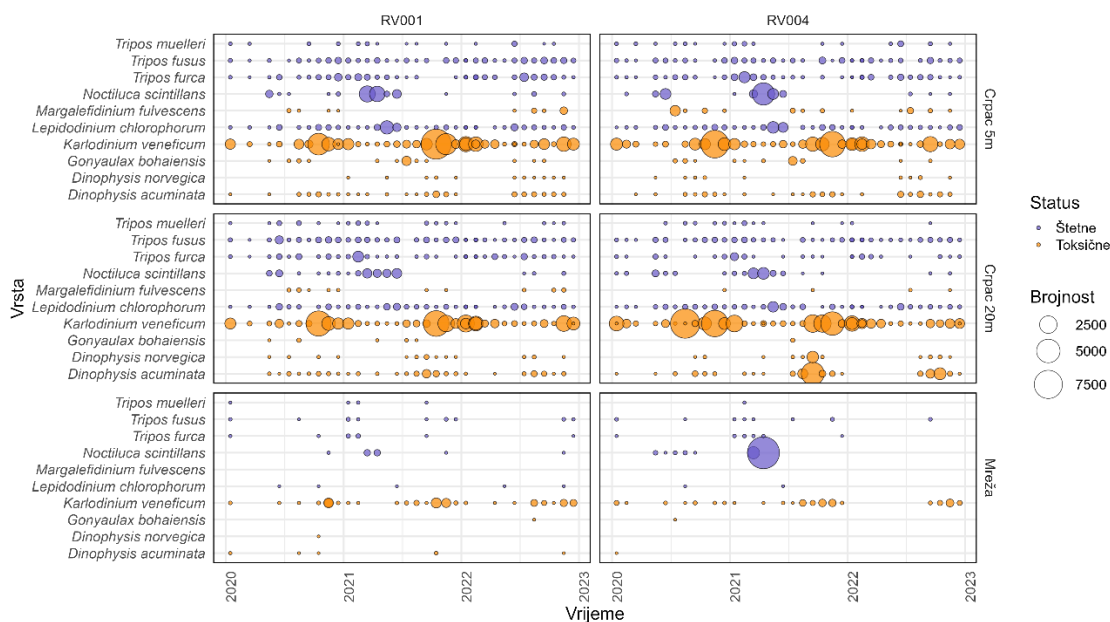


Slika 3.45 Relativna učestalost sekvenci štetnih i toksičnih vrsta u ukupnom udjelu fitoplanktonskih sekvenci kroz vrijeme od tri godine.

Dinoflagelati dominiraju ukupnim HAB sekvencama (76,74%) (Slika 3.45), posebice toksičnim (91,84%) te nešto manje, ali ipak dominantno i sekvencama štetnih, ali ne toksičnih taksona (51,53%) (Slika 3.46). Detektirano je ukupno 29 toksičnih i 10 štetnih taksona dinoflagelata. Od toksičnih dinoflagelata izdvaja se *K. veneficum* (T) koji čini više od 90% relativne učestalosti toksičnih taksona tijekom jeseni i zime te ~50% tijekom proljeća i ljeta. Relativna učestalost *K. veneficum* (T) iznosi 7,20% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci, a najvišu relativnu učestalost postiže za vrijeme kasnog ljeta i jeseni, posebice 2021. kada čini do 30% ukupnog detektiranog fitoplanktonskog sastava te do 70% fitoplanktonskog sastava mrežnih uzoraka (Slika 3.46). Od ostalih taksona koji povremeno pokazuju povišene relativne učestalosti su *D. acuminata* (T) koji tijekom kolovoza 2021. te kolovoza i listopada 2022. čini ~ 30% relativne učestalosti svih toksičnih taksona, *Margalefidinium fulvescens* (T) u srpnju 2020. (~ 50%). Također, vrste iz roda *Alexandrium* povremeno ukazuju na povišene relativne učestalosti (> 20% toksičnih taksona), *A.*

minutum (T) (proljeće 2021.), *A. pseudogonyaulax* (T) (lipanj, 2021) i *A. tamarense* (T) (srpanj, 2020.). Ostali toksični dinoflagelati javljaju se povremeno i s nižim relativnim učestalostima.

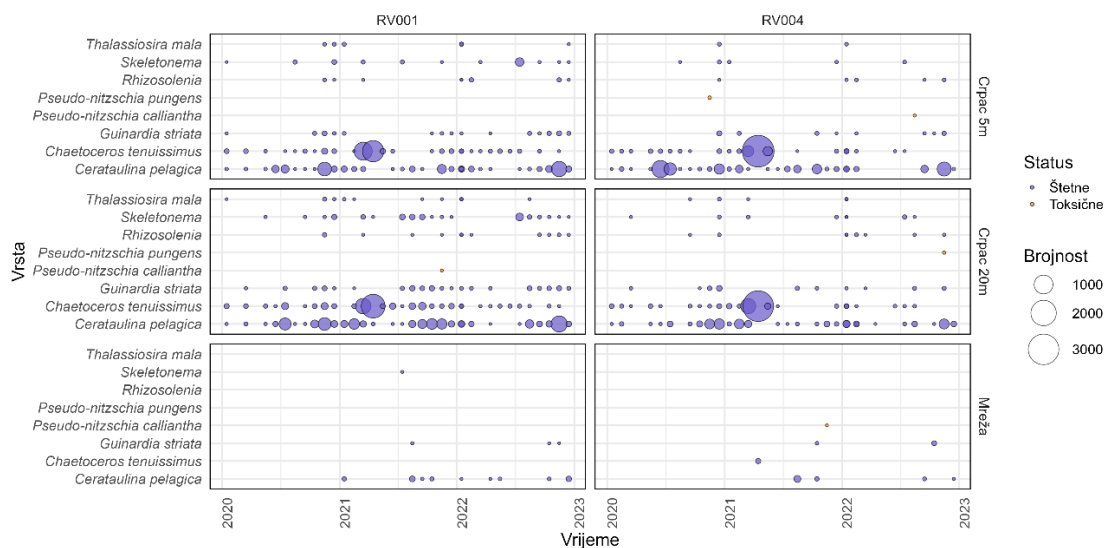
Od štetnih dinoflagelata izdvaja se *N. scintillans* (H) čije sekvence čine 52,69% ukupnih sekvenci štetnih dinoflagelata, s povišenim vrijednostima tijekom travnja 2021. kada čini >9 9% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci mrežnih uzoraka. Od ostalih štetnih dinoflagelata izdvaja se *Triplos fusus* (H) s povišenom relativnom učestalošću krajem svake od tri istraživane godine (> 50% toksičnih dinoflagelata), a najviše u prosincu 2021. kada čini 87,98% svih toksičnih dinoflagelata. Ostale vrste roda *Triplos*, *T. furca* (H) i *T. muelleri* (H) povremeno pokazuju povišene relativne učestalosti. Također, *Lepidodinium chlorophorum* (H) pokazuje povišenu relativnu učestalost tijekom ljeta i jeseni kada povremeno čini > 50% relativne učestalosti toksičnih dinoflagelata ([Slika 3.46](#)).



Slika 3.46 Dijagram relativnih učestalosti štetnih i toksičnih vrsta dinoflagelata na postajama terenskog uzorkovanja LTRV. Prikazano je deset najučestalijih vrsta dinoflagelata.

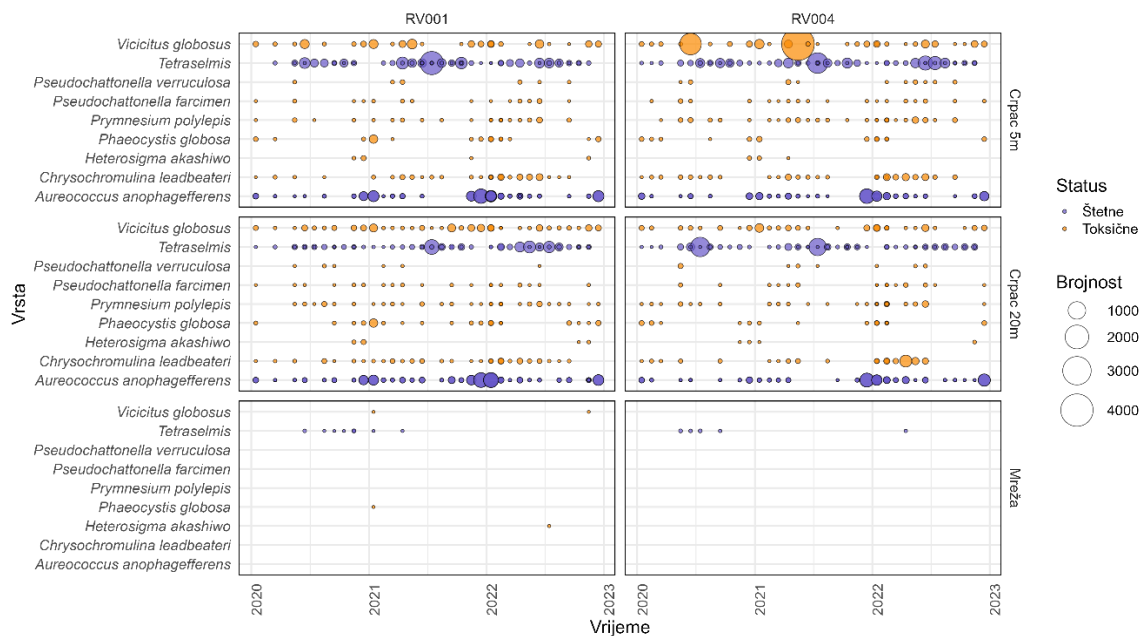
Među dijatomejama detektirano je osam štetnih taksona i dva toksična koji čine 22,31% udjela štetnih fitoplanktonskih sekvenci te 0,004% udjela toksičnih sekvenci. Od toksičnih dijatomeja prisutne su *Pseudo-nitzschia calliantha* (T) i *P. pungens* (T) prisutne isključivo tijekom jeseni. Od štetnih dijatomeja, izdvaja se *C. tenuissimus* (H) s 55,67% sekvenci štetnih dijatomeja, dominantno prisutan tijekom kasne zime i proljeća 2020. i 2021. (kada doseže izrazito velike brojnosti) te

kasnog proljeća tijekom 2022. kada čini ~ 90% ukupnih sekvenci štetnih dijatomeja. *Cerataulina pelagica* (H) doseže relativne učestalosti > 80% tijekom ljeta 2020. te jeseni svih triju istraživanih godina te čini 37,99% ukupnih sekvenci štetnih dijatomeja. Od ostalih, *Skeletonema* (H) i *Guinardia striata* (H) pokazuju povremene povišene vrijednosti relativnih učestalosti, najčešće krajem ljeta i u jesen ([Slika 3.47](#)).



Slika 3.47 Dijagram brojnosti štetnih i toksičnih dijatomejskih taksona na postajama terenskog uzorkovanja LTRV

Od preostalih skupina, izdvaja se 10 HAB taksona, tri štetna i sedam toksičnih. Rod *Tetraselmis* (H) (Chlorophyta) čini 15,34% ukupnih sekvenci štetnih fitoplanktonskih taksona uz povišenu relativnu učestalost tijekom ljeta kada dominira zajednicom šetnog fitoplanktona. *Aureococcus anophagefferens* (H) (ostali Ochrophyta) čini ukupno 7,94% zajednice šetnog fitoplanktona uz relativne učestalosti do 80% tijekom zimskih mjeseci. Od toksičnih taksona izdvaja se *Vicicitus globosus* (T) (ostali Ochrophyta) koji čini 4,72% zajednice toksičnog fitoplanktona, češće zastupljen tijekom ljeta, uz izrazitu dominaciju u svibnju 2021. kada čini 88,70% ukupnog udjela među toksičnim fitoplanktonom ([Slika 3.48](#)).

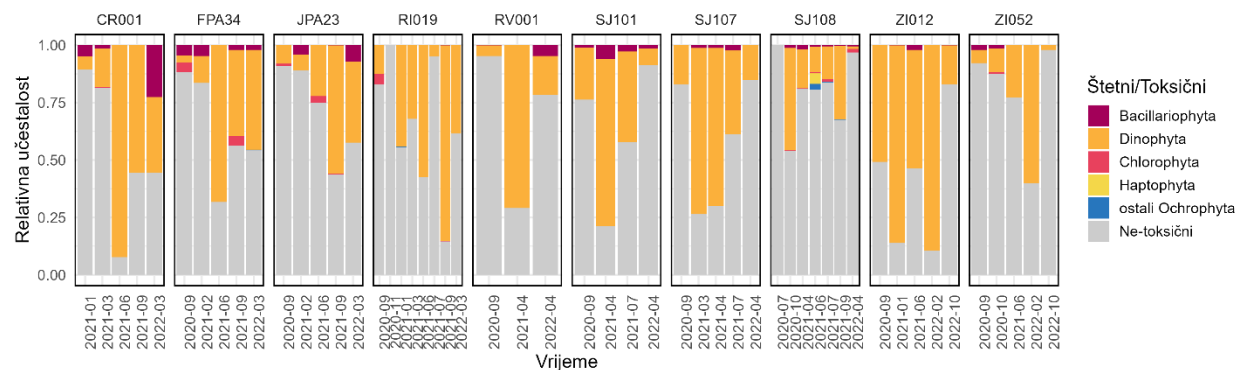


Slika 3.48 Dijagram relativnih učestalosti štetnih i toksičnih fitoplanktonskih vrsta, isključujući dijatomeje i dinoflagelate, na postajama terenskog uzorkovanja LTRV

3.6.1.2 Štetni i toksični fitoplanktonski taksoni s terenskog uzorkovanja PO, Sjeverna Istra i Kvarner

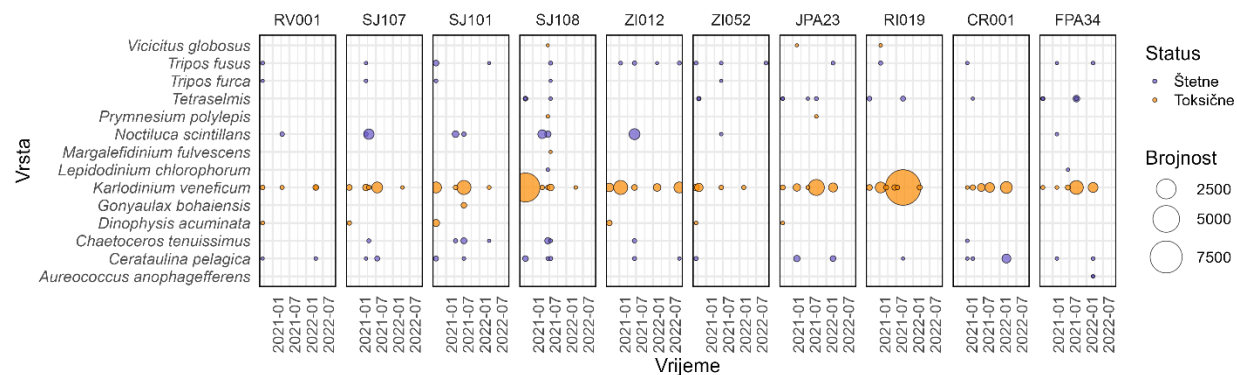
Na terenskim uzorkovanjima PO, Sjeverna Istra i Kvarner također postoji značajna razlika pri odabiru metode uzorkovanja: 29,81% fitoplanktonskih sekvenci iz mrežnog uzorka pripada HAB taksonima (Slika 3.49), u odnosu na 12,09% HAB sekvenci detektiranih u uzorcima prikupljenim Niskinovim crpcem. Ukupno je detektirano 18 štetnih taksona koji čine 34,44% ukupnih HAB sekvenci i 22 toksična taksona koji čine preostalih 65,56%.

Najveći udio toksičnih čine dinoflagelati (92,60%) koji dominiraju na svim postajama tijekom cijelog istraživanja (Slika 3.49). Na postajama FPA34, CR001 i RI019 terenskog uzorkovanja Kvarner, *K. veneticum* (T) jedini je detektirani toksični dinoflagelat za sva uzorkovanja, kao i tijekom 2021. i 2022. za postaje JPA23, postaje RV001, SJ107 i SJ101 terenskog uzorkovanja PO te postaja ZI012 i ZI052 terenskog uzorkovanja Zapadna Istra, na kojima je tijekom 2020. osim *K. veneticum* detektiran i *D. acuminata* (T) s manjom učestalošću. Od štetnih dinoflagelata, *T. fusus* (H) je najčešće, a često i jedini detektirani štetni dinoflagelat, s izuzetkom ljeta 2021. kada prevladava *N. scintillans* (Slika 3.50)



Slika 3.49 Relativna učestalost štetnih i toksičnih vrsta u ukupnom udjelu fitoplanktonskih skupina na postajama terenskog uzorkovanja Kvarner (CR001, FPA34, JPA23, RI019), PO (RV001, SJ107, SJ101, SJ108) i Zapadna Istra (ZI012 i ZI052) uzorkovanih fitoplanktonskom mrežom

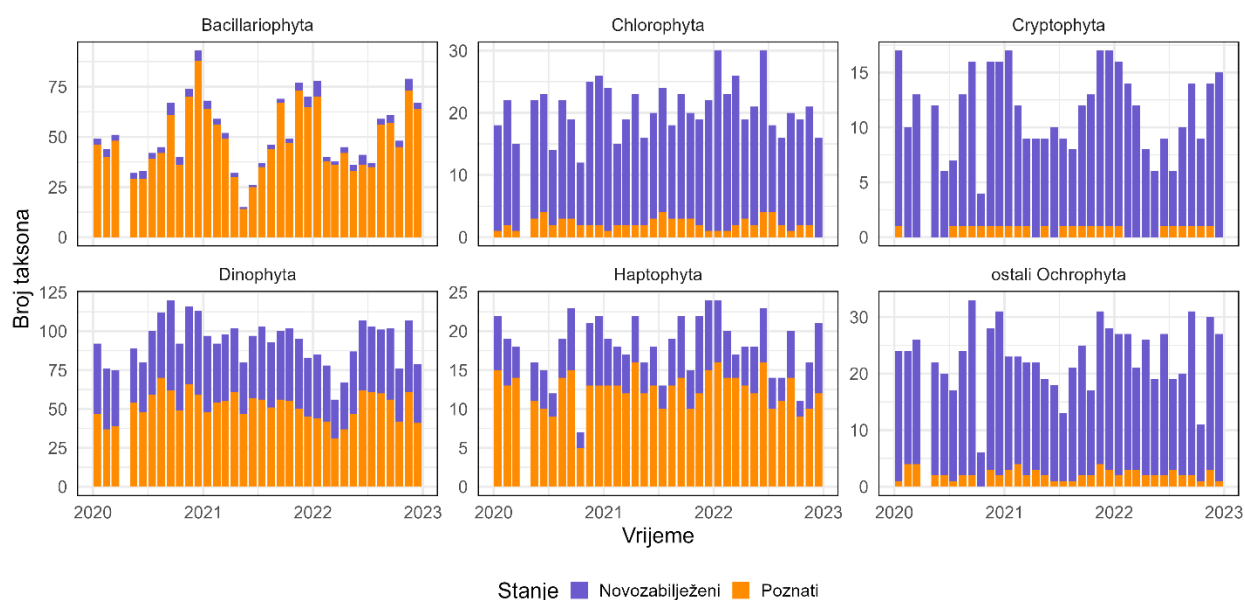
Najčešće zabilježena dijatomeja s HAB obilježjima je *C. tenuissimus* (H) koji čini 52,66% ukupnih sekvenci štetnih dijatomeja, detektiran je isključivo na postajama SJ107, SJ101, SJ108 i ZI012. *C. pelagica* (H) jedina je HAB vrsta dijatomeja koja je detektirana na svim istraživanim postajama sjevernog Jadrana. *Guinardia striata*, detektirana je kao dominantna HAB dijatomeja na postajama FPA34, RI019 i RV001, ali nije detektirana na postajama ZI012, SJ107 i SJ101 (Slika 3.50).



Slika 3.50 Dijagram relativnih učestalosti štetnih i toksičnih fitoplanktonskih skupina, na postajama terenskih uzorkovanja PO i Zapadna Istra i Kvarner, uzorkovanih fitoplanktonskom mrežom

3.6.2. Novozabilježeni taksoni

Metodom metabarkodiranja u istraživanom setu podataka zabilježeno je ukupno 606 taksona koji su taksonomski grupirani u 288 rodova, 156 porodica, 84 reda, 23 razreda i svih šest fitoplanktonskih skupina. Ukupno je u setu zabilježen 331 otprije poznati takson te 278 novih fitoplanktonskih taksona za sjeverni Jadran, odnosno 45,38% taksona ukupnog seta podataka. Ukupno je zabilježeno 176 novodetektiranih fitoplanktonskih rodova. Novozabilježeno je ukupno 165 fitoplanktonskih vrsta, dok je preostalih 113 taksona taksonomski određeno do razine roda ([Prilog 29](#), [Slika 3.51](#), [Slika 3.52](#)).



Slika 3.51 Udio poznatih i novozabilježenih taksona s obzirom na fitoplanktonsku skupinu kroz istraživani period od tri godine

Najveći broj novozabilježenih taksona pripada skupini dinoflagelata, unutar kojih je od ukupno 238 zabilježenih taksona, 99 novozabilježeno (41,66%). Na višim taksonomskim razinama u setu podataka prisutna su 62 novozabilježena roda, 21 novozabilježena porodica i četiri novozabilježena reda (Blastodinales, Ellobiopsidales, Haplozoonaales i Syndiniales). Svi novozabilježeni redovi su većinom ili u potpunosti parazitski. Najveći broj novozabilježenih taksona pripada redovima Gymnodinales (26), Peridinales (26) i Pyrenomonadales (19). Najveću novozabilježenju raznolikost unutar roda pokazuje novozabilježeni rod *Blastodinium* s 9 različitih novozabilježenih taksona ([Slika 3.52](#)). Najveću relativnu učestalost od novozabilježenih

dinoflagelata u setu podataka imaju parazitski rod *Amoebophrya* (2,4% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci u setu podataka) i toksična vrsta *Karlodinium veneficum* (1,15%).



Slika 3.52 Broj novozabilježenih taksona grupiranih u rodove, redove i fitoplanktonske skupine u metabarkodiranom setu podataka sjevernog Jadrana

Skupina Bacillariophyta pokazali su najmanji udio novozabilježenih taksona u odnosu na ostale fitoplanktonske skupine (Slika 3.51). Od 174 ukupno zabilježenih taksona, 19 je novodetektiranih (10,92%) koji su grupirani u 17 novozabilježenih dijatomejskih rodova (Slika 3.52). Na višim taksonomskim razinama, nema novozabilježenih predstavnika na razini reda, dok su tri novodetektirane porodice Sellaphoraceae, Staurosiraceae i Stephanopyxidaceae. Najveću

relativnu učestalost među novozabilježenim dijatomejskim taksonima imaju vrste *Stephanopyxis turris* i *Papiliocellulus elegans* koji čine 0,39% i 0,36% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci unutar skupa podataka.

Za skupinu Cryptophyta karakterističan je najveći udio novozabilježenih taksona. Na temelju rezultata metabarkodiranja zabilježeno je 20 novih taksona, dok je iz dugoročnih setova temeljenih na mikroskopiji detektiran samo rod *Cryptomonas*. Novozabilježeni predstavnici skupine Cryptophyta grupirani su u 11 rodova, 4 porodice te redove Cryptomonadales i novozabilježeni Pyrenomonadales ([Slika 3.52](#)). Najveću relativnu učestalost među novozabilježenim rodovima skupine Cryptophyta ima rod *Teleaulax* s četiri novozabilježena taksona koji zajedno čine 9,59% ukupnih sekvenci novozabilježenih taksona.

Skupinu Haptophyta predstavlja ukupno 36 taksona, od kojih je 16 novozabilježenih koji su grupirani u 10 rodova ([Slika 3.52](#)), pet porodica i četiri reda, od kojih red Pavlovaes (Pavlovophyceae) nemaju od ranije zabilježenih predstavnika za sjeverni Jadran. Iako su svi novozabilježeni Cryptophyta prisutni su s relativno niskom učestalošću, izdvaja se rod *Prymnesium* kojeg čini pet zabilježenih taksona koji zajedno čine 1,3% ukupne zastupljenosti sekvenci novozabilježenih taksona.

Raznolikost skupine Chlorophyta opisana je s 73 novozabilježena taksona (90,12%). Od osam razreda skupine Chlorophyta koliko ih je detektirano u setu podataka, pet su novozabilježeni: Chloropicophyceae, Mamiellophyceae, Nephroselmidophyceae, Pedinophyceae, Prasinophyceae i Trebouxiophyceae ([Slika 3.52](#)). Detektirano je ukupno 47 novih rodova za sjeverni Jadran, od kojih *Pyramimonas* pokazuje najveću raznolikost unutar roda sa šest detektiranih taksona, dok *Bathycoccus prasinos* pokazuje najvišu relativnu učestalost (5,69% ukupnih sekvenci novozabilježenih taksona).

Svi detektirani taksoni ostalih Ochrophyta iz razreda Chlorodendrophyceae (*Tetraselmis*) i Raphidophyceae (*Heterosigma akashiwo*), od prije su poznati u sjevernom Jadranu. Također, od ostalih Ochrophyta, od ranije detektirani razredi uključuju Dictyochophyceae (*Dictyocha*), Chrysophyceae (*Dinobryon*), ali svi predstavnici preostalih redova poput Bolidophyceae, Chrysomerophyceae, Pelagophyceae, Pinguiphyceae i Synurophyceae nisu zabilježeni ranije. Ukupno je zabilježeno 49 novih taksona ostalih Ochrophyta (89,09%), od kojih rod *Paraphysomonas* pokazuje najveću raznolikost unutar roda sa šest detektiranih taksona ([Slika](#)

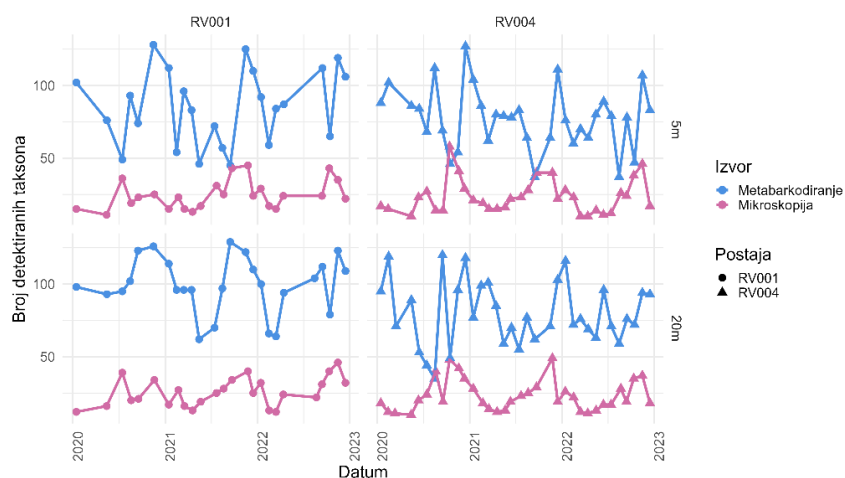
[3.52](#)), dok *Aureococcus anophagefferens*, *Florenciella* spp., *Pelagomonas calceolata* i *Vicicitus globosus* pokazuju najvišu relativnu učestalost (> 1%).

3.7 Usporedba s rezultatima aktivnog programa sustavnog praćenja

Za ovu usporedbu korišten je set podataka mjesečnog uzorkovanja LTRV s dvije postaje (RV001 i RV004) te dvije dubine, potpovršinski sloj (5 m) i dublji sloj (20 m). Sastav fitoplanktonskih zajednica određen je metabarkodiranjem i svjetlosnom mikroskopijom. Opis bioloških zajednica fitoplanktona podrazumijeva: (a) abundanciju fitoplanktonske zajednice, (b) sastav vrsta, (c) omjer brojnosti dijatomeja i dinoflagelata, (d) pregled stranih i potencijalno toksičnih vrsta te (e) izračun Multiparametrijskog indeksa.

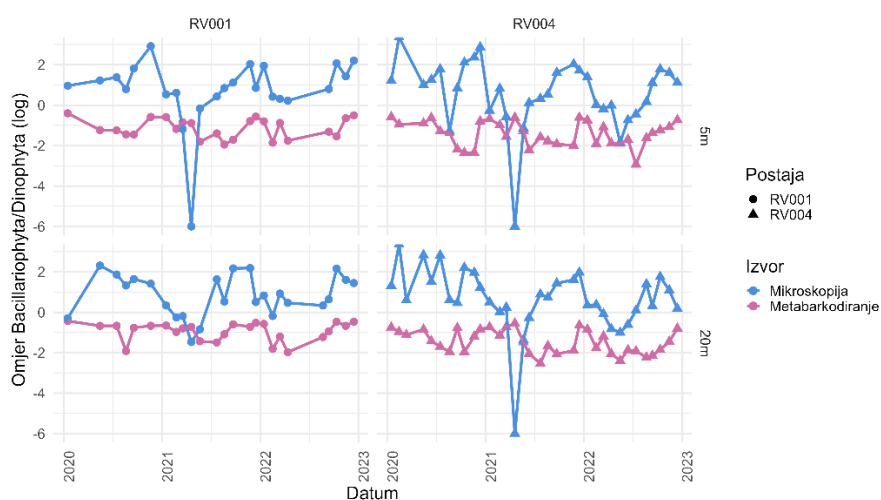
(a) *Abundancija fitoplanktonske zajednice.* Abundancija fitoplanktonske zajednice u obliku broja fitoplanktonskih stanica po litri nije mogla biti izračunata.

(b) *Sastav vrsta.* Usporedbom rezultata metabarkodiranja i svjetlosne mikroskopije za uzorke prikupljene na postajama RV001 i RV004 terenskog uzorkovanja LTRV uočen je veći broj detektiranih taksona u slučaju rezultata dobivenih metabarkodiranjem, u odnosu na mikroskopiju ([Slika 3.53](#)). Prosječan broj taksona detektiranih metabarkodiranjem po uzorku iznosi $92,37 (\pm 23,56)$ za postaju RV001 te $78,49 (\pm 21,59)$ za postaju RV004, dok je mikroskopijom detektirano prosječno $25,04 (\pm 9,77)$ taksona na postaji RV001, odnosno $23,15 (\pm 11,15)$ taksona na postaji RV004. Metabarkodiranjem je zabilježeno prosječno 3,55 puta više taksona po uzorku u usporedbi s mikroskopskim analizama. U svim uzorcima metabarkodiranjem je detektiran veći broj taksona osim u kolovozu 2020.



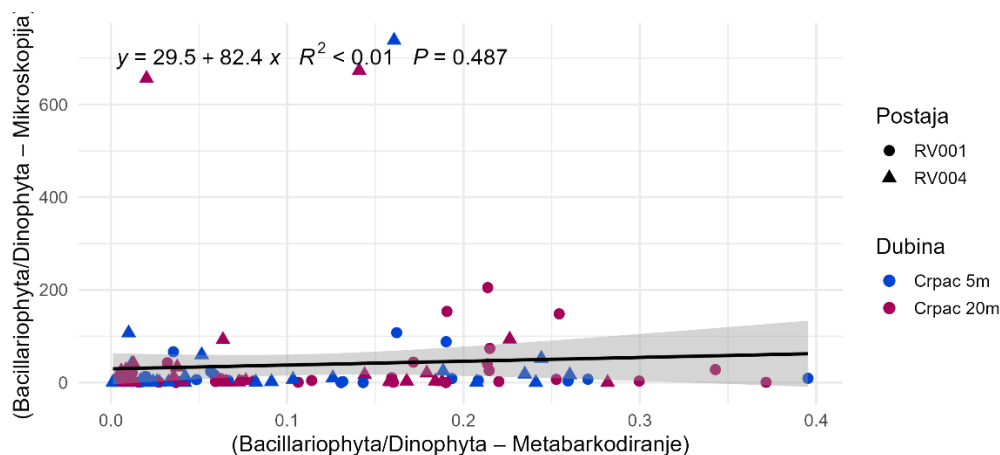
Slika 3.53 Odnos broja detektiranih taksona po uzorku na temelju rezultatam metabarkodiranja i mikroskopije

(c) *Omjer brojnosti dijatomeja i dinoflagelata.* Brojnosti dobivene metabarkodiranjem odnose se na broj taksonomski određenih sekvenci za pojedini takson, dok se brojnost dobivena mikroskopiranjem odnosi na broj stanica po litri morske vode. Omjer brojnosti dijatomeja i dinoflagelata u uzorcima dobiven metabarkodiranjem značajno je niži u odnosu na omjer brojnosti dijatomeja i dinoflagelata dobivenog mikroskopijom. Omjer Bacillariophyta/Dinophyta u rezultatima temeljenih na mikroskopiji kretao se od nula do beskonačno, sa srednjom vrijednošću $53,32 \pm 131,61$, dok se omjer na temelju rezultata metabarkodiranja kretao od 0,0012 do 0,39, sa srednjom vrijednošću $0,10 \pm 0,095$ ([Slika 3.54](#)).



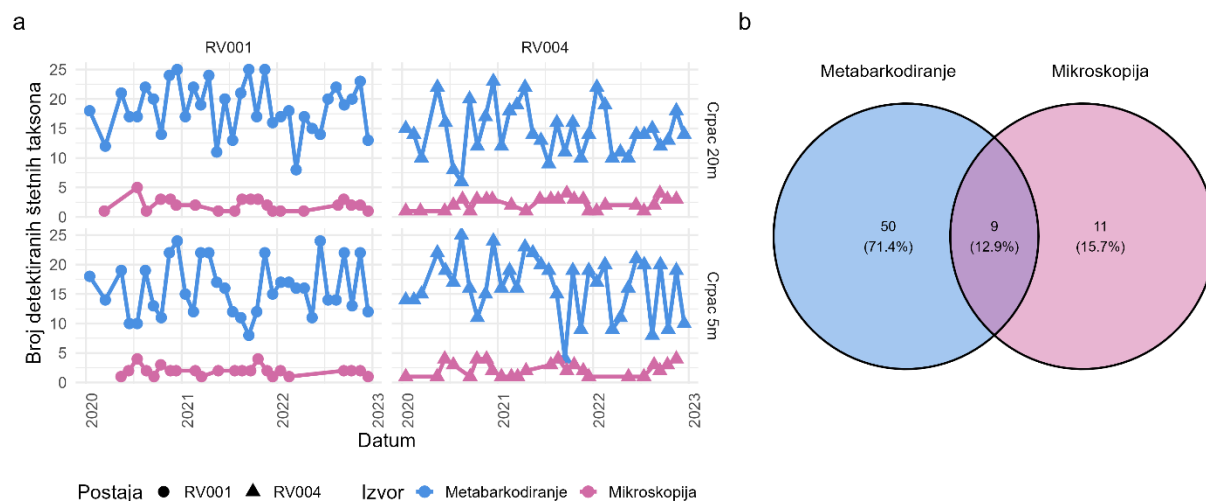
Slika 3.54 Omjer učestalosti dijatomeja i dinoflagelata na postajama LTRV kroz tri godine i dvije dubine uzorkovanja

Korelacija između omjera Bacillariophyta i Dinophyta dobivenog metabarkodiranjem i mikroskopijom nije pokazala statistički značajnu povezanost. Pearsonov koeficijent korelacije iznosio je $R = 0,068$, $p = 0,487$, što ukazuje na odsustvo značajne linearne povezanosti između dviju metoda ([Slika 3.55](#)).



Slika 3.55 Odnos omjera *Bacillariophyta/Dinophyta* dobivenog metabarkodiranjem i mikroskopijom s prikazom linearne regresije i korelacije na temelju Pearson koeficijenta

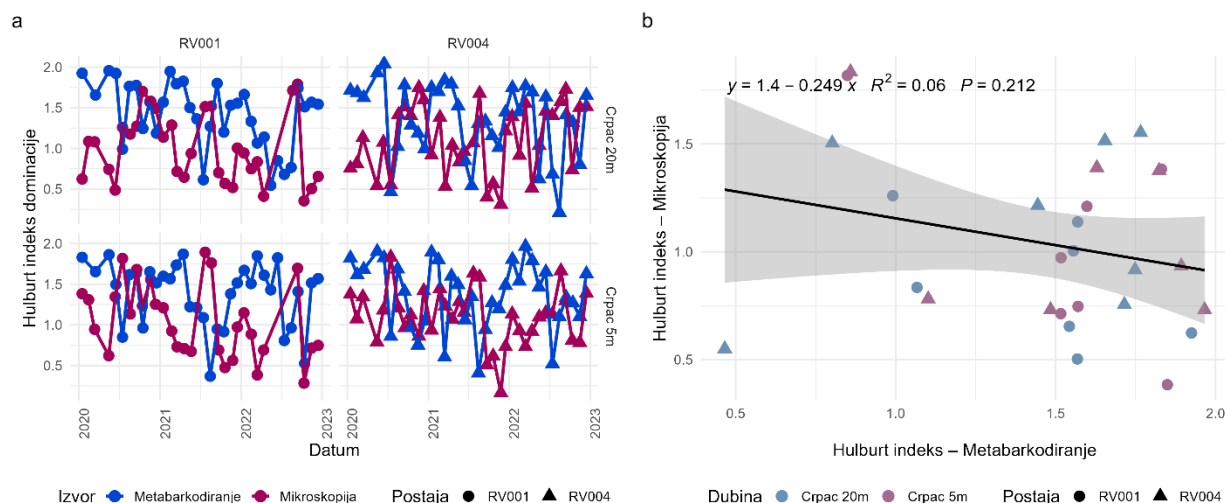
(d) pregled stranih i potencijalno toksičnih vrsta.. Metabarkodiranjem je na postaji RV001 prosječno detektirano $14,96 (\pm 4,11)$, dok je na istoj postaji mikroskopijom detektirano $1,86 (\pm 0,83)$ štetnih ili toksičnih fitoplanktonskih taksona po uzorku. Na postaji RV004, metabarkodiranjem je detektirano $12,78 (\pm 3,80)$, a mikroskopijom $2,17 (\pm 1,06)$ štetnih fitoplanktonskih taksona (Slika 3.56). Ukupno je detektirano 70 toksičnih HAB taksona, metabarkodiranjem je detektirano ukupno 59, mikroskopijom je detektirano ukupno 20 HAB taksona, dok je objema metodama detektirano ukupno devet. Također, metabarkodiranjem je zabilježeno ukupno 275 novih fitoplanktonskih taksona za sjeverni Jadran, od kojih je 165 taksonomski određeno do razine vrste, dok je preostalih 113 taksonomski određeno do razine roda. Ukupno je zabilježeno 176 novodetektiranih fitoplanktonskih rodova (Prilog 29, [Poglavlje 3.6.2](#))



Slika 3.56 Odnos broja detektiranih štetnih i toksičnih taksona po uzorku na temelju rezultata metabarkodiranja i mikroskopije (a) i presjek broja vrsta detektiranih različitim metodama (b)

(e) *Izračun Multiparametrijskog indeksa.* Za procjenu učinkovitosti metabarkodiranja za izračunavanje Multiparametrijskog indeksa fitoplanktona, korišteno je ukupno 116 uzoraka s postaja LTRV kroz tri godine. Multiparametrijskim indeksom fitoplanktona (MPI) (Facca i sur., 2014) ujedinjeni su Hulburtov indeks dominacije (1), učestalost cvatnji (2), Menhinickov indeks raznolikosti (3) i koncentracija klorofila *a* (4).

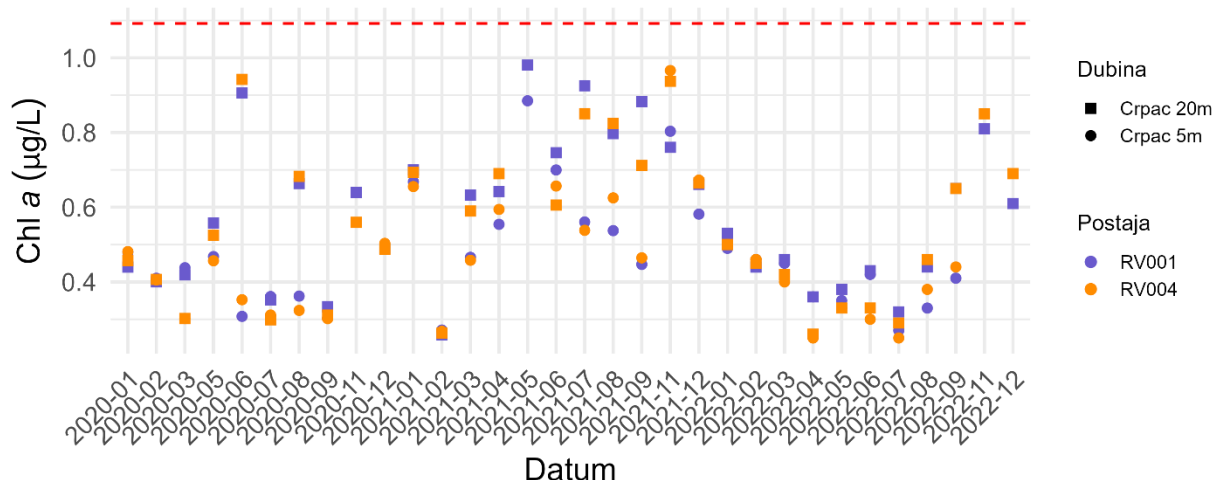
(1) *Hulburtov indeks dominacije.* Omjeri ekološke kakvoće za Hulburtov indeks izračunati su uzimajući u obzir dva najučestalija taksona na temelju rezultata dobivenih metabarkodiranjem i mikroskopijom za procjenu OEK-a (Slika 3.57a). Raspon omjera za Hulburtov indeks kretali su se od 0,16 do 1,89 za uzorke metabarkodiranja te od 0,21 do 2,04 za mikroskopiju. Srednje vrijednosti omjera za Hulburtov indeks iznosile su $1,07 \pm 0,41$ na temelju mikroskopije te $1,38 \pm 0,42$ za rezultate metabarkodiranja. Analiza odnosa između Hulburtovog indeksa dominacije procijenjenog pomoću metabarkodiranja i mikroskopije pokazala je negativan i ne statistički značajan odnos (Pearson korelacija: $r = -0,24$, $p = 0,21$) (Slika 3.57b). Ipak, vrijednosti su u istom rasponu veličina, što upućuje na to da obje metodologije daju usporedive procjene Hulburtova indeksa dominacije.



Slika 3.57 Vrijednosti omjera ekološke kakvoće (OEK) za Hulburtov indeks na temelju rezultata metabarkodiranja i mikroskopije (a) te prikaz linearne regresije i korelacije na temelju Pearson koeficijenta

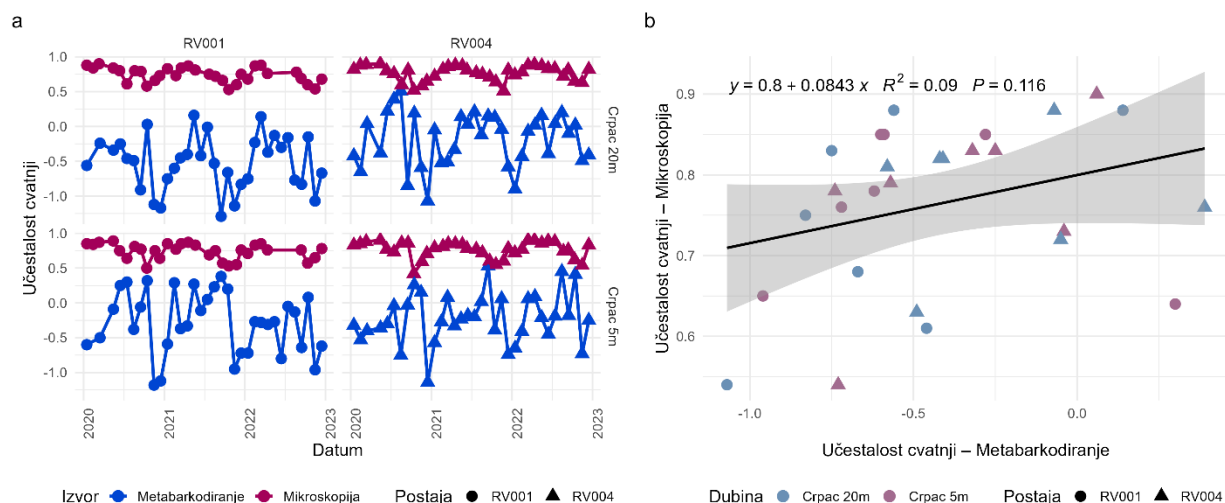
(2) *Učestalost cvatnji*. Rezultati dobiveni svjetlosnom mikroskopijom upućuju na tri uzorkovanja za koje su prisutne karakteristike cvatnje, odnosno da je ukupna brojnost najzastupljenije vrste $> 50\%$ ukupne brojnosti fitoplanktona te da je brojnost te vrste veća od 5×10^5 stanica L^{-1} . Takvi događaji zabilježeni su u studenom 2021. na obje dubine postaje RV004 kada je kompleks vrsta *Nitzschia delicatissima* zabilježen s ukupno $6,02 \times 10^5$ stanica L^{-1} na dubini od 5 m te $5,12 \times 10^5$ stanica L^{-1} na dubini od 20 m sa zastupljenošću od 88,61% i 81,88%, dok su tijekom listopada 2022. zabilježene povišene brojnosti vrste *Chaetoceros socialis* na postaji RV001 na 5 m ($5,34 \times 10^5$ stanica L^{-1} , 87,48% zastupljenosti).

Za analizu rezultata metabarkodiranja, učestalost cvatnji izračunata je kao broj koliko je puta relativna abundancija jedne vrste premašila 50% ukupne abundancije uz uvjet da je koncentracija klorofila *a* premašila dogovorene granične vrijednosti ($1,092 \mu g L^{-1}$). U korištenom setu podataka mjesečnih uzorkovanja na dvije dubine u periodu 2020.-2022. na postajama LTRV, u rezultatima dobivenih metabarkodiranjem, za ukupno 20 uzoraka relativna je učestalost jedne vrste premašila 50%, što čini 16,95% ukupnih analiziranih uzoraka. Za sve uzorke je bilo karakteristično da se radi o skupini dinoflagelata, najčešće o rodu *Gymnodinium*. Uzorci s dominantnim taksonima sa zastupljenošću više od 50% nalaze u [Prilogu 30](#). Vrijednost klorofila *a* kretala se od $0,25 \mu g L^{-1}$ do $0,98 \mu g L^{-1}$, dok je srednja vrijednost bila $0,51 \mu g L^{-1}$. U navedenom setu, niti u jednom uzorku nije zabilježena koncentracija klorofila *a* viša od dogovorene granične vrijednosti ([Slika 3.58](#)).



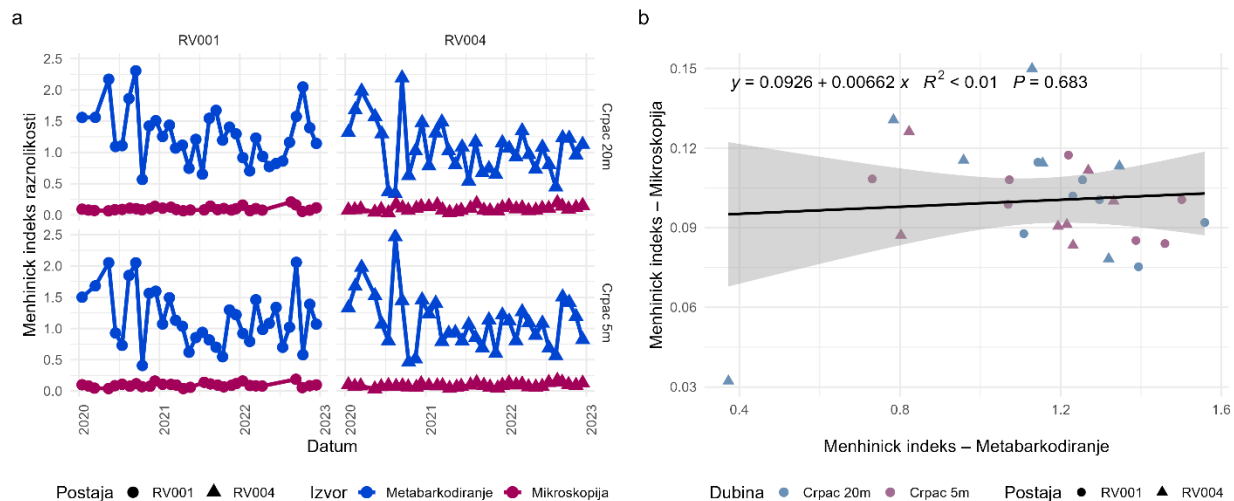
Slika 3.58 Koncentracije klorofila a na postajama terenskog uzorkovanja LTRV. Crvena isprekidana crta označava liniju najlošije izmjerene vrijednosti pokazatelja stanja koji se uzimaju u obzir pri izračunavanju Multimetrijskog indeksa fitoplanktona (MPI)

Izračunati su omjeri ekološke kakvoće (OEK) za učestalost cvatnji. Rezultati dobiveni mikroskopiranjem pokazuju stabilnije i više vrijednosti kroz vrijeme na svim postajama i dubinama, dok rezultati dobiveni metabarkodiranjem pokazuju izraženije oscilacije kroz vrijeme, na obje postaje i obje dubine ([Slika 3.59a](#)). Raspon omjera za metabarkodiranje kreće se od -1,29 do 0,53 dok su omjeri dobiveni mikroskopiranjem od 0,42 do 0,9. Srednje vrijednosti OEK za učestalost cvatnji bile su $-0,30 \pm 0,41$ za metabarkodiranje te $0,75 \pm 0,11$ za rezultate mikroskopije. Za usporedbu OEK za učestalost cvatnji procijenjenih metodom metabarkodiranja i mikroskopije, provedena je Pearsonova korelacijska analiza i linearna regresija. Pearsonov koeficijent korelacije između vrijednosti na temelju rezultata metabarkodiranja i mikroskopije iznosio je $r = 0,30$, $p = 0,116$, što ukazuje na slabu, ali ne statistički značajnu razliku u odnosu ovih metoda za procjenu OEK za učestalost cvatnji ([Slika 3.59b](#)).



Slika 3.59 Vrijednosti omjera ekološke kakvoće (OEK) za učestalost cvatnji na temelju rezultata metabarkodiranja i mikroskopije (a) i prikazo linearne regresije i korelacije na temelju Pearson koeficijenta

(3) *Menhinickov indeks raznolikosti*. Detektirane vrijednosti za Menhinickov indeks koji upućuje na raznolikost na razini vrste korigirane *ukupnom* brojnošću vrlo su visoke, te su se kretale od 0,032 do 0,21 za mikroskopiranje te od 0,34 do 2,46 za metabarkodiranje. Za sve analizirane uzorke Menhinickov indeks bio je veći za metabarkodiranje u odnosu na mikroskopiju. Dobivene OEK vrijednosti za Menhinickov indeks raznolikosti po postajama pokazale su se vrlo visoke, za sve tri istraživane godine, ukupno 27,51 za postaju RV001 te 23,63 za postaju RV004 u odnosu na mikroskopiranje gdje su te vrijednosti iznosile 3,87 za postaju RV001 te 3,80 za postaju RV004 (Slika 3.60a). U svrhu evaluacije usklađenosti rezultata dobivenih mikroskopijom i metabarkodiranjem, provedena je Pearson korelacijska analiza koja je pokazala nizak i ne statistički značajan odnos između dobivenih rezultata ($r = 0,081$, $p = 0,683$) (Slika 3.60b).



Slika 3.60 Vrijednosti omjera ekološke kakvoće (OEK) za Menhinickov indeks na temelju rezultata metabarkodiranja i mikroskopije (a) i prikazo linearne regresije i korelacije na temelju Pearson koeficijenta

Ukupan Multiparametrijski indeks. Godišnji multiparametrijski indeks fitoplanktona (MPI) izračunat je za dvije metode analize (metabarkodiranje i mikroskopija) na postajama RV001 i RV004, tijekom tri uzastopne godine (2020.–2022.). Ukupni MPI znatno je veći za metabarkodiranje (12,46) u odnosu na mikroskopiju (1,99), na temelju izrazito povišenog Menhinick indeksa kod metabarkodiranja. MPI bez OEK Menhinick pokazuje nešto nižu srednju vrijednost (1,12) za metabarkodiranje u odnosu na mikroskopiju (1,37). MPI bez OEK Menhinick na temelju metabarkodiranja pokazuje blagi pad ukupnog indeksa u 2021. godini, na obje postaje što su ujedno i jedine vrijednosti manje od 1 (0,93 za postaju RV001 i 0,98 za postaju RV004). Pad ukupnog indeksa u 2021. primijećen je i za mikroskopiju, no s nešto višim vrijednostima za obje postaje (1,15 i 1,18). Bez obzira na znatno više vrijednosti ukupnog MPI, pad indeksa također je primijećen u odnosu na preostale dvije godine. Bez obzira na to, na obje postaje te kroz sve tri godine, ukupan MPI pokazao je procijenjeno ekološko stanje bolje od referentnog (> 1), dok ukoliko se izuzmu visoke vrijednosti OEK Menhinick, ekološko stanje je na obje postaje kroz sve tri godine procijenjeno je kao najmanje *vrlo dobro* (Tablica 3.5).

Tablica 3.5 Vrijednosti Multiparametrijskog indeksa fitoplanktona (MPI) na temelju Omjera ekološke kvalitete Hulburtovog indeksa dominacije, učestalosti cvatnji, Menhinickovog indeksa raznolikosti te koncentracije klorofila a. MPI je prikazan s (ukupni) i bez Menhinickovog omjera. Procijenjeno ekološko stanje prikazano je bojom u odnosu na referentne vrijednosti (plavo).

Metoda	Postaja	Godina	OEK (Omjer ekološke kvalitete)				MPI (Multiparametrijski indeks fitoplanktona)		
			Hulburt	Učestalost cvatnji	Chla	Menhinick	Ukupni MPI	MPI (bez OEK Menhinick)	Ekološko stanje
Metabarkodiranje	RV001	2020	1,55	-0,43	2,45	59,04	15,65	1,19	
		2021	1,39	-0,36	1,75	43,87	11,66	0,93	
		2022	1,30	-0,43	2,48	44,93	12,07	1,11	
	RV004	2020	1,42	-0,28	2,60	52,04	13,95	1,25	
		2021	1,31	-0,15	1,80	38,43	10,35	0,98	
		2022	1,34	-0,18	2,63	40,63	11,10	1,26	
Mikroskopijska	RV001	2020	1,22	0,76	2,45	3,58	2,00	1,48	
		2021	0,96	0,73	1,75	3,79	1,81	1,15	
		2022	0,85	0,73	2,48	4,36	2,11	1,35	
	RV004	2020	1,17	0,76	2,60	3,37	1,97	1,51	
		2021	0,97	0,75	1,80	3,49	1,75	1,18	
		2022	1,18	0,79	2,63	4,50	2,28	1,53	

4. RASPRAVA

4.1 Referentna baza CIMPhy18

4.1.1 Izrade referentne baze

Istraživanja o raznolikosti fitoplanktona metabarkodiranjem uvelike ovise o dobro održavanim i uređenim referentnim bazama podataka ključnim za pouzdanu taksonomsku identifikaciju (Ekrem i sur., 2007; Hleap i sur., 2021; Keck i sur., 2023a). Nedostatak referentnih sekvenci za pojedine vrste ili skupine, loša kvaliteta sekvenci (dužina nukleotidnog slijeda te pouzdanost svakog nukleotida u slijedu) te taksonomski pogrešno opisane sekvence, neki su od najvažnijih problema referentnih baza koji mogu utjecati na pouzdan opis bioraznolikosti metodom metabarkodiranja (Keck i sur., 2023a; Yoccoz, 2012). Zato je jedan od ciljeva ovog rada bio izrada vlastite, pouzdane referentne baze sekvenci objedinjenjem javno dostupnih i provjerenih sekvenci u jednu cjelovitu bazu podataka za potrebe filogenetskih i ekoloških analiza u priobalnim ekosustavima metodom metabarkodiranja. Izradom nove referentne baze, uklonjeni su nedostaci koji prate trenutačno najveće i najčešće korištene referentne baze podataka za 18S – Silva i PR2 (Pruesse i sur., 2007; Quast i sur., 2013; Guillou i sur., 2013). Jedan od uočenih nedostataka baza SILVA i PR2 prilikom istraživanja fitoplanktonskih zajednica jest njihova sveobuhvatnost, budući da uključuju širok spektar sekvenci koje nisu nužno relevantne za analize fitoplanktonske zajednice. Cilj izrade CIMPhy18 bio je otkloniti ovaj nedostatak izdvajajući isključivo fitoplanktonske sekvence iz navedenih referentnih baza. Time je smanjen raspon referentnih sekvenci korištenih za taksonomsku anotaciju isključivo na sekvence fitoplanktonskih organizama, što se pokazalo korisnim u istraživanjima jer je olakšalo i unaprijedilo postupak obrade podataka (Casey i sur., 2025). U prvom koraku provjere novoizrađene referentne baze CIMPhy18, po uzoru na referentnu bazu diatomeja za 18S i rbcL regije (Rimet i sur., 2016; Rimet i sur., 2019), referentne sekvence međusobno su poravnate te su sekvence loše kvalitete (sekvence koje nisu mogle biti poravnate ili prekratke sekvence) uklonjene iz referentne baze. U drugom koraku slijedila je taksonomska provjera i njezino ujednačavanje. Kod izrade CIMPhy18 glavni izazov pri objedinjenju javno dostupnih referentnih baza nukleotidnih sekvenci u jednu novu, jedinstvenu referentnu bazu, bio je prisutnost različitih pristupa klasifikacije organizama svake od baza kod taksonomskog opisa referentnih sekvenci. Na primjeru roda *Chaetoceros*, globalna baza WoRMS

(www.marinespecies.org), predlaže 10 taksonomskih kategorija (Eukaryota; Chromista; Heterokontophyta; Bacillariophytina; Mediophyceae; Chaetocerotophycidae; Chaetocerotales; Chaetocerotaceae; *Chaetoceros*), AlgaeBase (Guiry i sur., 2014) predlaže devet (Eukaryota; Chromista; Heterokontophyta; Bacillariophytina; Bacillariophyceae; Coscinodiscophycidae; Chaetocerotanae, Chaetocerotanae incertae sedis; Chaetocerotaceae; *Chaetoceros*) (pristup na dan 13.06.2025)., dok kod najvećih referentnih baza Silve i PR2 je osam taksonomskih kategorija te se taksonomija referentne baze Silva (Eukaryota; SAR; Stramenopiles; Ochrophyta; Diatomea; Bacillariophytina; Mediophyceae; *Chaetoceros*) također razlikuje se od PR2 (Eukaryota; TSAR; Stramenopiles; Gyrista; Mediophyceae; Chaetocerotales; Chaetocerotaceae; *Chaetoceros*). Za razliku od dijatomeja, rod *Goniomonas* iz skupine kriptofita u globalnim taksonomskim bazama opisan je s osam ili devet taksonomskih razina, dok je u referentnoj bazi PR2 sa šest, a Silva – tri. Za ujednačavanje taksonomskog nazivlja sa ciljem optimizacije obrade podataka dobivenih metabarkodiranjem kod izrade referentne baze CIMPhy18, za sve referentne sekvence uspostavljena je taksonomska klasifikacija od sedam taksonomskih kategorija dosljednog nazivlja prema standardiziranoj taksonomiji i taksonomskoj hijerarhiji Globalnog informacijskog sustava o bioraznolikosti, GBIF *Backbone Taxonomy*, na temelju taksonomskih razina koje su prihvaćene kao tradicionalne Linnéove razine (Linnaeus, 1735) (na primjeru spomenutog roda *Chaetoceros*: Eukaryota; Ochrophyta; Bacillariophyta; Coscinodiscophyceae; Chaetocerotales; Chaetocerotaceae; *Chaetoceros*). Postojanje neujednačenosti taksonomske klasifikacije između različitih referentnih baza podataka često zahtjeva dodatnu taksonomsku obradu nakon bioinformatička analize podataka sekvenciranja, što značajno otežava/utječe na kasniju analizu podataka metabarkodiranja i vizualizaciju rezultata (Keck i sur., 2023b; Mugnai i sur., 2023). CIMPhy18 referentna baza predstavlja tako značajan napredak u optimizaciji koraka taksonomske anotacije i time skraćanju ukupnog vremena obrade rezultata metabarkodiranja, a što je posebice važno u kontekstu sustavnog praćenja morskog ekosustava.

Uspostavom i brzim napretkom molekularnih metoda u identifikaciji vrsta, posljednjih desetljeća, dolazi do čestih izmjena u taksonomskoj klasifikaciji brojnih fitoplanktonskih vrsta (Cavalier-Smith, 1998, 2004; Adl i sur., 2019; Burki i sur., 2020) kao i do otkrivanja i opisivanja veće taksonomske raznolikosti morskih ekosustava čime je i broj novootkrivenih vrsta i skupina u stalnom porastu (Medlin i sur., 1996; LaJeunesse i sur., 2018; Arapov i sur., 2023). Filogenetske analize fitoplanktonskih skupina na temelju molekularnih podataka, rezultirale su uspostavom

novih ili reorganizacijom postojećih taksonomskih kategorija u odnosu na ranije uspostavljene filogenetske odnose na temelju morfoloških identifikacija vrsta. Molekularni pristup pokazao se osobito uspješan kod identifikacije (novih) vrsta manjih veličinskih frakcija poput vrsta fitoplanktonske skupine prazinofita (Guillou i sur., 2004). Tako je rod *Symbiodinium* (Dinoflagellata) od jedinstvenog roda, molekularnom analizom podijeljen u u još nekoliko novih rodova (*Cladocopium*, *Breviolum*, *Durusdinium*) koji su tako uz *Symbiodinium* pripali novoj porodici (*Symbiodiniaceae*) (LaJeunesse i sur., 2018). Molekularna identifikacija vrsta, rezultirala je i reorganizacijom nekih vrsta dijatomejskog roda *Thalassiosira* u više novouspostavljenih ili redefiniranih rodova (*Minidiscus*, *Conticribra*) (Medlin i sur., 1996; Li i sur., 2020). Brza evolucija taksonomske klasifikacije fitoplanktona, potaknuta otkrićima novih vrsta i filogenetskim revizijama na osnovu molekularnih podataka, nameće potrebu održavanja, nadopunjavanja te stalnog provjeravanja izrađene referentne baze podataka u skladu sa novim istraživanjima taksonomije fitoplanktona. Ovakvo stalno održavanje referentne baze podataka utječe da se za svako novo korištenje u obradi podataka metabarkodiranja koristi u određenoj mjeri izmijenjena referentna baza, a što može utjecati na rezultate taksonomske anotacije. Na ovaj način, dovodi se u pitanje usporedivost rezultata svake nove obrade podataka, što je osobito slučaj kod dugoročnih istraživanja kakva obuhvaća sustavno praćenje morskog okoliša. Stoga, treba kod svake obrade podataka imati na umu korištenu verziju referentne baze te u skladu s tim provesti dodatne ili ponoviti neke analize kako bi usporedivost i pouzdanost podataka sustavnog praćenja bili sigurni.

Za točnu molekularnu identifikaciju fitoplanktonskih vrsta, ključne su taksonomska sveobuhvatnost i točnost referentnih baza sekvenci. Od osobite je važnosti popunjenost referentne baze vrstama od specifičnog interesa (invazivne, toksične vrste i sl.) kao i vrstama karakterističnima za istraživano područje (kao što je npr. sjeverni Jadran) kako bi se pospješila uspješnost detekcije i taksonomska rezolucija takvih vrsta (Creer i sur., 2016; Mordret i sur., 2024). Zato je obogaćenje CIMPhy18 referentne baze sa sekvencama barkodiranja fitoplanktonskih kultura Centra za istraživanje mora, uzorkovanih i izoliranih na području sjevernog Jadrana, značajno pridonijelo vrijednosti CIMPhy18 za primjenu u sustavnom praćenju osobito sjevernog Jadrana. Osim toga, ovih ukupno 140 sekvenci su visoke taksonomske pouzdanosti te kao takve predstavljaju i značajan doprinos ukupno dostupnim sekvencama fitoplanktona i obradi podataka i šireg, globalnog morskog područja. Dodavanje sekvenci dobivenih sekvenciranjem organizama ih lokalnih fitoplanktonskih zajednica sjevernog Jadrana obogaćuje referentnu bazu lokalnim

sekvencama s potencijalno identičnim genotipovima kao istraživana fitoplanktonska zajednica. Obogaćivanje referentne baze lokalnim sekvencama utječe na bolju pokrivenost i kvalitetniji opis fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana, kao i detaljnije praćenje sukcesije zajednica, što je pokazano i ranijim istraživanjima (Bourret i sur., 2023; Mugnai i sur., 2023). Također, većina pridodanih lokalnih sekvenci pripalo je vrstama i rodovima koje su prisutne u globalnim referentnim bazama, no usprkos tome, prilikom taksonomske taksonomske anotacije, taksonomija je pridodana na temelju lokalnih unosa za približno 0,11% taksonomski anotiranih sekvenci ukupnog analiziranog seta podataka, čime se dodatno potvrđuje važnost barkodiranja organizama lokalne zajednice (Mugnai i sur., 2023).

Osim samih sekvenci i pridružene im taksonomske informacije, za izradu referentne baze sekvenci treba uzeti u obzir i važnost dodatnih podataka koji su povezani s referentnom sekvencom, a koji pridonose pouzdanosti same sekvence i mogu biti veoma korisni za složenijih analiza rezultata metabarkodiranja, primjerice u istraživanjima ekologije fitoplanktona. Takvi dodatni podaci uz svaku sekvencu koji uključuju npr. mjesto i datum uzorkovanja, su poželjni, a i neophodni prema FAIR (engl. *Findable, Accessible, Interoperable i Reusable*) principima koji daju smjernice za upravljanje znanstvenim podacima (Wilkinson i sur., 2016). Za sekvencu koja je potkrijepljena znanstvenim člancima u kojima je objavljena, zajedno s autorima koji su je objavili smatra se da ima veću znanstvenu težinu od sekvence koja nije prošla proces recenzije (oznaka engl. *direct submission*) (Zimmermann i sur., 2014; Rimet i sur., 2021; Kochoska i sur., 2023). Također, sekvence fizički pohranjenih uzoraka (engl. *specimen voucher*) koji su dokumentirani i trajno dostupni imaju veći značaj od sekvenci iz okoliša (engl. *environmental sequence*) koje su neprovjerene (Rimet i sur., 2016; Weigand i sur., 2019; Rimet i sur., 2019, 2021). te su zanemarene i nisu uključene među CIMPhy18 referentne sekvence. Za točne studije bioraznolikosti nužna je sljedivost i dostupnost metapodataka (mjesto uzorkovanja, protokoli izolacije, ferogrami, vaučeri, preparati, DNA, fotografije, itd.) te fizičko pohranjivanje vaučera (kultura, fiksirani materijali, preparati, DNA, itd.) povezanih s referentnom sekvencom. Europski odbor za standardizaciju (European Standardisation Committee, 2018) koji rade na barkodiranju dijatomeja za sustavno praćenje dogovorio je minimalan skup metapodataka koji moraju pratiti referentnu sekvencu za određenu skupinu. Iako direktno dostupna za manji broj referentnih sekvenci, vrlo je važna informacija o geografskoj lokaciji gdje je uzorak prikupljen (u obliku geografskih koordinata i geopolitičkog područja) te opis staništa iz kojeg potječe (Nowak i sur., 2021; Crandall i sur., 2023).

Poznavanje geografskih područja u kojem je pojedina vrsta ili skupina pronađena, odnosno gdje ju je moguće naći, bilo da se radi o globalno rasprostranjenim ili endemskim vrstama, od posebne važnosti u okviru sustavnog praćenja i procjene indikatorskih vrsta, odnosno ranog otkrivanja stranih i potencijalno invazivnih vrsta (European Commission, 2014; (Oswalt i sur., 2021)). Dostupnost dodatnih podataka uz svaku sekvencu prisutnu u referentnim bazama omogućuje njihovo korištenje u izradama interaktivnih prikaza prostorne distribucije fitoplanktonskih vrsta kao što su prikazi u okviru programa OBIS (<https://www.obis.org>) i GBIF (<https://www.gbif.org>). Ovakvim interaktivnim prikazima olakšana je provjera rasprostranjenosti i pojavnosti pojedine vrste ili skupine organizama u sustavnom praćenju i/ili ekološkim istraživanjima (Klein i sur., 2019).

Duljina sekvenci u referentnim bazama određena je duljinom regije koju su za amplifikaciju ciljane regije zahvaćale korištene početnice kao i tehnologijom sekvenciranja. Distribucija duljine sekvenci u referentnoj bazi CIMPhy18 pokazala je najveću učestalost sekvenci duljine između 1700 i 1900 nukleotida, što odgovara ukupnoj duljini 18S rRNA gena većine eukariota (Hadziavdic i sur., 2014). Prisutnost većine sekvenci referentne baze u duljini kompletnog gena 18S rRNA omogućava uspješno korištenje ove referentne baze u obradi podataka metabarkodiranja dobivenih amplifikacijom raznih regija gena 18S rRNA. Od referentnih sekvenci kraćih od cijelog gena 18S rRNA, najveći broj je duljine 300–500 pb i odgovara V4 regiji 18S rRNA gena koja je predložena kao barkod za identifikaciju dijatomeja (Zimmermann i sur., 2014) i ostalih važnih fitoplanktonskih skupina (Pawlowski i sur., 2012; Vaulot i sur., 2020; Jerney i sur., 2023). Referentne baze koje sadrže referentne sekvence duljih slijedova po uzoru na Hadziavdic i sur., 2014, uobičajeno se koriste za analizu kraćih sekvenci dobivenih metabarkodiranjem, a koje se nalaze unutar dulje, referentne regije (Stoeck i sur., 2010b; Piredda i sur., 2017; Rimet i sur., 2019). Posljednjih godina, razvojem različitih tehnologija sekvenciranja, omogućeno je sekvenciranje duljih čitanja, čime raste broj duljih sekvenci u referentnim bazama podataka koje mogu zahvaćati cijelu duljinu gena za 18S (Gaonkar i Campbell, 2024), ali i regije više susjednih gena (Amarasinghe i sur., 2020; Marx, 2023; Espinosa i sur., 2024).

4.1.2 Provjera uspješnosti CIMPhy18

Cilj usporedbe taksonomskih anotacija i pokazatelja raznolikosti, pribavljenih obradom uzoraka metabarkodiranja referentnim bazama CIMphy18, PR2 i Silva, bio je provjeriti uspješnost

novostvorene CIMPhy18 baze u taksonomskoj identifikaciji fitoplanktonskih sekvenci u odnosu na postojeće, najčešće korištene referentne baze (PR2 i Silva). Korišteni su uzorci poznate, kontrolne zajednice fitoplanktonskih vrsta sastavljene iz kolekcije kultura CIM te okolišni uzorci sjevernog Jadrana i drugih morskih regija. Taksonomskom identifikacijom CIMPhy18 detektiran je značajno manji broj fitoplanktonskih sekvenci u odnosu na referentne baze Silva i PR2 jer su pri izradi CIMPhy18 uklonjene sve referentne sekvence koje nisu taksonomski određene do razine vrste ili roda te sve one referentne sekvence koje su opisane kao okolišni uzorak, za razliku od referentnih baza Silva i PR2 koje čine fitoplanktonske sekvence određene do razine porodice ili više kao i sekvence identificirane tek kao okolišne. Međutim, usporedba broja detektiranih fitoplanktonskih rodova otkrila je prednost CIMPhy18 kao objedinjene baze u odnosu na pojedinačne PR2 i Silva jer je sa CIMPhy18 detektiran za svaku od fitoplanktonskih skupina veći broj rodova u usporedbi s referentnim bazama PR2 i Silva. Također, uklanjanje referentnih sekvenci okolišnog uzorka, kao i sekvenci s nepotpunom taksonomijom do razine roda nije utjecalo na broj detektiranih fitoplanktonskih rodova korištenjem referentne baze CIMPhy18.

Usporedbom uspješnosti anotacije tri referentne baze (CIMPhy18, PR2 i Silva) na uzorcima metabarkodiranja (MOCK3 i MOCK4) kontrolne zajednice osam fitoplanktonskih kultura, sve tri korištene referentne baze pokazale su se uspješne prilikom određivanja sastava zajednice do razine roda. Ipak, iako taksonomski opsežna i zastupljena visokokvalitetnim sekvencama, na temelju CIMPhy18 nisu detektirani pojedini rodovi, a koji su zastupljeni sa pripadajućim referentnim sekvencama u CIMPhy18. Manji udio ASV-ova kontrolnih uzoraka za rodove *Nitzschia* i *Pseudo-nitzschia* taksonomski je uspješno određen i do razine vrste, međutim, kao što je poznato, taksonomsku razlučivost do razine vrste za V4 hipervarijabilnu regiju 18S, treba uzimati s oprezom (Piredda i sur., 2017). Provedena provjera uspješnosti anotacije referentnih baza 18S rRNA na uzorcima poznatog sastava fitoplanktona potvrđuju smanjenu sposobnost ove ciljane regije za preciznu taksonomsku razlučivost na razini vrste za većinu fitoplanktonskih rodova. S obzirom na to da je dio referentnih sekvenci CIMPhy18 porijeklom od barkodiranja fitoplanktonskih kultura CIM, dio ASV-ova taksonomski se najbolje podudara upravo sa tim sekvencama. Zbog kratke duljine i manje varijabilnosti ciljane V4 regije 18S rRNA, rijetki taksoni ne mogu biti uspješno detektirani na razini vrste (Tanabe i sur., 2015; Bukin i sur., 2023), što može predstavljati problem za detekciju ekološki značajnih vrsta koje je važno detektirati u okviru sustavnog praćenja. Veću pouzdanost taksonomske identifikacije na razini vrste moguće je postići povećanjem praga

pouzdanosti taksonomske anotacije (engl. *bootstrap*) tijekom bioinformatičke analize sekvenci, međutim, takav pristup povećava vjerojatnost i lažno negativnih rezultata (Escobar-Zepeda i sur., 2018; Garrido-Sanz i sur., 2022). Razlike u broju detektiranih rodova i vrsta korištenjem različitih referentnih baza potvrđene su i ranijim istraživanjima temeljenima na metabarkodiranju dok se parametri alfa i beta raznolikosti nisu značajno razlikovali (Curd i sur., 2024; Neri i sur., 2024).

Provedena usporedba uspješnosti taksonomske anotacije sa tri referentne baze potvrdila je da izbor referentne baze značajno utječe na procjenu fitoplanktonske raznolikosti korištenjem 18S rRNA metabarkodiranja. Usporedbom baza CIMPhy18, Silva i PR2, uočene su za korištene uzorke razlike u broju detektiranih rodova između baza. Iako zastupljena sa najvećim ukupnim brojem sekvenci za svaku fitoplanktonsku skupinu, baza PR2 za sve je uzorke imala značajno niže vrijednosti broja detektiranih fitoplanktonskih rodova u odnosu na CIMPhy18 i Silvu što upućuje na ograničenu taksonomsku raznolikost na razini roda ove referentne baze. Taksonomska ograničenja svake referentne baze rezultat su često postavljenih kriterija u odabiru sekvenci koje ulaze u sastav referentne baze. Tako baza PR2, specijalizirana za eukariotske protiste, provodi kod odabira referentnih sekvenci njihovu detaljnu filogenetsku obradu (Guillou i sur., 2013) što može doprinijeti ukupno nižoj taksonomskoj raznolikosti (osobito na razini nižih taksonomskih kategorija) same referentne baze. Šira taksonomska pokrivenost referentne baze Silva u odnosu na PR2 (Quast i sur., 2013; Guillou i sur., 2013) može povećati broj detektiranih taksona u obradi metabarkodova, ali zbog nedostatka koraka filogenetske obrade svake sekvence, povećana je i mogućnost lažno pozitivnih anotacija korištenjem ove baze. Odabir referentne baze za taksonomsku anotaciju podataka metabarkodiranja, značajno utječe na taksonomski opis fitoplanktonskih zajednica, a time i na daljnju interpretaciju rezultata metabarkodiranja ovisno o ciljevima provedenog istraživanja (Keck i sur., 2023a; Neri i sur., 2024). Rezultati uspješnosti taksonomske anotacije kontrolnih i okolišnih uzoraka metabarkodiranja s tri referentne baze podataka upućuju na to da taksonomski ciljevi (fitoplankton), ali opsežne (objedinjene pripadajuće sekvence više dostupnih referentnih baza kao i lokalnih sekvenci barkodiranja kultura) referentne baze poput u ovom radu stvorene CIMPhy18 mogu omogućiti širi opis raznolikosti fitoplanktonske zajednice u morskim sustavima u odnosu na češće korištene javno dostupne referentne baze.

4.2 Usporedba metoda uzorkovanja fitoplanktonska mreža – Niskinov crpac

4.2.1 Detekcija fitoplanktona

Usporedba uzorkovanja fitoplanktona pomoću fitoplanktonske mreže i Niskinovog crpca u sjevernom Jadranu otkrila je niz metodoloških razlika koje mogu bitno utjecati na opis raznolikosti fitoplanktonske zajednice te daljnju interpretaciju dobivenih rezultata raznolikosti u provedenim istraživanjima. Iako se obje metode redovito koriste u oceanografskoj praksi, one ciljaju različite domene planktonske zajednice te stoga pružaju komplementarne uvide u sastav zajednice (Edler, 1979). Malo je studija koje su izravno usporedile ove dvije metode uzorkovanja planktona u opisu bioraznolikosti temeljenom na metabarkodiranju (Du i sur., 2024; Frau, 2025; Dolan i Marro, 2020). U ovom istraživanju uspoređene su ove dvije ključne metode uzorkovanja fitoplanktonske zajednice na temelju njihove uspješnosti u opisa raznolikosti zajednice. Na temelju rezultata utvrđene su mogućnosti svake pojedine metode za praćenje promjena u dinamici fitoplanktonskih zajednica i primjenu u sustavnom praćenju bioraznolikosti fitoplanktona sjevernog Jadrana.

Iako su ukupni brojevi sirovih sekvenci po uzorku bili usporedivi, bez značajnih razlika ($p > 0,30$) između mrežnih uzoraka i uzoraka iz crpaca, rezultati usporedbe ove dvije metode uzorkovanja utvrdile su ipak značajne razlike u zabilježenom broju samih fitoplanktonskih sekvenci kao i sastavu fitoplanktonske zajednice. Uzorci prikupljeni Niskinovim crpcima (dubina 5 i 20 m) pokazali su značajno veći broj fitoplanktonskih sekvenci i detektiranih fitoplanktonskih rodova u usporedbi s uzorcima prikupljenim fitoplanktonskom mrežom. U promatranom skupu podataka, tek oko 2% svih fitoplanktonskih sekvenci potječe iz mrežnih uzoraka, dok preostalih ~98% dolazi iz uzoraka crpaca s određenih dubina (5 i 20 m). U skladu s tim, fitoplanktonskom mrežom detektirano je svega 119 fitoplanktonskih rodova (42,6% od ukupno zabilježenih rodova), dok je uzorkovanje crpcem zabilježilo ukupno 278 rodova (preko 99% svih zabilježenih fitoplanktonskih rodova u setu podataka). Također, važno je naglasiti da su uzorci crpaca s 5 i 20 m dali vrlo slične rezultate i po ukupnom broju sekvenci i po broju detektiranih fitoplanktonskih rodova te nije bilo statistički značajnih razlika u broju detektiranih fitoplanktonskih rodova između dvije dubine dubine uzorkovanja ($p > 0,05$).

Osim razlika u brojnosti sekvenci i broju detektiranih rodova, uočene su i razlike u sastavu zajednice ovisno o metodi uzorkovanja. Uzorci prikupljeni crpcima pokazali su veću raznolikost sastava fitoplanktonske zajednice u odnosu na uzorke prikupljene fitoplanktonskom mrežom.

Tijekom sve tri godine bilježe se ujednačeni omjeri te stalno prisutstvo dominantnih skupina poput Bacillariophyta i Dinophyta kroz vrijeme, uz manju varijabilnost među uzorcima. S druge strane, mrežni uzorci pokazuju drugačiji profil dominacije taksonomskih skupina u usporedbi s uzorcima prikupljenima Niskinovim crpcima. U svim uzorcima dominiraju dinoflagelati, ali je njihova relativna učestalost manja u mrežnim uzorcima (oko 68%) nego u uzorcima iz crpaca (77–78% na 5 i 20 m). Nasuprot tome, dijatomeje čine znatno veći udio zajednice u mrežnim uzorcima (oko 28%) nego u uzorcima iz crpaca (~6%). čime je potencijalno osobito korisna za brze kvalitativne procjene, detekciju dominantnih vrsta tijekom cvjetanja te otkrivanje potencijalno toksičnih ili invazivnih vrsta (Revelante i Gilmartin, 1976; Viličić i sur., 2009). S druge strane, fitoplanktonske skupine manjih veličinskih frakcija (nanofitoplankton) iako povremeno detektiranih, ostaju potcijenjene te su slabo zastupljene u mrežnim uzorcima (< 2% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci), dok su u uzorcima crpaca ove skupine bile značajnije prisutne (4–7% ukupnih fitoplanktonskih sekvenci). Uzorkovanje crpcem omogućuje kvantitativno uzorkovanje bez veličinske selekcije, što rezultira uključivanjem svih veličinskih frakcija, uključujući osjetljive i sitne organizme poput Chlorophyta, Cryptophyta i Prasinophyta (Utermöhl, 1958; Viličić i sur., 2009). Opisane razlike izravna su posljedica svojstava dviju metoda uzorkovanja. Fitoplanktonska mreža veličine pora ~50 µm mehanički propušta sve jedinke veličinske frakcije manje od veličine pora fitoplanktonske mreže. Time je obuhvaćen cijeli niz manjih veličinskih frakcija od pikoplanktona (<2 µm), nanoplanktona (2–20 µm) do manjeg mikrofitoplanktona koji imaju ključnu ulogu u trofičkoj dinamici i biogeokemijskim ciklusima (Schmidt i sur., 2020). Takvi sitni oblici prolaze kroz mrežu i ne budu zadržani, pa ih kasnija analiza ne može detektirati iz mrežnog uzorka. Ovakav zabilježeni uzorak sastava fitoplanktonske zajednice uvjetovan karakteristikama tipa uzorkovanja (mreža ili crpac) potvrđen je i u drugim sličnim istraživanjima, gdje je utvrđeno da mrežni uzorci precjenjuju relativnu učestalost dijatomeja te da se zajednice prikupljene fitoplanktonskom mrežom i Niskinovim crpcem statistički značajno razlikuju (Du i sur., 2024; Jiang i sur., 2020; Wasmund i sur., 2008; Wu i sur., 2011).

Poznato je da je u sjevernom Jadranu određeni broj vrsta biti prisutan tijekom cijele godine, kao i da postojanje stabilnih, povremeno ponavljajućih obrazaca pojavnosti fitoplanktonskih skupina tijekom sezonskih i godišnjih ciklusa (Marić i sur., 2012; Godrijan i sur., 2013; Vascotto i sur., 2021; Neri i sur., 2022). Ipak, u mrežnim uzorcima često se pokazalo da zajednicu čini uglavnom samo jedan ili nekoliko rodova, koji su dominirali nad ostalima – primjerice, rod *Noctiluca*

pokazao je najveću ukupan broj sekvenci u mreži, a slijedio ga je rod *Chaetoceros*. Ovi rodovi predstavljeni su velikim jedinkama ili su kolonijalni oblici koje mreža lako zahvaća, stoga je očekivano da se dominantno pojavljuju u mrežnim uzorcima. Međutim, važno je primijetiti da je pojavljivanje i brojnost tih dominantnih rodova u mreži kroz vrijeme bilo vrlo nesustavno. Primjerice, iako su *Noctiluca* i *Chaetoceros* bili najčešće zabilježeni u mrežnim uzorcima, njihova pojava kroz različita uzorkovanja bila je isprekidana – u nekim periodima nisu detektirani u mreži, iako su u uzorcima iz crpaca bili prisutni. Viši stupanj detekcije fitoplanktonskih sekvenci iz uzoraka dobivenih pomoću crpaca omogućuje bolju detekciju jasnih vremenskih i prostornih obrazaca u odnosu na uzorkovanje fitoplanktonskom mrežom.

Dosljedno veća bioraznolikost, kao i veći udio sekvenci pridruženih fitoplanktonskim skupinama dobiveni uzorkovanjem crpcima ukazuju na strukturiraniju i stabilniju sliku zajednice što upućuje na veću pouzdanost ove metode za uzorkovanje fitoplanktonske zajednice u odnosu na fitoplanktonsku mrežu, što je u skladu s rezultatima ranijih istraživanja (Du i sur., 2024; Frau, 2025). Jedan od čimbenika koji je mogao utjecati na razlike u zabilježenim obrascima pojavnosti i brojnosti fitoplanktonskih skupina u uzorcima crpaca i mreže jest selektivnost mreže, koja pogoduje hvatanju većih ili kolonijalnih organizama u odnosu na crpac, dok su manje i osjetljivije stanice slabije zastupljene u sastavu mrežnog uzorkovanja (Riccardi, 2010). Mogućnost uzorkovanja dubinskih slojeva crpcem omogućuje uvid u moguće vertikalne obrasce (često ovisne o stratifikaciji vodenog stupca) raspodjele fitoplanktona dok uzorkovanjem fitoplanktonskom mrežom to nije moguće zbog uzorkovanja jednim vertikalnim potezom kroz vodeni stupac. Ipak, uzorci prikupljeni crpcima potječu s tek nekoliko određenih dubina, te stoga možda ne predstavljaju u potpunosti fitoplanktonsku zajednicu čitavog vodenog stupca kao što to predstavljaju uzorci prikupljeni mrežom (Wasmund i sur., 2008). Također, prilikom uzorkovanja crpcima, pokazano je da i okolišna (slobodna) DNA može opstati u okolišu tjednima te se stoga može otkriti metabarkodiranjem, čak i kada odgovarajuće žive stanice više nisu prisutne zbog dugotrajnog zadržavanja okolišne DNA u vodi (do nekoliko tjedana, ovisno o uvjetima okoliša) te prijenosa morskim strujama, što može ograničenja potencijalno utjecati na proučavanje geografske raspodjele bioraznolikosti fitoplanktona pomoću okolišne DNA (Goldberg i sur., 2015; Deiner i Altermatt, 2014).

Prilikom metabarkodiranja relativna količina sekvenci određenog organizma uvelike ovisi o njegovoj biomasi i broju kopija gena koji se koristi kao barkod (Brandt i sur., 2021.). Za uzorke sjevernog Jadrana to može značiti da u slučajevima kad uzorkom dominira zooplankton (veliki udio ukupne biomase u odnosu na udio biomase fitoplanktona), za očekivati je slabiju zastupljenost fitoplanktonskih sekvenci u uzorcima, a to je primijećeno i kod Brandt i sur., 2021. Smanjeni udio fitoplanktonskih sekvenci u uzorcima dobivenim fitoplanktonskom mrežom, u odnosu na one prikupljene Niskinovim crpcem, upućuje na sistematsko poduzorkovanje (engl. *undersampling*) fitoplanktonskih skupina uslijed kompetitivne dominacije većih planktonskih skupina, prvenstveno zooplanktona (Stoeck i sur., 2010; MacNeil i sur., 2022; Kezlya i sur., 2023). Ova situacija osobito je prisutna u mrežnim uzorcima (vertikalni potez mreže kroz stupac koncentrira prisutne organizme pa tako i zooplankton) gdje je tek $\approx 2\%$ sekvenci pripadalo fitoplanktonskim skupinama, dok su crpci s 5 i 20 m dubine bilježili $\approx 49\%$ fitoplanktonskih sekvenci.

Mogući uzrok lažno negativnih rezultata, odnosno zabilježeno podcjenjivanje fitoplanktonske raznolikosti u uzorcima fitoplanktonske mreže jest i češća prisutnost potencijalnih inhibitora polimeraze u uzorcima mreže (Jane i sur., 2015; McKee i sur., 2015) čime je smanjena ili potpuno inhibirana uspješnost polimeraze u amplifikaciji barkod regije ukupne DNA svih uzorkovanih vrsta. Kemijski spojevi koji mogu smanjiti učinkovitost PCR amplifikacije ili u nekim slučajevima uzrokovati njezin potpuni neuspjeh iako je DNA zapravo prisutna u uzorku većinom su prisutni u obliku tanina ili huminskih kiselina (Braid i sur., 2003). U morskom okolišu, kompleksne huminske tvari glavni su poznati inhibitor PCR-a (Braid i sur. 2003.), iako je potrebno još mnogo istraživanja na tu temu. Takve tvari su češće prisutne u eutrofnim nego u oligotrofnim vodama, a povezane su i s visokim opterećenjem u sedimentima te plitkim morima koje sadrže puno organskog materijala (Schrader i sur., 2012) poput sjevernog Jadrana. Za očekivati je da se nakupljanje huminskih tvari, porijeklom od organskog materijala u vodenom stupcu, dodatno koncentrira u uzorku fitoplanktonske mreže što bi mogao biti jedan od čimbenika koji utječu na smanjenu uspješnost sekvenciranja uzoraka pa time i detekcije svih prisutnih vrsta iz fitoplanktonske mreže.

4.2.2 Optimizacija uzorkovanja fitoplanktonskom mrežom

Fitoplanktonska mreža je tradicionalno u istraživanjima fitoplanktonske zajednice odabrana metoda uzorkovanja za opis sastava zajednice cijelom dubinom vodenog stupca, ali pritom mreža selektira uzorkovanu zajednicu na temelju veličine oka mreže. Niskim crpac uzorkuje ukupnu zajednicu, bez veličinske selekcije, na točno određenoj dubini. S obzirom na ove različite osnovne karakteristike uzorkovanja fitoplanktonske zajednice između dviju metoda (mreža i crpac), optimalan pristup uzorkovanja za opis zajednice metabarkodiranjem, podrazumijevao bi korištenje obje metode za detaljan opis sastava i sezonske dinamike zajednice (Laza-Martínez i sur., 2007; Lombard i sur., 2019). Dodatno, za poboljšanje učinkovitosti dobivanja većeg broja sekvenci koje predstavljaju fitoplanktonsku zajednicu i time vjerniji prikaz fitoplanktonske raznolikosti prisutne u uzorku, potrebno je nadograditi korake obrade uzoraka prikupljenih fitoplanktonskom mrežom.

Također, univerzalna priroda 18S rRNA početnica dodatno može pospiješiti amplifikaciju zooplanktona ili drugih većih eukariotskih organizama u odnosu na fitoplankton. Jedan od načina kako bi se isključilo umnažanje ne-fitoplanktonskih skupina je korištenje početnica koje umnažaju regije kloroplastnih gena (primjerice *rbcL*, *psbA*) te su specifični za fotoautotrofne organizme, odnosno fitoplankton. Korištenjem specifičnih početnica, naglasak bi bio isključivo na fotoautotrofnom fitoplanktonu, dok bi informacija o ostalim skupinama morskog ekosustava izostala. Iz tog razloga, preporuka je korištenje više markera, ovisno o cilju istraživanja (Stoeck i sur., 2010; MacNeil i sur., 2022; Kezlya i sur., 2023).

Nadalje, metoda prikupljanja uzoraka pomoću fitoplanktonske mreže potencijalno ne omogućuje učinkovito zadržavanje manjih ili krhkih predstavnika fitoplanktonske zajednice. Kako bi se poboljšala reprezentativnost fitoplanktonske zajednice u uzorcima namijenjenima molekularnoj analizi, nužno je uvesti niz tehničkih prilagodbi koje ciljano testiraju problem selekcije uzrokovane metodologijom uzorkovanja i obrade uzoraka. Jedan od ključnih koraka u tom smjeru jest primjena mreža s manjom veličinom oka (npr. 10–20 μm), koje omogućuju zadržavanje manjih i osjetljivijih fitoplanktonskih organizama, uključujući nano-frakcije koje često izmiču detekciji prilikom standardnog mrežnog uzorkovanja. Time se značajno povećava vjerojatnost za uključivanje funkcionalno važnih vrsta, ali bez karakterističnih morfoloških obilježja konačni uzorak (Schmidt i sur., 2020; Seoane i sur., 2006).

U cilju optimizacije korištenja mreže za uzorkovanja fitoplanktonske zajednice u metabarkodiranju, važno je prilagoditi količinu biološkog materijala koja se nanosi na filter filtracijom mrežnog uzorka. Prevelika količina uzorka može rezultirati zasićenjem filtera i smanjenjem učinkovitosti ekstrakcije DNA, ali i mehaničkim oštećenjem stanica, osobito kod manjih i fragilnijih organizama te povećati koncentracije spomenutih huminskih spojeva kao inhibitora polimeraze prilikom reakcije umnažanja DNA (Djurhuus i sur., 2017; Ruan i sur., 2022). S druge strane, premala količina materijala može dovesti do nedostatne reprezentacije rijetkih ili manje zastupljenih taksona (Goldberg i sur., 2016). Stoga je precizna kalibracija volumena uzorka i trajanja filtracije ključna za postizanje ravnoteže između kvantitativnosti i kvalitete uzorka.

Dodatno, u cilju smanjenja udjela većih organizama, posebno zooplanktona koji zbog svoje veličine, biomase i višestanične građe dominiraju u skupu sekvenci za pojedini uzorak, preporučuje se uvođenje dvostruke filtracije (Jerney i sur., 2023). U ovoj strategiji uzorak se prvo provodi kroz predfilter većih pora (npr. 200 μm), čime se uklanjaju krupnije skupine, a zatim se filtrira na filteru manjih veličina pora koji cilja željeni fitoplanktonski raspon. Time bi se značajno smanjio rizik od pristranosti prema zooplanktonu i povećala razina detekcije fitoplanktonskih skupina (Lombard i sur., 2019).

Kombinacija ovih postupaka — smanjenje veličine mrežnih pora, optimizacija količine filtriranog materijala, te uvođenje predfiltracije — potencijalno može predstavljati učinkovit pristup za minimiziranje tehničkih artefakata u molekularnim istraživanjima fitoplanktona. Trenutno, fitoplanktonska mreža kao metoda uzorkovanja, korištena paralelno s Niskinovim crpcem može poslužiti za preliminarnu procjenu stanja fitoplanktonske zajednice, s naglaskom na skupine čije su stanice robustne i većih dimenzija.

Zaključno, dobiveni rezultati upućuju na to da je metoda uzorkovanja jedan od značajnih čimbenika u istraživanju fitoplanktona u morskom ekosustavu sjevernog Jadrana. Uzorkovanje Niskinovim crpcima pokazalo se kao učinkovitija metoda u pogledu detekcije ukupne raznolikosti i ravnomjernije učestalosti fitoplanktonskih skupina, dok je fitoplanktonska mreža pokazala ograničenja i pristranosti koje mogu dovesti do podcjenjivanja važnih sudionika ekosustava. No, u svrhu dobivanja cjelovite slike što će prikazati stanje cijelog vodenog stupca, predlaže se kombinacija obje metode čime će se osigurati pouzdanije praćenje fitoplanktonske zajednice i

bolje razumijevanje njenih promjena u kontekstu okolišnih čimbenika, klimatskih promjena i eutrofikacijskih pritisaka.

4.3 Procjena bioraznolikosti

4.3.1 Sezonska sukcesija i dinamika fitoplanktonske zajednice

Opširan skup podataka dobiven metabarkodiranjem uzoraka s 11 postaja na širem području sjevernog Jadrana tijekom tri godine korišten je kako bi se opisala sezonska sukcesija i dinamika fitoplanktonske zajednice istraživanih područja. U dobivenom skupu podataka, dinoflagelati su bili najraznolikija i najučestalija skupina u istraživanom razdoblju, predstavljajući gotovo polovicu svih detektiranih rodova i većinu fitoplanktonskih sekvenci, dok su dijatomeje bile druga najučestalija skupina. Najveća relativna učestalost fitoplanktonskih sekvenci kroz sve tri godine javlja se krajem godine (studeni, prosinac) zbog povećane zastupljenosti dijatomeja te u ljetnim mjesecima (lipanj-kolovoz) kada dominiraju dinoflagelati, dok je u proljeće (ožujak-travanj) i početkom jeseni (rujan) prisutan trend pada relativne učestalosti fitoplanktonskih sekvenci što odgovara rezultatima dobivenih na temelju svjetlosne mikroskopije (Aubry i sur., 2004; Marić i sur., 2012; Godrić i sur., 2013; Cerino i sur., 2019). Sezonske promjene u raznolikosti fitoplanktonskih rodova nisu izrazito naglašene tijekom godina, no uočava se smanjenje raznolikosti tijekom jeseni, dok se tijekom ljeta i zime bilježi porast raznolikosti. Obrazac pada raznolikosti tijekom jeseni zamijećen je kod svih istraživanih skupina, kroz sve istraživane godine što je također uočeno u prethodnim istraživanjima (Godrić i sur., 2013; Marić i sur., 2012; Viličić i sur., 2009).

Uočen je jasan sezonski obrazac u relativnoj učestalosti glavnih skupina. Dinoflagelati su pokazali izražen maksimum tijekom ljeta, dosežući 70–90% udjela u zajednici sredinom ljeta (lipanj – kolovoz) svake godine, dok su dijatomeje imale vrhunac u kasnoj jeseni, zimi i ranom proljeću. Ova opažanja u skladu su s klasičnom fitoplanktonskom godišnjom sukcesijom u Jadranu: cvatnje dijatomeja obično se javljaju krajem zime – u proljeće te ponovno u jesen nakon miješanja vodenog stupca, dok tijekom stratificiranog ljetnog razdoblja dominiraju dinoflagelati (Aubry i sur., 2004; Mozetić i sur., 2012). Relativnim udjelom posebno su se istaknuli rodovi poput *Gyrodinium*, *Karlodinium* i *Phalacroma* koji su dominirali u ljetnim mjesecima, s ponavljajućim sezonskim obrascima, dok je za kasno ljeto karakterističan bio *Gymnodinium*, a *Torodinium* za proljetno razdoblje. Dominacija parazitskih dinoflagelata poput najbrojnijeg roda *Aboebophyra*

karakteristična je za zimske i ranoproljetne mjesece. Povećana relativna učestalost heterotrofnih/parazitskih dinoflagelata u Jadranu primijećena je i kod istraživanja južnog Jadrana primjenom metabarkodiranja (Matek i sur., 2023 i Baričević i sur., 2024).

Na temelju relativne abundancije, Bacillariophyta predstavljaju važnu sastavnicu fitoplanktonske zajednice tijekom cijele godine, ali s izraženijim ulogama u zimskim i proljetnim mjesecima, osobito tijekom siječnja, veljače i ožujka svih godina, kada je relativni udio dosezao i do 20%. Ovaj porast u raznolikosti i relativnoj učestalosti u kasnoj jeseni povezuje se s nestankom termokline (miješanjem vodenog stupca) i povećanim dotokom nutrijenata, što omogućuje ponovni razvoj diatomeja (Aubry i sur., 2004; Godrijan i sur., 2013; Marić i sur., 2012).

Osim diatomeja i dinoflagelata, fitoplanktonsku zajednicu sačinjavale su i vrste iz skupina Chlorophyta, Cryptophyta i ostalih Ochrophyta koje su zbog svoje veličine (nano- i pikoplanktonska veličinska frakcija) ranije rijetko i nedovoljno opsežno istraživane (Massana, 2011; Not i sur., 2012; Vaulot i sur., 2008) pa je uspješna detekcija i opis rasprostranjenosti predstavnika ovih skupina, primjenom metabarkodiranja, od iznimne važnosti za razumijevanje ekologije ukupne fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana.

S obzirom na pokazanu sezonalnost, indeksi raznolikosti potvrđuju dobivene rezultate. Najviše vrijednosti Shannon indeksa javljaju se zimi ($3,096 \pm 0,347$) i u proljeće ($3,034 \pm 0,521$), dok su tijekom jesenskih i ljetnih mjeseci ($2,702 \pm 0,641$ i $2,446 \pm 0,784$) vrijednosti niže. U više navrata tijekom ljeta i jeseni, vrijednosti su padale ispod 5, što ukazuje na snažnu neravnotežu u sastavu zajednica. Ti podaci pokazuju ekstremne sezonske kontraste u broju dominantnih vrsta, gdje su ljetni mjeseci ($6,921 \pm 5,586$) dosljedno povezani s niskim efektivnim brojem taksona, dok proljeće ($12,397 \pm 5,409$) i zima ($11,296 \pm 4,188$) ukazuju na višestruku dominaciju i veću strukturnu složenost zajednice. Također, rezultati NMDS analize ukazuju na jasnu sezonsku sukcesiju fitoplanktonske zajednice u sjevernom Jadranu, s izraženim razlikama u sastavu zajednice u uzorcima prikupljenima tijekom različitih sezona. Uočeno je djelimično preklapanje između prijelaznih perioda, tijekom travnja (proljeće) i srpnja/rujna (ljet/jesen), što sugerira dinamične promjene u sastavu zajednice tijekom godine koje odražavaju tipične sezonske obrasce u obalnim ekosustavima umjerenih područja. Ovakav obrazac odgovara poznatim sezonskim ciklusima u Jadranskom moru, koji su pod utjecajem ciklusa miješanja i stratifikacije, promjena

dostupnosti hranjivih tvari te varijacija u temperaturi i svjetlu (Cabrini i sur., 2012; Mozetič i sur., 2012; Cerino i sur., 2019).

Tijekom trogodišnjeg razdoblja zabilježene su i značajne međugodišnje razlike u sastavu zajednica. Primjerice, 2022. godina bila je obilježena povećanom prisutnošću roda *Dinophysis*, dok su *Protoperidinium* i *Ceratoperidinium* bili dominantniji u 2020. Zabilježena je veća učestalost rodova *Noctiluca* u travnju 2020. i 2021. te *Alexandrium*, tijekom svibnja, 2021. (19,22%). Također, rod *Dinophysis* tijekom 2020. i 2022. pokazao je izraženu prisutnost tijekom jeseni, dok se tijekom 2021. njegova pojava bilježi u ljetnim mjesecima. Povećana učestalost dijatomejskog roda *Leptocylindrus* u 2021. bilježi pomak u jesen u odnosu na ostale dvije godine kada su povećani udjeli karakteristični za ljetne mjesece. Rod *Pseudo-nitzschia* pokazao se najučestaliji tijekom ljetnih mjeseci kroz sve istraživane godine, ali u visokim abundancijama zabilježen je početkom 2020. U slučaju Chlorophyta, tijekom 2020. i 2022. godine, zabilježili su višu učestalost u veljači i ožujku u odnosu na 2021. PERMANOVA je potvrdila, iako umjeren, statistički značajan utjecaj godine ($R^2 = 0,046$, $p < 0,001$). Ova varijabilnost može biti povezana s godišnjim razlikama u intenzitetu miješanja, temperaturi, oborinama ili dotoku nutrijenata (Aubry i sur., 2012; Giani i sur., 2012b; Marić i sur., 2012; Cibic i sur., 2018). Primjerice, toplije ljeto 2022. moglo je omogućiti produljenu stratifikaciju i time pogodovati dominaciji dinoflagelata. Slični nalazi zabilježeni su u dugogodišnjim analizama (Marić i sur., 2012; France i sur., 2021), koje ukazuju na promjene u sezonalnosti i povećanu prisutnost dinoflagelata tijekom toplijih godina. S obzirom na sve učestalije klimatske ekstreme, zabilježene promjene u sastavu fitoplanktona mogu biti indikator šireg pomaka u ekološkom režimu sjevernog Jadrana. Sustavno praćenje u budućnosti te prikupljanje dugoročnih podataka metabarkodiranjem bit će ključno za razumijevanje trendova i predikciju promjena u fitoplanktonskim zajednicama sjevernog Jadrana.

4.3.2 Prostorna dinamika fitoplanktonske bioraznolikosti

Usporedbom između bliskih postaja RV001 i RV004, razlike bile su osobito izražene tijekom jeseni na dubini od 20 m, gdje su svi indeksi ukazivali na veću raznolikost i ravnomjernost zajednica na RV001. Kruskal-Wallis testom potvrđene su statistički značajne razlike između postaja isključivo tijekom jeseni na dubini od 20 m za sve indekse. Također, uspoređeni su rezultati dobiveni uzorkovanjem na postajama LTRV (RV001 i RV004) i postaji SJ108 terenskog uzorkovanja PO dobiveni Niskinovim crpcima. Sastav zajednica na postaji SJ108 pokazuje slične

obrasce dinamike fitoplanktonskih zajednica kao i postaje terenskog uzorkovanja LTRV. Skupina Dinophyta je bila dominantna grupa tijekom cijelog ispitivanog razdoblja, dok su druge grupe poput Bacillariophyta, Cryptophyta, Chlorophyta i Haptophyta bile povremeno prisutne i uglavnom manje zastupljene. Provedena je nMDS analiza kako bi se pokazala strukturna raznolikost između udaljenijih postaja. Rezultati ukazuju na izražene sezonske obrasce u sastavu zajednice, ali suprotno tome, prostorna komponenta pokazuje manju ulogu u oblikovanju zajednica. Usporedba među postajama (SJ108 vs. RV001/RV004) pokazala relativno homogenu strukturu fitoplanktonskih zajednica unutar istih sezona: sezonske skupine uzoraka preklapale su se među postajama, dok se ljetni uzorci svih postaja grupiraju odvojeno od zimskih. Najveća razlika uočena je između zajednica postaja SJ108 i RV001, što može odražavati nešto različite utjecaje obalne cirkulacije. Razlog tome je veća disperzija uzoraka s postaje SJ108 kao posljedice nekolicine uzorkovanja, ali je u skladu s ograničenim horizontalnim gradijentima u priobalnim dijelovima sjevernog Jadrana, osobito tijekom razdoblja stabilne stratifikacije (Marić i sur., 2012). No općenito gledano, fitoplankton sjevernog Jadrana čini koherentnu regionalnu cjelinu unutar koje sezonske promjene nadilaze one prostorne – što je važno za interpretaciju ekologije ovog dinamičnog područja sjevernog Jadrana. Stoga, iako nema statistički značajne razlike između SJ108 i RV001 ($p = 0,101$), uočen trend podržava potrebu za daljnjim istraživanjem lokalne heterogenosti između navedenih postaja.

Iako je pokazano da je detekcija fitoplanktonskih zajednica fitoplanktonskom mrežom djelimično ograničavajuća, rezultati metabarkodiranja mrežnih uzoraka sjevernog Jadrana ukazali su na prostorne razlike u sastavu zajednice. Postaje kvarnerskog dijela sjevernog Jadrana te najsjevernija postaja ZI012 zapadne istarske obale pokazale su najveću razliku u odnosu na druge postaje koje se nalaze na području zapadne obale Istre. Te razlike nisu statistički značajne ($p > 0,05$), osim u slučaju postaja južnijeg djela sjevernog Jadrana, RI019 i JPA23 i postaja terenskog uzorkovanja LTRV kada su razlike u sastavu fitoplanktonskih zajednica bile značajne. Navedene kvarnerske postaje poznate su po svojim oligotrofnim obilježjima (Viličić i sur., 2009).

Usporedba vertikalne raspodjele uzoraka iz podpovršinskog (5 m) i dubljeg sloja (20 m) pokazala je ograničene, ali mjerljive razlike u sastavu zajednica, prvenstveno tijekom ljeta i jeseni tijekom izrazite stratifikacije, posebice na postaji SJ108. Ipak, alfa raznolikost između dubina nije bila statistički značajna (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$), što sugerira relativnu vertikalnu homogenost

fitoplanktonskih zajednica u promatranom sloju vodenog stupca. Tijekom ljetne stratifikacije, uočene su blage razlike u raspodjeli pojedinih rodova: npr. *Cryptomonas* i *Minidiscus* bili su prisutniji na 20 m, dok su *Tetraselmis* i *Prymnesium* dominirali na 5 m. Ovi rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima sjevernog Jadrana, koja pokazuju da u plićim područjima dominantni fizički procesi omogućuju vertikalnu homogenizaciju zajednice, osim u uvjetima izrazite stratifikacije. Uzorci su grupirani prema dubini vodenog stupca, pri čemu su uzorci s 20 metara dubine pokazali veću međusobnu sličnost, dok su uzorci s 5 metara pokazivali veću prostorno-vremensku varijabilnost. Takva značajnija disperzija uzoraka s postaje SJ108 odražava lokalne fizičko-kemijske specifičnosti, poput povremenog utjecaja riječnih unosa, promjene saliniteta ili hidrografskih diskontinuiteta koji su karakteristični za ova područja. Također, promatrajući Shannon indeks, vidljivo je da su pojedine postaje poput RV001 u jeseni imale nešto niže p-vrijednosti ($p = 0,085$), ali niti jedna usporedba nije dosegla statističku značajnost. Simpson indeks pokazao je sličan obrazac. Sve usporedbe po dubinama unutar sezona i postaja dale su rezultate koji nisu statistički značajni, što implicira da dubina nije presudna za dominaciju vrsta u ovom skupu podataka. Ukupno gledano, rezultati potvrđuju da je sezonska sukcesija dominantan mehanizam u oblikovanju fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana (Cerino i sur., 2019; Godrić i sur., 2013), dok prostorne razlike, iako prisutne, igraju sekundarnu ulogu. Ovakva dinamika usklađena je s višegodišnjim opažanjima iz sjevernojadranskih istraživanja, gdje su fitoplanktonske zajednice pod jakim utjecajem sezonskih ciklusa produkcije i vertikalnog miješanja, uz povremene lokalne perturbacije (Cabrini i sur., 2012; Cloern i Jassby, 2010; Mozetić i sur., 2012).

4.3.3 Uspješnost metabarkodiranja u detekciji vrsta od ekološkog značaja

Kao skupine od posebnog ekološkog značaja smatraju se skupine, odnosno vrste za koje se zna da mogu uzrokovati štetu u ekosustavu u kojem se nalaze (HAB vrste). HAB vrste uključuju rodove čiji predstavnici mogu imati sposobnost proizvodnje toksičnih spojeva te vrste koje se mogu razmnožiti u prekomjernim abundancijama te na taj način narušavati ekološku ravnotežu cjelokupne zajednice. U metabarkodiranom skupu za sjeverni Jadran detektirano je ukupno 59 fitoplanktonskih taksona koji se prema UNESCO IOC HAB listi ubrajaju u štetne ili potencijalno toksične vrste. Time je potvrđeno da značajan dio fitoplanktonske zajednice ($\approx 13\%$ sekvenci) čine HAB vrste. Dinoflagelati su bili najzastupljenija skupina s HAB vrstama; 39 od 59 taksona pripadaju dinoflagelata, što čini $\sim 77\%$ svih HAB sekvenci u skupu podataka.

Vrsta dinoflagelata *Karlodinium venefericum* zabilježen je kao kozmopolitska vrsta mora umjerenog područja. U obalnom području njemačkog Sjevernog mora proglašen je invazivnom vrstom (H. Wang i sur., 2011). Iako pripada frakciji nanoplanktona, zastupljen u velikim abundancijama u fitoplanktonskoj mreži. Prema definiciji pokazatelja stanja morskog okoliša (Cvitković i sur., 2018), rezultati ukazuju na cvatnju ovog roda u metabarkodiranom uzorku na postaji CR001 u lipnju 2021. (uzorak PO91). U još nekoliko uzoraka abundancija ovog roda približila se udjelu od 50%. Rod *Karlodinium* prema rezultatima analize sustavnog praćenja u istraživanim uzorcima u razdoblju 2020. – 2022., nije detektiran mikroskopijom. Razlog visoke abundancije može se vjerojatno pripisati pristranostima metode prema dinoflagelatima, radi čega je potrebno dobivene rezultate učestalosti cvatnji iz rezultata metabarkodiranja uzeti s oprezom, te uzeti u obzir izmjerenu koncentraciju klorofila *a*, čije vrijednosti mogu biti dobar pokazatelj cvjetanja mora iako je pokazano da veza koncentracije klorofila *a* i abundancije fitoplanktona ne moraju biti statistički značajne (Eker-Develi i sur., 2022; Skejić i sur., 2024).

Vrsta *K. venefericum* iz roda *Karlodinium*, za koje je poznato da mogu uzrokovati cvjetanja mora koja se povezuju s pomorima riba u uzgajalištima (Adolf i sur., 2015; Deeds i sur., 2002). Adolf i sur., 2009 ukazali su na karlotoksin izoliran iz kultura *K. veneficum*. Ovaj toksin ne igra samo važnu ulogu u životnom ciklusu same vrste, već također utječe na formiranje i/ili postojanost cvjetanja. Dodatno, rod *Karlodinium* nije prisutan u referentnoj bazi pr2 (verzija 5.1.0), što onemogućava detekciju, iako je pr2 predložena kao jedna od referentnih baza za sustavno praćenje fitoplanktona u nacionalnim programima (Jerney i sur., 2023), čime se dodatno naglašava potreba za kvalitetnim i potpunim referentnim bazama podataka. U analizama nacionalnog programa praćenja, zabilježene su vrste iz roda *Karenia* (*K. papilionacea* i *Karenia* sp.), koja zajedno s rodом *Karlodinium* pripadaju porodici Kareniaceae.

Iako su ranije prikazana ograničenja za uzorkovanja fitoplanktonskom mrežom zbog smanjene brojnosti fitoplanktonskih sekvenci u uzorcima, pokazana je statistički značajno viša razlika u udjelu detektiranih HAB sekvenci u fitoplanktonskoj mreži u odnosu na crpce. U fitoplanktonskoj mreži najčešće su zabilježene vrste rodova *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Gonyaulax*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Lingulodinium*, *Noctiluca*, *Phaeocystis*, *Prorocentrum*, kao i dijatomeje iz roda *Pseudo-nitzschia*. Iako su ovo rezultat uzoraka prikupljenih fitoplanktonskom mrežom, za koju je pokazano da ima slabiju sposobnost detekcije u odnosu na crpce, mreža se pokazala učinkovitom

za detekciju ekološki važnih vrsta, čak i kada su stanice manje od veličine oka fitoplanktonske mreže.

Što se tiče štetnih ali ne nužno toksičnih fitoplanktonskih vrsta, i tu dominiraju dinoflagelati. *Noctiluca scintillans* je, zbog svoje visoke brojnosti u setu podataka, očekivano, najistaknutiji predstavnik – njezine su sekvence činile oko 9% svih HAB sekvenci (i ~28% sekvenci ne-toksičnih štetnih vrsta). Doprinos roda *Noctiluca* povijesno je dobro dokumentiran u sjevernom Jadranu, osobito tijekom toplih proljetnih razdoblja visoke proizvodnje (Bernardi Aubry i sur., 2006). Primjerice, tijekom 1970-ih i 80-ih učestale pojave roda *Noctiluca* pratile su eutrofne uvjete i rezultirale bioluminiscentnim “cvjetanjem mora”. Rezultati metabarkodiranja potvrđuju da *Noctiluca* i dalje igra važnu ulogu u ekosustavu (2020.–2022.) kada je bila redovito detektirana i povremeno izrazito brojna, posebice u uzorcima iz travnja 2020. i 2021., potvrđujući učestalost njegovih proljetnih proliferacija u ovom dijelu Jadrana.

Također, vrste od osobitog značaja su i novouvedene, potencijalno invazivne vrste (Occhipinti-Ambrogi i Galil, 2004). Kao i mnoge druge države, Hrvatska se također susreće s rastućim problemom uvođenja novih vrsta u istočnom dijelu Jadranskog mora, neovisno o tome radi li se o ljudskom utjecaju ili posljedici klimatskih promjena (Mandić i sur., 2019; Mozetić i sur., 2019; Palinkas i sur., 2020; Slišković i sur., 2021). Jedan od ciljeva bio je ispitati omogućava li metabarkodiranje detekciju ekološki značajnih svojti, koje mogu imati negativne posljedice na ekološki sustav, poput toksičnih i nezavičajnih svojti u zajednici eukariotskog fitoplanktona sjevernog Jadrana. Takve vrste su jedan od deskriptora dobrog stanja morskog okoliša te su kao takve uključene u programe sustavnog praćenju obalnog područja RH (Viličić, 1989; Ninčević-Gladan i sur., 2015; Mozetić i sur., 2019). Navode se mnogi popisi stranih i invazivnih vrsta koji zahvaćaju područje europskih mora (Streftaris i Papathanassiou, 2005; Gómez, 2008; Katsanevakis, 2020; Tsirintanis i sur., 2022). Međutim, s obzirom na karakteristike molekularnih metoda da imaju sposobnost detekcije vrsta i skupine koje nije bilo moguće detektirati svjetlosnom mikroskopijom, može se govoriti isključivo o vrstama, odnosno taksonima koji su novozabilježeni, odnosno nisu navedeni popisima vrsta (Viličić i sur., 2002) i u bazama detektiranih vrsta prilikom sustavnog praćenja. Metabarkodirani set podataka omogućio je dosad najdetaljniji uvid u taksonomsku raznolikost fitoplanktona sjevernog Jadrana; 275 taksona novozabilježenih za sjeverni Jadran, što čini oko 45% svih detektiranih fitoplanktonskih taksona u istraživanom skupu.

Ovaj izniman porast znanja o biološkoj raznolikosti u odnosu na klasične monitore posljedica je visoke osjetljivosti molekularne metode, koja otkriva i one organizme koje mikroskopom nije bilo moguće razlikovati ili uočiti (vrlo male, kriptične, rijetke vrste). Dodatno, primjenom metabarkodiranja, potvrđena je i prisutnost vrste *Mediolabrus comicus*, pripadnika roda *Mediolabrus*, koji je nedavno taksonomski izdvojen iz roda *Minidiscus* kao samostalan rod (Li i sur., 2020). Također, značajna je detekcija rodova poput *Bathycoccus*, *Micromonas* i *Ostreococcus* koje značajno doprinose primarnoj produkciji (Worden, 2006; Collado-Fabbri i sur., 2011; Simmons i sur., 2016), ali pripadaju frakcijama koje nije moguće detektirati svjetlosnom mikroskopijom. Ovakvi nalazi naglašavaju značaj molekularnih pristupa u otkrivanju malih i kriptičnih vrsta te njihov potencijal kao ključnog alata u taksonomskoj reviziji i unapređenju razumijevanja bioraznolikosti fitoplanktona (Kermarrec i sur., 2013). Metabarkodiranje pruža detaljniji uvid u taksonomski sastav fitoplanktona što ima za posljedicu otkrivanje nove bioraznolikosti koja još nije primjećena standardnim metodama, što je također potvrđeno i u (Neri i sur., 2024). Metabarkodiranje stoga djeluje kao ranije upozorenje na prisutnost potencijalno opasnih vrsta, čak i kada one brojčano još nisu dominantne. To potvrđuje i zaključak Neri i sur. (2025) koji ističu da je molekularni pristup vrijedan dodatak sustavnom praćenju jer omogućuje prepoznavanje kriptičnih, pseudokriptičnih i slabo zastupljenih – često toksičnih – vrsta koje bi inače ostale nezamijećene.

4.4 Primjena metabarkodiranja u okviru programa sustavnog praćenja

4.4.1 Procjena biološkog stanja u sustavnom praćenju metodom metabarkodiranja

Set rezultata o brojnosti i sastavu fitoplanktonskih zajednica dobivenih metabarkodiranjem i svjetlosnom mikroskopijom na dvije postaje terenskog uzorkovanja LTRV na dvije uzorkovane dubine (5 i 20 m) korišten je za procjenu učinkovitosti metabarkodiranja u sustavnom praćenju i procjene bilološke kakvoće priobalnih voda. Jedna od najuočljivijih razlika između metabarkodiranja i mikroskopije mnogo je veći broj otkrivenih taksona (vrsta ili rodova) metodom metabarkodiranja. U gotovo svim uzorkovanjima metabarkodiranje je otkrilo više taksona nego klasična mikroskopija, izuzev jednog slučaja (kolovoz 2020.) kada su metode dale usporediv broj vrsta što je u skladu su s brojnim svjetskim istraživanjima koja potvrđuju da metabarkodiranje pruža znatno veću taksonomsku razlučivost i bogatstvo vrsta (Abad i sur., 2016; Santi i sur., 2021; Andersson i sur., 2023; Almandoz i sur., 2024; Neri i sur., 2024; Weydmann-Zwolicka i sur., 2024).

Jedan od razloga je što mikroskopska analiza može propustiti vrlo rijetke vrste zbog ograničenog volumena analizirane vode. Uobičajeno se za mikroskopsku analizu taloži 10–50 mL uzorka, od čega se često broji tek dio komore (npr. nekoliko transekata što odgovara efektivnom volumenu od ~0,1–2 mL) (Utermöhl, 1958). Nasuprot tome, uzorak metabarkodiranja temelji se na fitoplanktonskom sastavu u 2,5 L morske vode, čime je višestruko povećana vjerojatnost za detekciju rijetkih taksona. To objašnjava kako je metabarkodiranjem u sjevernom Jadranu pronađeno čak 275 taksona koji prethodno nisu bili zabilježeni standardiziranim metodama temeljenih na mikroskopiji (novozabilježene vrste za to područje). Sličan trend bilježe i istraživanja drugdje – veći volumen uzorka i veća osjetljivost DNA metode omogućuje otkrivanje rijetkih vrsta ili vrsta koje pripadaju malim veličinskim frakcijama koje mogu izmaknuti u mikroskopiranom uzorku te kriptične vrste koja ne pokazuju dovoljno morfoloških razlika za mikroskopsku determinaciju na razini vrste (Piredda i sur., 2017; Gran-Stadniczeňko i sur., 2019; Bilbao i sur., 2023).

Jedno od ključnih ograničenja metabarkodiranja u kontekstu ekoloških indeksa nemogućnost je izravnog dobivanja apsolutne brojnosti (broja stanica po litri) pojedinih taksona te brojnost fitoplanktona u obliku stvarnog broja stanica nije mogla biti izračunata iz podataka metabarkodiranja. Također, relativna zastupljenost sekvenci pojedinog taksona odražava nužno njihovu stvarnu brojnost ili biomasu u zajednici. To je posljedica činjenice da broj sekvenci (odnosno broj kopija gena 18S rRNA) ne odgovara broju stanica u uzorku. Različite vrste imaju različit broj kopija cilnog gena po stanici (primjerice, veliki dinoflagelati posjeduju tisuće kopija ribosomskih gena, dok manji fitoplanktonski organizmi mogu imati svega nekoliko kopija) (Andersson i sur., 2023; C. Wang i sur., 2024). Slično je primjećeno i u istraživanom setu podataka; omjer sekvenci pridruženih koljenu Bacillariophyta naspram Dinophyta bio je redovito znatno manji od omjera broja stanica tih skupina dobivenog mikroskopijom. Visoki omjeri Bacillariophyta/Dinophyta u mikroskopskim podacima ukazuju na pretežitu dominaciju dijatomeja, dok metabarkodiranje sugerira obrnuto, dinoflagelati gotovo uvijek čine veći udio od dijatomeja (omjer Bacillariophyta/Dinophyta ~0,1). U nekim studijama pokazano je da, uz određene korekcije, relativne učestalosti broja sekvenci mogu približno odražavati relativnu biomasu skupina u uzorku. Primjerice, Andersson i sur. (2023) pokazali su razmjerno dobro slaganje učestalosti pojedinih skupina procijenjenih metabarkodiranjem s njihovim udjelom u ukupnoj biomasi fitoplanktona, što upućuje na to da bi se relativne učestalosti dobivene

metabarkodiranjem potencijalno mogle kalibrirati za kvantitativnije analize. Martin i sur., (2022) predlažu faktore korekcije broja kopija gena te stvaranje baze podataka o broju kopija gena za 18S fitoplanktonskih vrsta/skupina što bi moglo unaprijediti točnost kvantitativnih procjena i učiniti metabarkodiranje robustnijim alatom za praćenje fitoplanktonskih zajednica. U praksi, za sada se u ekološkim indeksima koristi kombinacija metabarkodiranja s nekom kvantitativnom mjerom – u slučaju MPI indeksa to je koncentracija klorofila *a*, koja služi kao zamjenska mjera biomase fitoplanktona.

Jedan od važnih ciljeva sustavnog praćenja također je pravovremena detekcija potencijalno štetnih ili toksičnih vrsta, koje mogu uzrokovati cvjetanje štetnih algi i negativno utjecati na ekosustav ili zdravlje ljudi (npr. vrste koje proizvode toksine što se akumuliraju u školjkašima). U provedenoj usporednoj analizi, metabarkodiranje se pokazalo osjetljivijim za otkrivanje takvih vrsta u odnosu na klasičnu mikroskopiju. Na postaji RV001, metabarkodiranjem je po uzorku detektirano oko 15 taksona koji su poznati kao štetni ili toksični (HAB vrsta), dok je mikroskopija u prosjeku bilježila oko 2 taksona po uzorku. Sličan omjer uočen je i na drugoj postaji (RV004: ~13 u usporedbi s ~2 taksona po uzorku). Ukupno je metabarkodiranjem tijekom istraživnog razdoblja detektirano 59 različitih taksona koji se ubrajaju u štetne/otrovene fitoplanktonske vrste, u odnosu na 20 taksona takvih vrsta zabilježenih mikroskopijom. Samo 9 taksona iz ove skupine identificirano je objema metodama istovremeno, što znači da je svaka metoda otkrila jedinstvene HAB taksona. S obzirom na to da su oba pristupa djelimično preklapali u detekciji HAB taksona, upućuje na komplementarnost dviju metoda. Dakle, metabarkodiranje rutinski pronalazi mnoge organizme koji ostaju nezabilježeni klasičnom mikroskopijom, ali i obrnuto, zbog čega je poželjno kombinirati metode radi potpunije slike zajednice kako je predloženo u Neri i sur., 2024.

4.4.2 Multiparametrijski indeks fitoplanktona

Multiparametrijski indeks fitoplanktona (MPI) definiran je prema Facca i sur. (2014) te je prvotno razvijen i testiran na višegodišnjim nizovima podataka za Venecijansku lagunu, gdje je potvrđeno da MPI konzistentno odražava gradijent antropogenog opterećenja ekosustava te se računa kao kombinacija četiri komponente: (1) Hulburtov indeks dominacije, (2) učestalost cvatnji, (3) Menhinickov indeks raznolikosti na razini vrsta i (4) koncentracija klorofila *a*. Svaki od ovih pokazatelja računa se u odnosu na referentno stanje (područje niskog antropogenog utjecaja) (Cvitković i sur, 2018). Iako se metoda metabarkodiranja u svojim metodološkim koracima

razlikuje od trenutačno prihvaćene metode za procjenu bioraznolikosti fitoplanktonskih zajednica Jadrana, moguća je djelomična prilagodba protokola za izračunavanje indeksa/pokazatelja za ocjenu ekološkog stanja temeljenog na metabarkodiranju na unaprijed određenim mjernim postajama nacionalne mreže sustavnog praćenja za RH.

Jedan od pokazatelja stanja dobrog okoliša je učestalost cvatnji, odnosno koliko puta je abundancija jedne vrste premašila 50% ukupne abundancije te ako je njena brojnost veća od 5×10^5 stanica L^{-1} . Već je spomenuto da rezultat metabarkodiranja ne može dati apsolutni broj stanica u uzorku, već samo relativne vrijednosti na temelju ukupnog uzorka. U trogodišnjem nizu mikroskopskih podataka identificirana su tri uzorka koja zadovoljavaju kriterije cvjetanja: studeni 2021. na postaji RV004 (5 i 20 m dubine) s masovnom pojavom kompleksa vrsta *Nitzschia delicatissima* ($>5 \times 10^5$ stanica L^{-1} , $>80\%$ udjela) te listopad 2022., na postaji RV001 (5 m) s pojavom vrste *Chaetoceros socialis* ($\sim 5,3 \times 10^5$ stanica L^{-1} , 87% udjela). S druge strane, metabarkodiranje zbog nedostatka apsolutnih brojnosti zahtijeva drugačiji pristup: prag cvatnji definiran je kao slučaj da relativna abundancija jedne vrste prijeđe 50% u uzorku te da je istodobno u tom uzorku izmjerena koncentracija klorofila *a* iznad granične vrijednosti za eutrofno stanje ($1,092 \mu g L^{-1}$ prema kriterijima MPI indeksa). Prema ovim kriterijima, u metabarkodiranim podacima nisu zabilježeni uzorci s karakteristikama cvatnji u promatranom razdoblju – niti u jednom uzorku klorofil *a* nije prešao dogovorenu granicu. Ipak, vrijedno je spomenuti da je u čak 20 uzoraka ($\approx 17\%$) jedna jedina vrsta činila preko 50% sekvencijske relativne abundancije (najčešće dinoflagelat, osobito vrste iz roda *Gymnodinium*). U praksi, metabarkodiranje može biti korisno za kvalitativno otkrivanje prisutnosti potencijalno cvjetajućih vrsta (kao što je ranije spomenuto za HAB taksone), ali kvantifikacija učestalosti cvatnji zahtijeva dodatnu prilagodbu za uspješnu primjenu na temelju rezultata metabarkodiranja.

Rezultati pokazuju znatne razlike u vrijednostima Menhinickovog indeksa između metoda. U svim analiziranim uzorcima indeks je bio osjetno viši kada je izračunat na temelju metabarkodiranja u odnosu na mikroskopiju. Kod mikroskopskih analiza vrijednosti su se kretale od 0,032 do 0,21, dok je za metabarkodiranje raspon bio znatno širi, od 0,34 do 2,46. Ovi rezultati odražavaju činjenicu da metabarkodiranje otkriva znatno veći broj taksona, što dovodi do povišenih vrijednosti Menhinickovog indeksa. Posljedično, metabarkodiranjem se fitoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana čine višestruko raznolikijima od referentnog „netaknutog“ stanja, što nije realna

slika, već posljedica metodoloških razlika između dvije uspoređivane metode, stoga se referentne vrijednosti indeksa raznolikosti dobivene klasičnim pristupom ne mogu izravno primjenjivati na podatke metabarkodiranja bez prethodne prilagodbe.

Za metabarkodiranje, prosječan ukupni MPI kroz tri godine iznosio je 12,46, u odnosu na 1,99 za mikroskopiju. Ova značajna razlika posljedica je prethodno opisanog skoka u Menhinickovom indeksu raznolikosti za metabarkodiranje. Svi MPI vrijednosti na temelju metabarkodiranja bile su $\gg 1$, sugerirajući izvrsno stanje, bez obzira na godinu ili postaju. Ovakav rezultat nije odraz realnosti nego metodološke neusporedivosti rezultata dobivenih metabarkodiranjem u odnosu na mikroskopiju. Stoga je potrebno definirati određene prilagodbe za rezultate metabarkodiranja u postojeće indekse.

Izuzme li se iz konačnih rezultata utjecaj visokih vrijednosti Menhinickovog indeksa, 2021. godini metabarkodiranje je pokazalo vrijednosti blago ispod referentnih MPI (0,93 na RV001 i 0,98 na RV004), što implicira nešto lošije stanje te godine, dok su mikroskopske vrijednosti za 2021. bile tek malo iznad 1 (1,15 i 1,18). Obje metode su, međutim, konzistentno pokazale pad indeksa u 2021. u odnosu na 2020. i 2022. godinu. To upućuje da su relativne promjene ekološkog stanja kroz vrijeme do određene mjere ipak zabilježene metabarkodiranjem u odnosu na mikroskopiju, barem kada se ukloni komponenta koja unosi najveću metodu razliku. Drugim riječima, signali pogoršanja (pad MPI 2021.) i poboljšanja (rast 2022.) opaženi su u obje varijante indeksa, za metabarkodiranje i mikroskopiju, premda s različitim intenzitetom.

S obzirom na sve navedeno, kao najbolji pristup predlaže se kombinacija metoda: paralelna primjena metabarkodiranja i mikroskopije može iskoristiti prednosti obje metode (Groendahl i sur., 2017; Santi i sur., 2021; Neri i sur., 2024). Takvo integrirano sustavno praćenje potencijalno bi zadovoljilo standarde MSFD, koje potiču korištenje najboljih dostupnih znanstvenih alata za evaluaciju ekološkog stanja. Istraživanja već pokazuju da se DNA metabarkodiranje može uspješno uklopiti u programe praćenja planktona kao dopunska metoda za procjenu bioraznolikosti i rane detekcije promjena (Çevik i Çevik, 2025; Iacaruso i sur., 2025). Za potpunu integraciju u indekse, nužno je provesti opsežnu kalibraciju i standardizaciju – uključujući razvoj referentnih uvjeta za metrike temeljene na metabarkodiranju, uzimajući u obzir regionalne specifičnosti. Unatoč trenutnim izazovima, metabarkodiranje predstavlja dodanu vrijednost u istraživanju i

sustavnom praćenju fitoplanktona, te uz odgovarajuću validaciju može znatno unaprijediti ocjenu ekološke kakvoće morskih sustava, uključujući osjetljivi i dinamični sjeverni Jadran.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata metabarkodiranja fitoplanktonskih zajednica sjevernog Jadrana sustavnim uzorkovanjima kroz vrijeme od tri godine korištenjem dvije različite metode uzorkovanja te primjenom cjelovite i kurirane referentne baze za bioinformatičku analizu, uzimajući u obzir postavljene hipoteze istraživanja, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- ❖ Opsežna i provjerena referentna baza, obogaćena reprezentativnim sekvencama iz ciljanog ekološkog područja, uz jasno razumijevanje metodoloških ograničenja povezanih s regijom koju predstavlja, ključna je za pouzdanu taksonomsku anotaciju fitoplanktonskih sekvenci. Unatoč tome što sadrži manji broj sekvenci u odnosu na opsežnije baze poput referentne baze Silva, kurirana referentna baza CIMphy18 znatno je povećala učinkovitost taksonomske raznolikosti i razlučivosti prilikom analiza bioraznolikosti.
- ❖ Utvrđeno je da način uzorkovanja značajno utječe na detekciju fitoplanktonske bioraznolikosti sjevernog Jadrana te da uzorkovanje Niskinovim crpcima pokazuje znatno veću brojnost fitoplanktonskih sekvenci i veću raznolikost detektiranih fitoplanktonskih skupina, unatoč činjenici da obuhvaća samo ograničeni dio vodenog stupca
- ❖ Metoda metabarkodiranja pokazala se kao prikladan pristup za analizu bioraznolikosti fitoplanktonskih zajednica sjevernog Jadrana, omogućavajući opis prostorno-vremenskih obrazaca distribucije fitoplanktonskih zajednica sjevernog Jadrana
- ❖ Metodom metabarkodiranja opisane su promjene u sezonalnosti fitoplanktonskih zajednica koje su usporedive s poznatim sezonalnostima za područje sjevernog Jadrana
- ❖ Uvođenjem metabarkodiranja u istraživanje fitoplanktonskih zajednica sjevernog Jadrana utvrđen je veći broj štetnih i/ili toksičnih taksona te obrasci njihove sezonalne dinamike što predstavlja značajno unapređenje u praćenju stanja okoliša.

- ❖ Uvođenjem metabarkodiranja u istraživanje fitoplanktonskih zajednica omogućio je detekciju vrsta za koje još nije zabilježena pojavnost na području sjevernog Jadrana, što je omogućilo uvid u mnogo širi spektar raznolikosti i dinamike Fitoplanktona sjevernog Jadrana što predstavlja značajno unapređenje u praćenju stanja okoliša
- ❖ Unatoč slabijoj sposobnosti fitoplanktonske mreže u detekciji širokog spektra fitoplanktonskih skupina, metoda se pokazala učinkovitom u prepoznavanju ekološki značajnih vrsta – poput toksičnih taksona i onih koje uzrokuju cvjetanje mora, osobito rodova *Alexandrium*, *Dinophysis* i *Pseudo-nitzschia* – koji služe kao deskriptori dobrog stanja morskog okoliša.
- ❖ Nemogućnost apsolutne kvantifikacije prilikom metabarkodiranja otežava izračunavanje trenutačno prihvaćenih pokazatelja za ocjenu ekološkog stanja te zahtjeva prilagodbu Multiparametrijskog indeksa fitoplanktona koji se koriste u aktualnom programu sustavnog praćenja
- ❖ Pravilan izbor metodoloških koraka, od načina uzorkovanja do izbora referentne baze i bioinformatičke obrade te njihova standardizacija prilikom korištenja metode metabarkodiranja ključna je za postizanje najučinkovitijih rezultata za implementaciju metabarkodiranja u nacionalne i regionalne programe praćenja morskog okoliša.

S obzirom da je se radi o prvom istraživanju sjevernog Jadrana u kojem se primjenjuje metabarkodiranje u utvrđivanju potencijala za primjenu u sustavnom praćenju fitoplanktonskih zajednica, rezultati i razvoj metodologije potaknut će daljnja istraživanja usmjerena na unaprijeđenje metodologije za učinkovitu primjenu metabarkodiranja u procjeni stanja morskog okoliša.

6. LITERATURA

Abad, D., Albaina, A., Aguirre, M., Laza-Martínez, A., Uriarte, I., Iriarte, A., Villate, F., & Estonba, A. (2016). Is metabarcoding suitable for estuarine plankton monitoring? A comparative study with microscopy. *Marine Biology* 2016 163:7, 163(7), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S00227-016-2920-0>

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Luke, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Ardenas, P. C., Cepi Cka O, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Ir Hampl, V., ... Zhang, Q. (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66, 4–119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>

Adolf, J. E., Bachvaroff, T. R., Deeds, J. R., & Place, A. R. (2015). Ichthyotoxic Karlodinium veneficum (Ballantine) J Larsen in the Upper Swan River Estuary (Western Australia): Ecological conditions leading to a fish kill. *Harmful Algae*, 48, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.07.006>

Adolf, J. E., Bachvaroff, T. R., & Place, A. R. (2009). Environmental Modulation of Karlotoxin Levels in Strains of the Cosmopolitan Dinoflagellate, Karlodinium Veneficum (dinophyceae). *Journal of Phycology*, 45(1), 176–192. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00641.x>

Aguilar-Maldonado, J. A., Santamaría-del-Ángel, E., Gonzalez-Silvera, A., & Sebastián-Frasquet, M. T. (2019). Detection of Phytoplankton Temporal Anomalies Based on Satellite Inherent Optical Properties: A Tool for Monitoring Phytoplankton Blooms. *Sensors*, 19(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/s19153339>

Almandoz, G. O., Fabro, E., Sprong, P., Mascioni, M., Antoni, J., Ferrario, M., Metfies, K., & Barrera, F. M. (2024). Metabarcoding and microscopy characterization of phytoplankton from frontal areas of the Argentine Sea. *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1306336>

Amarasinghe, S. L., Su, S., Dong, X., Zappia, L., Ritchie, M. E., & Gouil, Q. (2020). Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biology*, 21(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-1935-5>

Andersson, A., Zhao, L., Brugel, S., Figueroa, D., & Huseby, S. (2023). Metabarcoding vs Microscopy: Comparison of Methods To Monitor Phytoplankton Communities. *ACS ES&T Water*, 3(8), 2671–2680. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.3c00176>

Andújar, C., Arribas, P., Yu, D. W., Vogler, A. P., & Emerson, B. C. (2018). Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the metazoa. *Molecular Ecology*, 27(20), 3968–3975. <https://doi.org/10.1111/MEC.14844>

- Apothéloz-Perret-Gentil, L., Bouchez, A., Cordier, T., Cordonier, A., Guéguen, J., Rimet, F., Vasselon, V., & Pawlowski, J. (2021). Monitoring the ecological status of rivers with diatom eDNA metabarcoding: A comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Molecular Ecology*, 30(13), 2959–2968. <https://doi.org/10.1111/MEC.15646>
- Arapov, J., Tomašević, T., Bonačić, T., Pejković, M., Bužančić, M., Bušelić, I., Lepen Pleić, I., Casabianca, S., Penna, A., Skejić, S., & Ninčević Gladan, Ž. (2023). A New Insight into the Taxonomy of Pseudo-nitzschia Genus from the Adriatic Sea: Description of P. brasiliana, P. galaxiae, P. hasleana, and P. linea. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/jmse11071370>
- Arranz, V., Pearman, W. S., Aguirre, J. D., & Liggins, L. (2020). MARES, a replicable pipeline and curated reference database for marine eukaryote metabarcoding. *Scientific Data*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0549-9>
- Artegiani, A., Paschini, E., Russo, A., Bregant, D., Raicich, F., & Pinardi, N. (1997). *The Adriatic Sea General Circulation. Part I: Air–Sea Interactions and Water Mass Structure*. https://journals.ametsoc.org/view/journals/phoc/27/8/1520-0485_1997_027_1492_tasgcp_2.0.co_2.xml
- Assmy, P., & Smetacek, V. (2009). Algal Blooms. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (pp. 27–41). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00001-8>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2003.09.007>
- Aubry, F. B., Cossarini, G., Acri, F., Bastianini, M., Bianchi, F., Camatti, E., De Lazzari, A., Pugnetti, A., Solidoro, C., & Socal, G. (2012). Plankton communities in the northern Adriatic Sea: Patterns and changes over the last 30 years. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.03.011>
- Aylagas, E., Borja, Á., & Rodríguez-Ezpeleta, N. (2014). Environmental Status Assessment Using DNA Metabarcoding: Towards a Genetics Based Marine Biotic Index (gAMBI). *PLOS ONE*, 9(3), e90529. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0090529>
- Bailey, S. A. (2015). An overview of thirty years of research on ballast water as a vector for aquatic invasive species to freshwater and marine environments. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 18(3), 261–268. <https://doi.org/10.1080/14634988.2015.1027129>
- Baird, D. J., & Hajibabaei, M. (2012). Biomonitoring 2.0: A new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 2039–2044. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2012.05519.X>

- Bálint, M., Domisch, S., Engelhardt, C. H. M., Haase, P., Lehrian, S., Sauer, J., Theissinger, K., Pauls, S. U., & Nowak, C. (2011). Cryptic biodiversity loss linked to global climate change. *Nature Climate Change* 2011 1:6, 1(6), 313–318. <https://doi.org/10.1038/nclimate1191>
- Baricevic, A., Chardon, C., Kahlert, M., Karjalainen, S. M., Pfannkuchen, D. M., Pfannkuchen, M., Rimet, F., Tankovic, M. S., Trobajo, R., Vasselon, V., Zimmermann, J., & Bouchez, A. (2022). Recommendations for the preservation of environmental samples in diatom metabarcoding studies. *Metabarcoding and Metagenomics* 6: E85844, 6, e85844-. <https://doi.org/10.3897/MBMG.6.85844>
- Baričević, A., Kogovšek, T., Smolaka Tanković, M., Grižančić, L., Knjaz, M., Vlašiček, I., Podolšak, I., Kužat, N., Pfannkuchen, M., & Marić Pfannkuchen, D. (2024). Coastal Eukaryotic Plankton Diversity of the Southern Adriatic as Revealed by Metabarcoding. *Diversity*, 16(5). <https://www.croris.hr/crosbi/publikacija/prilog-casopis/835124>
- Barton, A. D., Irwin, A. J., Finkel, Z. V., & Stock, C. A. (2016). Anthropogenic climate change drives shift and shuffle in North Atlantic phytoplankton communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), 2964–2969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519080113>
- Beardall, J., & Raven, J. A. (2004). The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia*. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-1-26.1>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36–D42. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1195>
- Berdalet, E., Fleming, L. E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L. C., Moore, S. K., Hoagland, P., & Enevoldsen, H. (2015). Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: Challenges and opportunities in the 21st century. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2015(1), 61–91. <https://doi.org/10.1017/S0025315415001733>
- Berdjeb, L., Parada, A., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2018). Short-term dynamics and interactions of marine protist communities during the spring–summer transition. *The ISME Journal*, 12(8), 1907–1917. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0097-x>
- Bernardi Aubry, F., Acri ,Francesco, Bastianini ,Mauro, Bianchi ,Franco, Cassin ,Daniele, Pugnetti ,Alessandra, & and Socal, G. (2006). Seasonal and interannual variations of phytoplankton in the Gulf of Venice (Northern Adriatic Sea). *Chemistry and Ecology*, 22(sup1), S71–S91. <https://doi.org/10.1080/02757540600687962>
- Berney, C. (2022). *EukRibo: A manually curated eukaryotic 18S rDNA reference database*. 1–20.
- Bestion, E., Haegeman, B., Alvarez Codesal, S., Garreau, A., Huet, M., Barton, S., & Montoya, J. M. (2021). Phytoplankton biodiversity is more important for ecosystem functioning in highly variable thermal environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(35), e2019591118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019591118>

- Bilbao, J., Pavloundi, C., Blanco-Rayón, E., Franco, J., Madariaga, I., & Seoane, S. (2023). Phytoplankton community composition in relation to environmental variability in the Urdaibai estuary (SE Bay of Biscay): Microscopy and eDNA metabarcoding. *Marine Environmental Research*, 191, 106175. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106175>
- Bittner, L., Gobet, A., Audic, S., Romac, S., Egge, E. S., Santini, S., Ogata, H., Probert, I., Edvardsen, B., & de Vargas, C. (2013). Diversity patterns of uncultured Haptophytes unravelled by pyrosequencing in Naples Bay. *Molecular Ecology*, 22(1), 87–101. <https://doi.org/10.1111/mec.12108>
- Borja, Á., Elliott, M., Carstensen, J., Heiskanen, A. S., & van de Bund, W. (2010). Marine management – Towards an integrated implementation of the European Marine Strategy Framework and the Water Framework Directives. *Marine Pollution Bulletin*, 60(12), 2175–2186. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2010.09.026>
- Borja, A., Elliott, M., Snelgrove, P. V. R., Austen, M. C., Berg, T., Cochrane, S., Carstensen, J., Danovaro, R., Greenstreet, S., Heiskanen, A.-S., Lynam, C. P., Mea, M., Newton, A., Patrício, J., Uusitalo, L., Uyarra, M. C., & Wilson, C. (2016). Bridging the Gap between Policy and Science in Assessing the Health Status of Marine Ecosystems. *Frontiers in Marine Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00175>
- Bourret, A., Nozères, C., Parent, E., & Parent, G. J. (2023). Maximizing the reliability and the number of species assignments in metabarcoding studies using a curated regional library and a public repository. *Metabarcoding and Metagenomics*, 7, e98539. <https://doi.org/10.3897/mbmg.7.98539>
- Braid, M. D., Daniels, L. M., & Kitts, C. L. (2003). Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), 389–393. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00210-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00210-5)
- Brandt, M. I., Pradillon, F., Trouche, B., Henry, N., Liautard-Haag, C., Cambon-Bonavita, M.-A., Cueff-Gauchard, V., Wincker, P., Belser, C., Poulain, J., Arnaud-Haond, S., & Zeppilli, D. (2021). Evaluating sediment and water sampling methods for the estimation of deep-sea biodiversity using environmental DNA. *Scientific Reports*, 11(1), 7856. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86396-8>
- Bukin, Y. S., Mikhailov, I. S., Petrova, D. P., Galachyants, Y. P., Zakharova, Y. R., & Likhoshway, Y. V. (2023). The effect of metabarcoding 18S rRNA region choice on diversity of microeukaryotes including phytoplankton. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(9), 229. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03678-1>
- Burkholder, J. M., Hallegraeff, G. M., Melia, G., Cohen, A., Bowers, H. A., Oldach, D. W., Parrow, M. W., Sullivan, M. J., Zimba, P. V., Allen, E. H., Kinder, C. A., & Mallin, M. A. (2007). Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of U.S. military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices. *Harmful Algae*, 6(4), 486–518. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.11.006>

Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., & Simpson, A. G. B. (2020). The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 35(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>

Burki, F., Sandin, M. M., & Jamy, M. (2021). Diversity and ecology of protists revealed by metabarcoding. *Current Biology*, 31(19), R1267–R1280. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.066>

Cabrini, M., Cerino, F., de Olazabal, A., Di Poi, E., Fabbro, C., Fornasaro, D., Goruppi, A., Flander-Putrlé, V., Francé, J., Gollasch, S., Hure, M., Lipej, L., Lučić, D., Magaletti, E., Mozetič, P., Tinta, T., Tornambè, A., Turk, V., Uhan, J., & David, M. (2019). Potential transfer of aquatic organisms via ballast water with a particular focus on harmful and non-indigenous species: A survey from Adriatic ports. *Marine Pollution Bulletin*, 147, 16–35. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.004>

Cabrini, M., Fornasaro, D., Cossarini, G., Lipizer, M., & Virgilio, D. (2012). Phytoplankton temporal changes in a coastal northern Adriatic site during the last 25 years. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 113–124. <https://doi.org/10.1016/J.ECSS.2012.07.007>

Callahan, B. J., Mcmurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). *dada2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data*. 13(7). <https://doi.org/10.1038/nMeth.3869>

Campanelli, A., Grilli, F., Paschini, E., & Marini, M. (2011). The influence of an exceptional Po River flood on the physical and chemical oceanographic properties of the Adriatic Sea. *Dynamics of Atmospheres and Oceans*, 52(1), 284–297. <https://doi.org/10.1016/j.dynatmoce.2011.05.004>

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pěa, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/NMETH.F303>

Casey, J. M., Ransome, E., Collins, A. G., Mahardini, A., Kurniasih, E. M., Sembiring, A., Schiettekatte, N. M. D., Cahyani, N. K. D., Anggoro, A. W., Moore, M., Uehling, A., Belcaid, M., Barber, P. H., Geller, J. B., & Meyer, C. P. (2025). *DNA metabarcoding marker choice skews perception of marine eukaryotic biodiversity*. <https://doi.org/10.1002/edn3.245>

Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 73(3), 203–266. <https://doi.org/10.1017/s0006323198005167>

Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1545), 1251–1262. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2705>

Cerino, F., Fornasaro, D., Kralj, M., Giani, M., & Cabrini, M. (2019). *Phytoplankton temporal dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea (Mediterranean Sea) from 2010 to 2017*. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.34.30720>

- Çevik, T., & Çevik, N. (2025). Environmental DNA (eDNA): A review of ecosystem biodiversity detection and applications. *Biodiversity and Conservation*, 34(9), 2999–3035. <https://doi.org/10.1007/s10531-025-03112-y>
- Cibic, T., Cerino, F., Karuza, A., Fornasaro, D., Comici, C., & Cabrini, M. (2018). Structural and functional response of phytoplankton to reduced river inputs and anomalous physical-chemical conditions in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *Science of The Total Environment*, 636, 838–853. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.205>
- CLAY, B. L., KUGRENS, P., & LEE, R. E. (1999). A revised classification of Cryptophyta. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 131(2), 131–151. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1999.tb01845.x>
- Cloern, J. E., & Jassby, A. D. (2010). Patterns and Scales of Phytoplankton Variability in Estuarine–Coastal Ecosystems. *Estuaries and Coasts*, 33(2), 230–241. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9195-3>
- Coats, D. W. (1999). Parasitic Life Styles of Marine Dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 402–409. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04620.x>
- Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Lasram, F. B. R., Aguzzi, J., Ballesteros, E., Bianchi, C. N., Corbera, J., Dailianis, T., Danovaro, R., Estrada, M., Froglia, C., Galil, B. S., Gasol, J. M., Gertwagen, R., Gil, J., Guilhaumon, F., Kesner-Reyes, K., ... Voultsiadou, E. (2010). The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. *PLOS ONE*, 5(8), e11842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011842>
- Collado-Fabbri, S., Vaultot, D., & Ulloa, O. (2011). Structure and seasonal dynamics of the eukaryotic picophytoplankton community in a wind-driven coastal upwelling ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 56(6), 2334–2346. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2334>
- Cozzi, S., Cabrini, M., Kralj, M., De Vittor, C., Celio, M., & Giani, M. (2020). Climatic and Anthropogenic Impacts on Environmental Conditions and Phytoplankton Community in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Water*, 12(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/w12092652>
- Cozzi, S., & Giani, M. (2011). River water and nutrient discharges in the Northern Adriatic Sea: Current importance and long term changes. *Continental Shelf Research*, 31(18), 1881–1893. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2011.08.010>
- Crandall, E. D., Toczydlowski, R. H., Liggins, L., Holmes, A. E., Ghoojaei, M., Gaither, M. R., Wham, B. E., Pritt, A. L., Noble, C., Anderson, T. J., Barton, R. L., Berg, J. T., Beskid, S. G., Delgado, A., Farrell, E., Himmelsbach, N., Queeno, S. R., Trinh, T., Weyand, C., ... Toonen, R. J. (2023). The importance of timely metadata curation to the global surveillance of genetic diversity. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 37(4), e14061. <https://doi.org/10.1111/cobi.14061>
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W. K., Potter, C., & Bik, H. M. (2016). The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(9), 1008–1018. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>

- Curd, E. E., Gal, L., Gallego, R., Silliman, K., Nielsen, S., & Gold, Z. (2024). rCRUX: A rapid and versatile tool for generating metabarcoding reference libraries in R. *Environmental DNA*, 6(1), e489. <https://doi.org/10.1002/edn3.489>
- Cvitković, I., Despalatović, M., Matić Skoko, S., Ninčević Gladan, Ž., i Žuljević, A. (2018). Analiza biološke metode ocjene ekološkog stanja za fitoplankton, morske cvjetnice i ribe u europskim interkalibracijskim tipovima prijelaznih voda Mediterana. Split: Institut za oceanografiju i ribarstvo.
- Das, P. B., Gauns, M., & Naqvi, S. W. A. (2019). Ecological diversity of planktonic protists in spatial regimes of the Arabian Sea revealed through next-generation sequencing. *Regional Studies in Marine Science*, 25, 100484. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2018.100484>
- De Clerck, O., Bogaert, K. A., & Leliaert, F. (2012). Chapter Two - Diversity and Evolution of Algae: Primary Endosymbiosis. In G. Piganeau (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 64, pp. 55–86). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391499-6.00002-5>
- De Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahé, F., Logares, R., Lara, E., Berney, C., Le Bescot, N., Probert, I., Carmichael, M., Poulain, J., Romac, S., Colin, S., Aury, J. M., Bittner, L., Chaffron, S., Dunthorn, M., Engelen, S., ... Velayoudon, D. (2015). Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348(6237). <https://doi.org/10.1126/science.1261605>
- Decelle, J., Romac, S., Stern, R. F., Bendif, E. M., Zingone, A., Audic, S., Guiry, M. D., Guillou, L., Tessier, D., Le Gall, F., Gourvil, P., Dos Santos, A. L., Probert, I., Vaultot, D., de Vargas, C., & Christen, R. (2015a). PhytoREF: A reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1435–1445. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12401>
- Decelle, J., Romac, S., Stern, R. F., Bendif, E. M., Zingone, A., Audic, S., Guiry, M. D., Guillou, L., Tessier, D., Le Gall, F., Gourvil, P., Dos Santos, A. L., Probert, I., Vaultot, D., de Vargas, C., & Christen, R. (2015b). PhytoREF: A reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1435–1445. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12401>
- Deeds, J. R., Terlizzi, D. E., Adolf, J. E., Stoecker, D. K., & Place, A. R. (2002). Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae)—A dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. *Harmful Algae*, 1(2), 169–189. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(02\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00027-6)
- Degobbis, D., Precali, R., Ivancic, I., Smodlaka, N., Fuks, D., & Kveder, S. (2000). Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *International Journal of Environment and Pollution*, 13(1/2/3/4/5/6), 495. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2000.002332>
- Demarcq, H., Reygondeau, G., Alvain, S., & Vantrepotte, V. (2012). Monitoring marine phytoplankton seasonality from space. *Remote Sensing of Environment*, 117, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2011.09.019>

- Di Pane, J., Wiltshire, K. H., McLean, M., Boersma, M., & Meunier, C. L. (2022). Environmentally induced functional shifts in phytoplankton and their potential consequences for ecosystem functioning. *Global Change Biology*, 28(8), 2804–2819. <https://doi.org/10.1111/gcb.16098>
- Jane, S., Wilcox, T.M., McKelvey K.S., Young, M.K., Schwartz, M.K., Lowe, W.H., Letcher, B.H., Whiteley, A.R. Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), 216–227. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12285>
- Djurhuus, A., Port, J., Closek, C. J., Yamahara, K. M., Romero-Maraccini, O., Walz, K. R., Goldsmith, D. B., Michisaki, R., Breitbart, M., Boehm, A. B., & Chavez, F. P. (2017). Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Frontiers in Marine Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314>
- Dolan, J. R., & Marro, S. (2020). *A note on the differences found between examining whole water vs. Phytoplankton net (52 µm mesh) samples to characterize abundance and community composition of tintinnid ciliates (marine microzooplankton)*. *Limnology and Oceanography: Methods*, 18(10), 618–624. <https://doi.org/10.1002/lom3.10348>
- Domingues, R. B., Barbosa, A., & Galvão, H. (2008). Constraints on the use of phytoplankton as a biological quality element within the Water Framework Directive in Portuguese waters. *Marine Pollution Bulletin*, 56(8), 1389–1395. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.05.006>
- Doney, S. C., Ruckelshaus, M., Duffy, J. E., Barry, J. P., Chan, F., English, C. A., Galindo, H. M., Grebmeier, J. M., Hollowed, A. B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N. N., Sydeman, W. J., & Talley, L. D. (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 4(Volume 4, 2012), 11–37. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-041911-111611>
- Du, X., Xiong, W., Li, S., & Zhan, A. (2024). Conventional net tow versus environmental DNA for metabarcoding-based analysis of plankton-environment interactions in polluted aquatic ecosystems. *Ecological Indicators*, 158, 111356. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.111356>
- Duarte, S., Vieira, P. E., Lavrador, A. S., & Costa, F. O. (2021). Status and prospects of marine NIS detection and monitoring through (e)DNA metabarcoding. *Science of the Total Environment*, 751. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141729>
- Dubois, B., Debode, F., Hautier, L., Hulin, J., Martin, G. S., Delvaux, A., Janssen, E., & Mingeot, D. (2022). A detailed workflow to develop QIIME2-formatted reference databases for taxonomic analysis of DNA metabarcoding data. *BMC Genomic Data*, 23(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12863-022-01067-5>
- Edler. (1979). *Edler, L. (1979) Recommendations of Methods of Marine Biological Studies in the Baltic Sea Phytoplankton and Chlorophyll. The Baltic Marine Biologists*, 5, 1-38. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=2077887>
- Edwardsen, B., Eikrem, W., Wenche, Green, J. C., Andersen, Robert A., Moon-van der Staay, Seung Yeo, & Medlin, L. K. (2000). Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from

18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia*, 39(1), 19–35. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-39-1-19.1>

Edwards, K. F., Li, Q., McBeain, K. A., Schvarcz, C. R., & Steward, G. F. (2023). Trophic strategies explain the ocean niches of small eukaryotic phytoplankton. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 290(1991), 20222021. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.2021>

Edwards, M., Beaugrand, G., Hays, G. C., Koslow, J. A., & Richardson, A. J. (2010). Multi-decadal oceanic ecological datasets and their application in marine policy and management. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(10), 602–610. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.07.007>

Eikrem, W., & Throndsen, J. (1990). The ultrastructure of *Bathycoccus* gen. Nov. And *B. prasinos* sp. Nov., a non-motile picoplanktonic alga (Chlorophyta, Prasinophyceae) from the Mediterranean and Atlantic. *Phycologia*, 29(3), 344–350. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-29-3-344.1>

Eker-Develi, E., Berthon, J.-F., & Free, G. (2022). Impact of environmental factors on phytoplankton composition and their marker pigments in the northern Adriatic Sea. *Oceanologia*, 64(4), 615–630. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2022.05.002>

Ekrem, T., Willassen, E., & Stur, E. (2007). A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(2), 530–542. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.11.021>

Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E. E., Raggi, L., Segovia, L., Merino, E., Gutiérrez-Rios, R. M., Juárez, K., Licea-Navarro, A. F., Pardo-Lopez, L., & Sanchez-Flores, A. (2018). Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Scientific Reports*, 8(1), 12034. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30515-5>

Espinosa, E., Bautista, R., Larrosa, R., & Plata, O. (2024). Advancements in long-read genome sequencing technologies and algorithms. *Genomics*, 116(3), 110842. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2024.110842>

Brandt, M. I., Pradillon, F., Trouche, B., Henry, N., Liautard-Haag, C., Cambon-Bonavita, M.-A., Cuff-Gauchard, V., Wincker, P., Belser, C., Poulain, J., Arnaud-Haond, S., & Zeppilli, D. (2021). Evaluating sediment and water sampling methods for the estimation of deep-sea biodiversity using environmental DNA. *Scientific Reports*, 11(1), 7856. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86396-8>

European Commission (2008) Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). Official Journal of the European Union 22.

European Commission (2014) Regulation (EU) No 1143/2014 of the European Parliament and of the Council of 22 October 2014 on the prevention and management of the introduction and spread of invasive alien species, 55 pp.

European Commission (2020) EU Biodiversity Strategy for 2030 and an associated Action Plan, 22 pp. https://ec.europa.eu/environment/nature/biodiversity/strategy/index_en.htm

European Standardisation Committee (2018) CEN/TR 17244 – Water quality – Technical report for the management of diatom barcodes. CEN-CEN ELEC 1–11.

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>

Facca, C., Bernardi Aubry, F., Socal, G., Ponis, E., Acri, F., Bianchi, F., Giovanardi, F., & Sfriso, A. (2014). Description of a Multimetric Phytoplankton Index (MPI) for the assessment of transitional waters. *Marine Pollution Bulletin*, 79(1), 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.025>

Falkowski, P. (2012). Ocean Science: The power of plankton. *Nature*, 483(7387), S17–S20. <https://doi.org/10.1038/483S17a>

Falkowski, P. G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research*, 39(3), 235–258. <https://doi.org/10.1007/BF00014586>

Ferreira, J. G., Andersen, J. H., Borja, A., Bricker, S. B., Camp, J., Cardoso Da Silva, M., Garcés, E., Heiskanen, A.-S., Humborg, C., Ignatiades, L., Lancelot, C., Menesguen, A., Tett, P., Hoepffner, N., & Claussen, U. (2011). Overview of eutrophication indicators to assess environmental status within the European Marine Strategy Framework Directive. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 93(2), 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.03.014>

Finkel, Z. V., Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T. A. V., & Raven, J. A. (2010). Phytoplankton in a changing world: Cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research*, 32(1), 119–137. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp098>

Francé, J., Varkitzi, I., Stanca, E., Cozzoli, F., Skejić, S., Ungaro, N., Vascotto, I., Mozetič, P., Ninčević Gladan, Ž., Assimakopoulou, G., Pavlidou, A., Zervoudaki, S., Pagou, K., & Basset, A. (2021). Large-scale testing of phytoplankton diversity indices for environmental assessment in Mediterranean sub-regions (Adriatic, Ionian and Aegean Seas). *Ecological Indicators*, 126(April). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107630>

Frau, D. (2025). Phytoplankton Sampling: When the Method Shapes the Message. *Limnological Review*, 25(3), 45. <https://doi.org/10.3390/limnolrev25030045>

Fuks, D., Ivančić, I., Najdek, M., Lučić, D., Njire, J., Godrijan, J., Marić, D., Šilović, T., Paliaga, P., Blažina, M., Precali, R., & Orlić, S. (2012). Changes in the planktonic community structure related to trophic conditions: The case study of the northern Adriatic Sea. *Journal of Marine Systems*, 96–97, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2012.02.006>

Furlan, E., Torresan, S., Critto, A., Lovato, T., Solidoro, C., Lazzari, P., & Marcomini, A. (2019). Cumulative Impact Index for the Adriatic Sea: Accounting for interactions among climate and

anthropogenic pressures. *Science of The Total Environment*, 670, 379–397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.021>

Gacic, M., Eusebi Borzelli, G. L., Civitarese, G., Cardin, V., & Yari, S. (2010). Can internal processes sustain reversals of the ocean upper circulation? The Ionian Sea example. *Geophysical Research Letters*, 37(9). <https://doi.org/10.1029/2010GL043216>

Gaither, M. R., DiBattista, J. D., Leray, M., & von der Heyden, S. (2022). Metabarcoding the marine environment: From single species to biogeographic patterns. *Environmental DNA*, 4(1), 3–8. <https://doi.org/10.1002/EDN3.270>

Galil, B. S., Marchini, A., & Occhipinti-Ambrogi, A. (2018). East is east and West is west? Management of marine bioinvasions in the Mediterranean Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 201, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.021>

Galil, B. S., Marchini, A., Occhipinti-Ambrogi, A., Minchin, D., Narščius, A., Ojaveer, H., & Olenin, S. (2014). International arrivals: Widespread bioinvasions in European Seas. *Ethology Ecology & Evolution*, 26(2–3), 152–171. <https://doi.org/10.1080/03949370.2014.897651>

Gaonkar, C. C., & Campbell, L. (2024). A full-length 18S ribosomal DNA metabarcoding approach for determining protist community diversity using Nanopore sequencing. *Ecology and Evolution*, 14(4), e11232. <https://doi.org/10.1002/ece3.11232>

Garmendia, M., Borja, Á., Franco, J., & Revilla, M. (2013). Phytoplankton composition indicators for the assessment of eutrophication in marine waters: Present state and challenges within the European directives. *Marine Pollution Bulletin*, 66(1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.10.005>

Garrido-Sanz, L., Senar, M. À., & Piñol, J. (2022). Drastic reduction of false positive species in samples of insects by intersecting the default output of two popular metagenomic classifiers. *PLOS ONE*, 17(10), e0275790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275790>

Gauff, R., Davoult, D., Bohner, O., Coudret, J., Jacquet, S., Loisel, S., Rondeau, S., Wafo, E., & Lejeusne, C. (2023). Unexpected biotic homogenization masks the effect of a pollution gradient on local variability of community structure in a marine urban environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 562, 151882. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2023.151882>

Geng, M., Zhang, W., Hu, T., Wang, R., Cheng, X., & Wang, J. (2022). Eutrophication causes microbial community homogenization via modulating generalist species. *Water Research*, 210, 118003. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.118003>

Giani, M., Djakovac, T., Degobbis, D., Cozzi, S., Solidoro, C., & Umani, S. F. (2012a). Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.ECSS.2012.08.023>

- Giani, M., Djakovac, T., Degobbi, D., Cozzi, S., Solidoro, C., & Umami, S. F. (2012b). Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.08.023>
- Gilbert, J. A., Dick, G. J., Jenkins, B., Heidelberg, J., Allen, E., Mackey, K. R. M., & DeLong, E. F. (2014). Meeting report: Ocean 'omics science, technology and cyberinfrastructure: current challenges and future requirements (August 20–23, 2013). *Standards in Genomic Sciences*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.4056/sigs.5749944>
- Godrić, J., Marić, D., Tomažić, I., Precali, R., & Pfannkuchen, M. (2013). Seasonal phytoplankton dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea. *Journal of Sea Research*, 77, 32–44. <https://doi.org/10.1016/J.SEARES.2012.09.009>
- Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Pilliod, D. S. (2015a). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.040>
- Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Pilliod, D. S. (2015b). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.040>
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., Spear, S. F., McKee, A., Oyler-McCance, S. J., Cornman, R. S., Laramie, M. B., Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., Takahara, T., Herder, J. E., & Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299–1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>
- Gómez, F. (2008). Phytoplankton invasions: Comments on the validity of categorizing the non-indigenous dinoflagellates and diatoms in European Seas. *Marine Pollution Bulletin*, 56(4), 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.12.014>
- Goodwin, K. D., Thompson, L. R., Duarte, B., Kahlke, T., Thompson, A. R., Marques, J. C., & Caçador, I. (2017). DNA sequencing as a tool to monitor marine ecological status. *Frontiers in Marine Science*, 4(MAY), 107. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2017.00107>
- Gran-Stadniczeňko, S., Egge, E., Hostyeva, V., Logares, R., Eikrem, W., & Edvardsen, B. (2019). Protist Diversity and Seasonal Dynamics in Skagerrak Plankton Communities as Revealed by Metabarcoding and Microscopy. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(3), 494–513. <https://doi.org/10.1111/JEU.12700>
- Grižančić, L., Baričević, A., Smolaka Tanković, M., Vlašićek, I., Knjaz, M., Podolšak, I., Kogovšek, T., Pfannkuchen, M., & Marić Pfannkuchen, D. (2023). A metabarcoding based (species) inventory of the northern Adriatic phytoplankton. *Biodiversity Data Journal*, 11, e106947. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e106947>

Groendahl, S., Kahlert, M., & Fink, P. (2017). The best of both worlds: A combined approach for analyzing microalgal diversity via metabarcoding and morphology-based methods. *PLOS ONE*, 12(2), e0172808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172808>

Grzebyk, D., Audic, S., Decelle, J., & de Vargas, C. (2017). *PHYTOPK28-D1D2: A curated database of 28S rRNA gene D1-D2 domains from eukaryotic organisms dedicated to metabarcoding analyses of marine phytoplankton samples*. 1. <https://doi.org/10.17632/mndb4h87yg.1>

Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boutte, C., Burgaud, G., De Vargas, C., Decelle, J., Del Campo, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Holzmann, M., Kooistra, W. H. C. F., Lara, E., Le Bescot, N., Logares, R., ... Christen, R. (2013). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): A catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D597–D604. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1160>

Guillou, L., Eikrem, W., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Le Gall, F., Massana, R., Romari, K., Pedrós-Alió, C., & Vaultot, D. (2004). Diversity of Picoplanktonic Prasinophytes Assessed by Direct Nuclear SSU rDNA Sequencing of Environmental Samples and Novel Isolates Retrieved from Oceanic and Coastal Marine Ecosystems. *Protist*, 155(2), 193–214. <https://doi.org/10.1078/143446104774199592>

Guiry, M., Guiry, G., Morrison, L., Rindi, F., Valenzuela, S., Mathieson, A., Parker, B., Langangen, A., John, D., Criado, I., Carter, C., Kuipers, P., & Garbary, D. (2014). AlgaeBase: An On-line Resource for Algae. *Cryptogamie Algologie*, 35, 105–115. <https://doi.org/10.7872/crya.v35.iss2.2014.105>

Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18s rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>

Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A. C., & Baird, D. J. (2011). Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *PLOS ONE*, 6(4), e17497. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0017497>

Hallegraeff, G. M., & Bolch, C. J. (1992). Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: Implications for plankton biogeography and aquaculture. *Journal of Plankton Research*, 14(8), 1067–1084. <https://doi.org/10.1093/plankt/14.8.1067>

Halpern, B. S. (2008). *A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems*. May 2014. <https://doi.org/10.1126/science.1149345>

Hamsher, S. E., LeGresley, M. M., Martin, J. L., & Saunders, G. W. (2013). A Comparison of Morphological and Molecular-Based Surveys to Estimate the Species Richness of Chaetoceros and Thalassiosira (Bacillariophyta), in the Bay of Fundy. *PLoS ONE*, 8(10), 73521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073521>

- Harley, C. D. G., Randall Hughes, A., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thornber, C. S., Rodriguez, L. F., Tomanek, L., & Williams, S. L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9(2), 228–241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x>
- Hays, G. C., Richardson, A. J., & Robinson, C. (2005). Climate change and marine plankton. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 20(6). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.03.004>
- Henson, S. A., Sarmiento, J. L., Dunne, J. P., Bopp, L., Lima, I., Doney, S. C., John, J., & Beaulieu, C. (2010). Detection of anthropogenic climate change in satellite records of ocean chlorophyll and productivity. *Biogeosciences*, 7(2), 621–640. <https://doi.org/10.5194/bg-7-621-2010>
- Hermoso, V., Carvalho, S. B., Giakoumi, S., Goldsborough, D., Katsanevakis, S., Leontiou, S., Markantonatou, V., Rumes, B., Vogiatzakis, I. N., & Yates, K. L. (2022). The EU Biodiversity Strategy for 2030: Opportunities and challenges on the path towards biodiversity recovery. *Environmental Science & Policy*, 127, 263–271. <https://doi.org/10.1016/J.ENVSCI.2021.10.028>
- Hinder, S. L., Hays, G. C., Brooks, C. J., Davies, A. P., Edwards, M., Walne, A. W., & Gravenor, M. B. (2011). Toxic marine microalgae and shellfish poisoning in the British isles: History, review of epidemiology, and future implications. *Environmental Health*, 10(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-54>
- Hinder, S. L., Hays, G. C., Edwards, M., Roberts, E. C., Walne, A. W., & Gravenor, M. B. (2012). Changes in marine dinoflagellate and diatom abundance under climate change. *Nature Climate Change*, 2(4), 271–275. <https://doi.org/10.1038/nclimate1388>
- Hleap, J. S., Littlefair, J. E., Steinke, D., Hebert, P. D. N., & Cristescu, M. E. (2021). Assessment of current taxonomic assignment strategies for metabarcoding eukaryotes. *Molecular Ecology Resources*, 21(7), 2190–2203. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13407>
- Hoef-Emden, K. (2005). Multiple Independent Losses of Photosynthesis and Differing Evolutionary Rates in the Genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): Combined Phylogenetic Analyses of DNA Sequences of the Nuclear and the Nucleomorph Ribosomal Operons. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0089-5>
- Holland, M. M., Louchart, A., Artigas, L. F., Ostle, C., Atkinson, A., Rombouts, I., Graves, C. A., Devlin, M., Heyden, B., Machairopoulou, M., Bresnan, E., Schilder, J., Jakobsen, H. H., Lloyd-Hartley, H., Tett, P., Best, M., Goberville, E., & McQuatters-Gollop, A. (2023). Major declines in NE Atlantic plankton contrast with more stable populations in the rapidly warming North Sea. *Science of The Total Environment*, 898, 165505. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165505>
- Hopkins, T., Artegiani, A., Kinder, C., & Pariente, R. (1999). A discussion of the northern Adriatic circulation and flushing as determined from the ELNA hydrography 2 3. *The Adriatic Sea, Ecosystem Research Report No. 32, 1999, EUR 18834, European Commission, Brussels*, 32.
- Hu, Y. O. O., Karlson, B., Charvet, S., & Andersson, A. F. (2016). Diversity of Pico- to Mesoplankton along the 2000 km Salinity Gradient of the Baltic Sea. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00679>

- Iacaruso, N. J., Reves, O. P., Merkelz, S. J., Waldrep, C. L., & Davis, M. A. (2025). A systematic review evaluating the performance of eDNA methods relative to conventional methods for biodiversity monitoring. *Ecography*, *n/a*(*n/a*), e07952. <https://doi.org/10.1002/ecog.07952>
- Jain, R., Rivera, M. C., & Lake, J. A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(7), 3801–3806. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3801>
- J. Dubelaar, G. B., F. Geerders, P. J., & R. Jonker, R. (2004). High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. *Journal of Environmental Monitoring*, *6*(12), 946–952. <https://doi.org/10.1039/B409350J>
- Jerney, J., Hällfors, H., Jakobsen, H., Jurgensone, I., Karlson, B., Kremp, A., Lehtinen, S., Majaneva, M., Meissner, K., Norros, V., Sildever, S., Suikkanen, S., & Teeveer, K. (2023). *DNA metabarcoding—Guidelines to monitor phytoplankton diversity and distribution in marine and brackish waters*. Nordisk Ministerråd. <https://doi.org/10.6027/temanord2023-505>
- Jiang, Z., Liu, J., Zhu, X., Chen, Y., Chen, Q., & Chen, J. (2020). Quantitative comparison of phytoplankton community sampled using net and water collection methods in the southern Yellow Sea. *Regional Studies in Marine Science*, *35*, 101250. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101250>
- Deiner, K., & Altermatt, F., (2014). Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PloS One*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>
- Karlusich, J. J. P., Ibarbalz, F. M., & Bowler, C. (2020). Phytoplankton in the Tara Ocean. *Annual Review of Marine Science*, *12*(Volume 12, 2020), 233–265. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-010706>
- Katsanevakis, S. (2020). Unpublished Mediterranean records of marine alien and cryptogenic species. *BioInvasions Records*, *9*(2), 165–182. <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.2.01>
- Katsanevakis, S., Zenetos, A., Belchior, C., & Cardoso, A. C. (2013). Invading European Seas: Assessing pathways of introduction of marine aliens. *Ocean & Coastal Management*, *76*, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2013.02.024>
- Keck, F., Couton, M., & Altermatt, F. (2023a). Navigating the seven challenges of taxonomic reference databases in metabarcoding analyses. *Molecular Ecology Resources*, *23*(4), 742–755. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13746>
- Keck, F., Couton, M., & Altermatt, F. (2023b). Navigating the seven challenges of taxonomic reference databases in metabarcoding analyses. *Molecular Ecology Resources*, *23*(4), 742–755. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13746>
- Keck, F., Peller, T., Alther, R., Barouillet, C., Blackman, R., Capo, E., Chonova, T., Couton, M., Fehlinger, L., Kirschner, D., Knüsel, M., Muneret, L., Oester, R., Tapolczai, K., Zhang, H., & Altermatt, F. (2025). The global human impact on biodiversity. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08752-2>

- Kermarrec, L., Bouchez, A., Rimet, F., & Humbert, J. F. (2013). First evidence of the existence of semi-cryptic species and of a phylogeographic structure in the *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing complex (Bacillariophyta). *Protist*, 164(5), 686–705. <https://doi.org/10.1016/J.PROTIS.2013.07.005>
- Kezlya, E., Tseplik, N., & Kulikovskiy, M. (2023). Genetic Markers for Metabarcoding of Freshwater Microalgae: Review. *Biology*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biology12071038>
- Klein, E., Appeltans, W., Provoost, P., Saeedi, H., Benson, A., Bajona, L., Peralta, A. C., & Bristol, R. S. (2019). OBIS Infrastructure, Lessons Learned, and Vision for the Future. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00588>
- Knjaz, M., Baricevic, A., Tankovic, M. S., Kuzat, N., Vlasicek, I., Grizancic, L., Podolsak, I., Pfannkuchen, M., Kogovsek, T., & Pfannkuchen, D. M. (2024). First regional reference database of northern Adriatic diatom transcriptomes. *Scientific Reports*, 14(1), 16209. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67043-4>
- Kochoska, H., Chardon, C., Chonova, T., Keck, F., Kermarrec, L., Larras, F., Lefrancois, E., Rivera, S. F., Tapolczai, K., Vasselon, V., Levkov, Z., & Rimet, F. (2023). Filling reference libraries with diatom environmental sequences: Strengths and weaknesses. *Diatom Research*, 38(2), 103–127. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2023.2237977>
- LaJeunesse, T. C., Parkinson, J. E., Gabrielson, P. W., Jeong, H. J., Reimer, J. D., Voolstra, C. R., & Santos, S. R. (2018). Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology*, 28(16), 2570–2580.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.008>
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), 6955–6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Leliaert, F., Verbruggen, H., & Zechman, F. W. (2011). Into the deep: New discoveries at the base of the green plant phylogeny. *BioEssays*, 33(9), 683–692. <https://doi.org/10.1002/bies.201100035>
- Leray, M., Knowlton, N., Ho, S.-L., Nguyen, B. N., & Machida, R. J. (2019). GenBank is a reliable resource for 21st century biodiversity research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(45), 22651–22656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911714116>
- Li, Y., Guo, X. H., & Lundholm, N. (2020). Molecular Phylogeny and Taxonomy of the Genus *Minidiscus* (Bacillariophyceae), with Description of *Mediolabrus* gen. Nov. *Journal of Phycology*, 56(6), 1443–1456. <https://doi.org/10.1111/JPY.13038>
- Linnaeus, C. (1735). *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Lugduni Batavorum: Theodorum Haak.

- Litchman, E., de Tezanos Pinto, P., Edwards, K. F., Klausmeier, C. A., Kremer, C. T., & Thomas, M. K. (2015). Global biogeochemical impacts of phytoplankton: A trait-based perspective. *Journal of Ecology*, 103(6), 1384–1396.
- Liu, H., Probert, I., Uitz, J., Claustre, H., Aris-Brosou, S., Frada, M., Not, F., & de Vargas, C. (2009). Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12803–12808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905841106>
- Lobus, N. V., & Kulikovskiy, M. S. (2023). The Co-Evolution Aspects of the Biogeochemical Role of Phytoplankton in Aquatic Ecosystems: A Review. *Biology*, 12(1), 92. <https://doi.org/10.3390/biology12010092>
- Logares, R., Tesson, S. V. M., Canbäck, B., Pontarp, M., Hedlund, K., & Rengefors, K. (2018). Contrasting prevalence of selection and drift in the community structuring of bacteria and microbial eukaryotes. *Environmental Microbiology*, 20(6), 2231–2240. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14265>
- Lombard, F., Boss, E., Waite, A. M., Vogt, M., Uitz, J., Stemmann, L., Sosik, H. M., Schulz, J., Romagnan, J.-B., Picheral, M., Pearlman, J., Ohman, M. D., Niehoff, B., Möller, K. O., Miloslavich, P., Lara-Lpez, A., Kudela, R., Lopes, R. M., Kiko, R., ... Appeltans, W. (2019). Globally Consistent Quantitative Observations of Planktonic Ecosystems. *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00196>
- Lopes dos Santos, A., Gérikas Ribeiro, C., Ong, D., Garczarek, L., Shi, X. L., Nodder, S. D., Vaultot, D., & Gutiérrez-Rodríguez, A. (2022). Chapter 11—Phytoplankton diversity and ecology through the lens of high throughput sequencing technologies. In L. A. Clementson, R. S. Eriksen, & A. Willis (Eds.), *Advances in Phytoplankton Ecology* (pp. 353–413). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822861-6.00020-0>
- Lotze, H. K., Coll, M., & Dunne, J. A. (2011). Historical Changes in Marine Resources, Food-web Structure and Ecosystem Functioning in the Adriatic Sea, Mediterranean. *Ecosystems*, 14(2), 198–222. <https://doi.org/10.1007/s10021-010-9404-8>
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, A., Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jacob, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., ... Schleifer, K. H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, 32(4), 1363. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH293>
- Lugoli, F., Garmendia, M., Lehtinen, S., Kauppila, P., Moncheva, S., Revilla, M., Roselli, L., Slabakova, N., Valencia, V., Dromph, K. M., & Basset, A. (2012). Application of a new multi-metric phytoplankton index to the assessment of ecological status in marine and transitional waters. *Ecological Indicators*, 23, 338–355. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.03.030>
- MacNeil, L., Desai, D. K., Costa, M., & LaRoche, J. (2022a). Combining multi-marker metabarcoding and digital holography to describe eukaryotic plankton across the Newfoundland Shelf. *Scientific Reports*, 12(1), 13078. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17313-w>

- MacNeil, L., Desai, D. K., Costa, M., & LaRoche, J. (2022b). Combining multi-marker metabarcoding and digital holography to describe eukaryotic plankton across the Newfoundland Shelf. *Scientific Reports*, 12(1), 13078. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17313-w>
- Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., Wincker, P., Iudicone, D., de Vargas, C., Bittner, L., Zingone, A., & Bowler, C. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), E1516–E1525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509523113>
- Man-Aharonovich, D., Philosof, A., Kirkup, B. C., Le Gall, F., Yogev, T., Berman-Frank, I., Polz, M. F., Vaultot, D., & Béjà, O. (2010). Diversity of active marine picoeukaryotes in the Eastern Mediterranean Sea unveiled using photosystem-II psbA transcripts. *The ISME Journal*, 4(8), 1044–1052. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.25>
- Mandić, M., Pestorić, B., Marković, O., Durović, M., & Drakulović, D. (2019). Plankton community of trafficked ports as a baseline reference for Non Indigenous Species arrivals. Case study of the Port of Bar (South Adriatic Sea). *Mediterranean Marine Science*, 20(4), 718–726. <https://doi.org/10.12681/mms.19135>
- Mann, D. (1999). The species concept in diatoms. *Phycologia*, 38(6), 437–495. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-38-6-437.1>
- Maranon, E., Holligan, P. M., Barciela, R., Gonzalez, N., Mourino, B., Pazo, M. J., & Varela, M. (2001). Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments. *Marine Ecology Progress Series*, 216, 43–56. <https://doi.org/10.3354/meps216043>
- Marchetto, A., Padedda, B. M., Mariani, M. A., Lugliè, A., & Sechi, N. (2009). A numerical index for evaluating phytoplankton response to changes in nutrient levels in deep mediterranean reservoirs. *Journal of Limnology*, 68(1), 106–121. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2009.106>
- Marić, D., Kraus, R., Godrijan, J., Supić, N., Djakovac, T., & Precali, R. (2012). Phytoplankton response to climatic and anthropogenic influences in the north-eastern Adriatic during the last four decades. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 98–112. <https://doi.org/10.1016/J.ECSS.2012.02.003>
- Marin, B., & Melkonian, M. (2010). Molecular Phylogeny and Classification of the Mamiellophyceae class. Nov. (Chlorophyta) based on Sequence Comparisons of the Nuclear- and Plastid-encoded rRNA Operons. *Protist*, 161(2), 304–336. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.10.002>
- Marini, M., Jones, B. H., Campanelli, A., Grilli, F., & Lee, C. M. (2008). Seasonal variability and Po River plume influence on biochemical properties along western Adriatic coast. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 113(C5). <https://doi.org/10.1029/2007JC004370>
- Martin, J. L., Santi, I., Pitta, P., John, U., & Gypens, N. (2022). Towards quantitative metabarcoding of eukaryotic plankton: An approach to improve 18S rRNA gene copy number bias. *Metabarcoding and Metagenomics*, 6, e85794. <https://doi.org/10.3897/mbmg.6.85794>

- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Marx, V. (2023). Method of the year: Long-read sequencing. *Nature Methods*, 20(1), 6–11. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01730-w>
- Massana, R. (2011). Eukaryotic Picoplankton in Surface Oceans. *Annual Review of Microbiology*, 65(Volume 65, 2011), 91–110. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102903>
- Massana, R., Gobet, A., Audic, S., Bass, D., Bittner, L., Boutte, C., Chambouvet, A., Christen, R., Claverie, J.-M., Decelle, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Forn, I., Forster, D., Guillou, L., Jaillon, O., Kooistra, W. H. C. F., Logares, R., ... De Vargas, C. (2015). Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. *Environmental Microbiology*, 17(10), 4035–4049. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12955>
- Massana, R., & Pedrós-Alió, C. (2008). Unveiling new microbial eukaryotes in the surface ocean. *Current Opinion in Microbiology*, 11(3), 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.04.004>
- Matek, A., Mucko, M., Casotti, R., Trano, A. C., Achterberg, E. P., Mihanović, H., Čižmek, H., Čolić, B., Cuculić, V., & Ljubešić, Z. (2023). Phytoplankton Diversity and Co-Dependency in a Stratified Oligotrophic Ecosystem in the South Adriatic Sea. *Water*, 15(12), 2299. <https://doi.org/10.3390/w15122299>
- McDonald, S. M., Sarno, D., Scanlan, D. J., & Zingone, A. (2007). Genetic diversity of eukaryotic ultraphytoplankton in the Gulf of Naples during an annual cycle. *Aquatic Microbial Ecology*, 50, 75–89. <https://doi.org/10.3354/ame01148>
- McKee, A. M., Spear, S. F., & Pierson, T. W. (2015). The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. *Biological Conservation*, 183, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.031>
- McQuatters-Gollop, A., Stern, R. F., Atkinson, A., Best, M., Bresnan, E., Creach, V., Devlin, M., Holland, M., Ostle, C., Schmidt, K., Sheppard, L., Tarran, G., Woodward, E. M. S., & Tett, P. (2024). The silent majority: Pico- and nanoplankton as ecosystem health indicators for marine policy. *Ecological Indicators*, 159, 111650. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2024.111650>
- Medlin, L. K., Kooistra, W. H., Gersonde, R., & Wellbrock, U. (1996). Evolution of the diatoms (Bacillariophyta). II. Nuclear-encoded small- subunit rRNA sequence comparisons confirm a paraphyletic origin for the centric diatoms. *Molecular Biology and Evolution*, 13(1), 67–75. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025571>
- Medlin, L. K., Metfies, K., Mehl, H., Wiltshire, K., & Valentin, K. (2006). Picoeukaryotic Plankton Diversity at the Helgoland Time Series Site as Assessed by Three Molecular Methods. *Microbial Ecology*, 52(1), 53–71. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-0062-x>
- Meunier, C. L., Alvarez-Fernandez, S., Cunha-Dupont, A., Geisen, C., Malzahn, A. M., Boersma, M., & Wiltshire, K. H. (2018). The craving for phosphorus in heterotrophic dinoflagellates and its

potential implications for biogeochemical cycles. *Limnology and Oceanography*, 63(4), 1774–1784. <https://doi.org/10.1002/lno.10807>

Micheli, F., Halpern, B. S., Walbridge, S., Ciriaco, S., Ferretti, F., Frascchetti, S., Lewison, R., Nykjaer, L., & Rosenberg, A. A. (2013). Cumulative Human Impacts on Mediterranean and Black Sea Marine Ecosystems: Assessing Current Pressures and Opportunities. *PLoS ONE*, 8(12), e79889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079889>

Spellerberg, I. F. (2005). *Monitoring ecological change* (2nd ed.). Cambridge University Press.

Morard, R., Darling, K. F., Mahé, F., Audic, S., Ujiié, Y., Weiner, A. K. M., André, A., Seears, H. A., Wade, C. M., Quillévéré, F., Douady, C. J., Escarguel, G., de Garidel-Thoron, T., Siccha, M., Kucera, M., & de Vargas, C. (2015). PFR2: A curated database of planktonic foraminifera 18S ribosomal DNA as a resource for studies of plankton ecology, biogeography and evolution. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1472–1485. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12410>

Mordret, S., MacKinnon, J., Behnke, J., O’Leary, S. J. B., & Chénard, C. (2024). Identification of phytoplankton isolates from the eastern Canadian waters using long-read sequencing. *Journal of Plankton Research*, 46(6), 527–541. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbae043>

Mordret, S., Piredda, R., Vaultot, D., Montresor, M., Kooistra, W. H. C. F., & Sarno, D. (2018). dinoref: A curated dinoflagellate (Dinophyceae) reference database for the 18S rRNA gene. *Molecular Ecology Resources*, 18(5), 974–987. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12781>

Mordret, S., Piredda, R., Zampicinini, G., Kooistra, W. H. C. F., Zingone, A., Montresor, M., & Sarno, D. (2023). Metabarcoding reveals marked seasonality and a distinctive winter assemblage of dinoflagellates at a coastal LTER site in the Gulf of Naples. *Marine Ecology*, 44(3), e12758. <https://doi.org/10.1111/maec.12758>

Mozetič, P., Cangini, M., Francé, J., Bastianini, M., Bernardi Aubry, F., Bužančić, M., Cabrini, M., Cerino, F., Čalić, M., D’Adamo, R., Drakulović, D., Finotto, S., Fornasaro, D., Grilli, F., Kraus, R., Kužat, N., Marić Pfannkuchen, D., Ninčević Gladan, Ž., Pompei, M., ... Skejić, S. (2019). Phytoplankton diversity in Adriatic ports: Lessons from the port baseline survey for the management of harmful algal species. *Marine Pollution Bulletin*, 147, 117–132. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2017.12.029>

Mozetič, P., Francé, J., Kogovšek, T. Š., Talaber, I., & Malej, A. (2012). Plankton trends and community changes in a coastal sea (northern Adriatic): Bottom-up vs. Top-down control in relation to environmental drivers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 138–148. <https://doi.org/10.1016/J.ECSS.2012.02.009>

Mugnai, F., Costantini, F., Chenuil, A., Leduc, M., Gutiérrez Ortega, J. M., & Megléc, E. (2023). Be positive: Customized reference databases and new, local barcodes balance false taxonomic assignments in metabarcoding studies. *PeerJ*, 11, e14616. <https://doi.org/10.7717/peerj.14616>

Nagarkar, M., Countway, P. D., Du Yoo, Y., Daniels, E., Poulton, N. J., & Palenik, B. (2018). Temporal dynamics of eukaryotic microbial diversity at a coastal Pacific site. *The ISME Journal*, 12(9), 2278–2291. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0172-3>

- Naselli-Flores, L., & Padisák, J. (2023). Ecosystem services provided by marine and freshwater phytoplankton. *Hydrobiologia*, 850(12), 2691–2706. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04795-y>
- Needham, L. L., Calafat, A. M., & Barr, D. B. (2007). Uses and issues of biomonitoring. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(3), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.11.002>
- Neri, F., Romagnoli, T., Accoroni, S., Campanelli, A., Marini, M., Grilli, F., & Totti, C. (2022). Phytoplankton and environmental drivers at a long-term offshore station in the northern Adriatic Sea (1988–2018). *Continental Shelf Research*, 242, 104746. <https://doi.org/10.1016/J.CSR.2022.104746>
- Neri, F., Ubaldi, M., Accoroni, S., Ricci, S., Banchi, E., Romagnoli, T., & Totti, C. (2024). Comparative analysis of phytoplankton diversity using microscopy and metabarcoding: Insights from an eLTER station in the Northern Adriatic Sea. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-024-05692-2>
- Neri, F., Ubaldi, M., Accoroni, S., Ricci, S., Banchi, E., Romagnoli, T., & Totti, C. (2025). Comparative analysis of phytoplankton diversity using microscopy and metabarcoding: Insights from an eLTER station in the Northern Adriatic Sea. *Hydrobiologia*, 852(1), 169–183. <https://doi.org/10.1007/s10750-024-05692-2>
- Newton, A., Icely, J., Cristina, S., Brito, A., Cardoso, A. C., Colijn, F., Riva, S. D., Gertz, F., Hansen, J. W., Holmer, M., Ivanova, K., Leppäkoski, E., Canu, D. M., Mocenni, C., Mudge, S., Murray, N., Pejrup, M., Razinkovas, A., Reizopoulou, S., ... Zaldivar, J.-M. (2014). An overview of ecological status, vulnerability and future perspectives of European large shallow, semi-enclosed coastal systems, lagoons and transitional waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 140, 95–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.05.023>
- Ninčević-Gladan, Ž., Bužančić, M., Kušpilić, G., Grbec, B., Matijević, S., Skejić, S., Marasović, I., & Morović, M. (2015). The response of phytoplankton community to anthropogenic pressure gradient in the coastal waters of the eastern Adriatic Sea. *Ecological Indicators*, 56, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.03.018>
- Not, F., Siano, R., Kooistra, W. H. C. F., Simon, N., Vaultot, D., & Probert, I. (2012). *Diversity and Ecology of Eukaryotic Marine Phytoplankton*. 64, 1–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391499-6.00001-3>
- Nowak, M. M., Słupecka, K., & Jackowiak, B. (2021). Geotagging of natural history collections for reuse in environmental research. *Ecological Indicators*, 131, 108131. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108131>
- Occhipinti-Ambrogi, A., & Galil, B. S. (2004). A uniform terminology on bioinvasions: A chimera or an operative tool? *Marine Pollution Bulletin*, 49(9), 688–694. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.08.011>
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., ... Weedon, J. (2025). *vegan: Community Ecology Package* (R package version 2.8-0).

- Oswalt, S., Oswalt, C., Crall, A., Rabaglia, R., Schwartz, M. K., & Kerns, B. K. (2021). Inventory and Monitoring of Invasive Species. In T. M. Poland, T. Patel-Weynand, D. M. Finch, C. F. Miniat, D. C. Hayes, & V. M. Lopez (Eds.), *Invasive Species in Forests and Rangelands of the United States: A Comprehensive Science Synthesis for the United States Forest Sector* (pp. 231–242). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45367-1_10
- Palinkas, C., Mistri, M., Staver, L., Lipej, L., Kružić, P., Stevenson, J. C., Tamburri, M., Munari, C., & Orlando-Bonaca, M. (2020). Status of Critical Habitats and Invasive Species. In *Coastal Ecosystems in Transition* (pp. 177–202). American Geophysical Union (AGU). <https://doi.org/10.1002/9781119543626.ch9>
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 29(22), 4258–4264. <https://doi.org/10.1111/MEC.15643>
- Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S. S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A. M., Gile, G. H., Holzmann, M., Jahn, R., Jirků, M., Keeling, P. J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., ... Vargas, C. de. (2012). CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. *PLOS Biology*, 10(11), e1001419. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001419>
- Pawlowski, J., Bonin, A., Boyer, F., Cordier, T., & Taberlet, P. (2021). Environmental DNA for biomonitoring. *Molecular Ecology*, 30(13), 2931–2936. <https://doi.org/10.1111/MEC.16023>
- Penna, A., Casabianca, S., Guerra, A. F., Vernesi, C., & Scardi, M. (2017). Analysis of phytoplankton assemblage structure in the Mediterranean Sea based on high-throughput sequencing of partial 18S rRNA sequences. *Marine Genomics*, 36, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2017.06.001>
- Pikelj, K., & Juračić, M. (2013). Eastern Adriatic Coast (EAC): Geomorphology and Coastal Vulnerability of a Karstic Coast. *Journal of Coastal Research*, 29(4), 944–957. <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-12-00136.1>
- Pinsky, M. L., Selden, R. L., & Kitchel, Z. J. (2020). Climate-Driven Shifts in Marine Species Ranges: Scaling from Organisms to Communities. *Annual Review of Marine Science*, 12(Volume 12, 2020), 153–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-010916>
- Piredda, R., Claverie, J. M., Decelle, J., de Vargas, C., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eikrem, W., Forster, D., Kooistra, W. H. C. F., Logares, R., Massana, R., Montresor, M., Not, F., Ogata, H., Pawlowski, J., Romac, S., Sarno, D., Stoeck, T., & Zingone, A. (2018a). Diatom diversity through HTS-metabarcoding in coastal European seas. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36345-9>
- Piredda, R., Claverie, J.-M., Decelle, J., de Vargas, C., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eikrem, W., Forster, D., Kooistra, W. H. C. F., Logares, R., Massana, R., Montresor, M., Not, F., Ogata, H., Pawlowski, J., Romac, S., Sarno, D., Stoeck, T., & Zingone, A. (2018b). Diatom diversity through HTS-metabarcoding in coastal European seas. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36345-9>

- Piredda, R., Tomasino, M. P., Manzari, C., Pesole, G., Montresor, M., C F Kooistra, W. H., Sarno, D., & Zingone, A. (2017). Diversity and temporal patterns of planktonic protist assemblages at a Mediterranean Long Term Ecological Research site. *FEMS Microbiology Ecology*, 93, 200. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw200>
- Pochon, X., Bott, N. J., Smith, K. F., & Wood, S. A. (2013). Evaluating Detection Limits of Next-Generation Sequencing for the Surveillance and Monitoring of International Marine Pests. *PLOS ONE*, 8(9), e73935. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073935>
- Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*, 27(2), 313–338. <https://doi.org/10.1111/MEC.14478>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2007). SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Pyšek, P., & Richardson, D. M. (2010). *Invasive Species, Environmental Change and Management, and Health*. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-033009-095548>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2007.01678.X>
- Reynolds, C. S. (2006). *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Riccardi, N. (2010). Selectivity of plankton nets over mesozooplankton taxa: Implications for abundance, biomass and diversity estimation. *Journal of Limnology*, 69(2), 287–296. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2010.287>
- Rimet, F., Aylagas, E., Borja, Á., Bouchez, A., Canino, A., Chauvin, C., Chonova, T., Ciampor Jr, F., Costa, F. O., Ferrari, B. J. D., Gastineau, R., Goulon, C., Gugger, M., Holzmann, M., Jahn, R., Kahlert, M., Kusber, W.-H., Laplace-Tretyure, C., Leese, F., ... Ekrem, T. (2021). *Metadata standards and practical guidelines for specimen and DNA curation when building barcode reference libraries for aquatic life*. <http://hdl.handle.net/10754/667795>
- Rimet F, Chaumeil P, Keck F, Kermarrec L, Vasselon V, Kahlert M, F. A. & B. A. (2016). R-Syst::diatom a barcode database for diatoms and freshwater biomonitoring data sources and curation procedure. *Database*, baw016.

- Rimet, F., Chaumeil, P., Keck, F., Kermarrec, L., Vasselon, V., Kahlert, M., Franc, A., & Bouchez, A. (2016). R-Syst::diatom: An open-access and curated barcode database for diatoms and freshwater monitoring. *Database*, 2016, 16. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAW016>
- Rimet, F., Gusev, E., Kahlert, M., Kelly, M. G., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Mann, D. G., Pfannkuchen, M., Trobajo, R., Vasselon, V., Zimmermann, J., & Bouchez, A. (2019). Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51500-6>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4(10). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.2584>
- Rolls, R. J., Deane, D. C., Johnson, S. E., Heino, J., Anderson, M. J., & Ellingsen, K. E. (2023). Biotic homogenisation and differentiation as directional change in beta diversity: Synthesising driver–response relationships to develop conceptual models across ecosystems. *Biological Reviews*, 98(4), 1388–1423. <https://doi.org/10.1111/brv.12958>
- Ruan, H.-T., Wang, R.-L., Li, H.-T., Liu, L., Kuang, T.-X., Li, M., & Zou, K.-S. (2022). Effects of sampling strategies and DNA extraction methods on eDNA metabarcoding: A case study of estuarine fish diversity monitoring. *Zoological Research*, 43(2), 192–204. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.331>
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Russo, A., Maccaferri, S., Djakovac, T., Precali, R., Degobbi, D., Deserti, M., Paschini, E., & Lyons, D. M. (2005). Meteorological and oceanographic conditions in the northern Adriatic Sea during the period June 1999–July 2002: Influence on the mucilage phenomenon. *Science of The Total Environment*, 353(1), 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.058>
- Rutten, T. P. A., Sandee, B., & Hofman, A. R. T. (2005). Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: A successful approach? *Cytometry Part A*, 64A(1), 16–26. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20106>
- Salmaso, N., & Tolotti, M. (2021). Phytoplankton and anthropogenic changes in pelagic environments. *Hydrobiologia*, 848(1), 251–284. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04323-w>
- Santi, I., Kasapidis, P., Karakassis, I., Pitta, P., & Wink, M. (2021). *A Comparison of DNA Metabarcoding and Microscopy Methodologies for the Study of Aquatic Microbial Eukaryotes*. <https://doi.org/10.3390/d13050180>
- Santoferrara, L., Burki, F., Filker, S., Logares, R., Dunthorn, M., & McManus, G. B. (2020). Perspectives from Ten Years of Protist Studies by High-Throughput Metabarcoding. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 67(5), 612–622. <https://doi.org/10.1111/jeu.12813>

- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schmidt, K., Birchill, A. J., Atkinson, A., Brewin, R. J. W., Clark, J. R., Hickman, A. E., Johns, D. G., Lohan, M. C., Milne, A., Pardo, S., Polimene, L., Smyth, T. J., Tarran, G. A., Widdicombe, C. E., Woodward, E. M. S., & Ussher, S. J. (2020). Increasing picocyanobacteria success in shelf waters contributes to long-term food web degradation. *Global Change Biology*, 26(10), 5574–5587. <https://doi.org/10.1111/gcb.15161>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Seoane, S., Laza, A., & Orive, E. (2006). Monitoring phytoplankton assemblages in estuarine waters: The application of pigment analysis and microscopy to size-fractionated samples. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67(3), 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2005.10.020>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Sherwood, A. R., & Presting, G. G. (2007). UNIVERSAL PRIMERS AMPLIFY A 23S rDNA PLASTID MARKER IN EUKARYOTIC ALGAE AND CYANOBACTERIA. *Journal of Phycology*, 43(3), 605–608. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00341.x>
- Sildever, S., Kawakami, Y., Kanno, N., Kasai, H., Shiimoto, A., Katakura, S., & Nagai, S. (2019). Toxic HAB species from the Sea of Okhotsk detected by a metagenetic approach, seasonality and environmental drivers. *Harmful Algae*, 87, 101631. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101631>
- Sildever, S., Nishi, N., Inaba, N., Asakura, T., Kikuchi, J., Asano, Y., Kobayashi, T., Gojobori, T., Nagai, S., & Leese, F. (2022). Monitoring harmful microalgal species and their appearance in Tokyo Bay, Japan, using metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics* 6: E79471, 6, e79471-. <https://doi.org/10.3897/MBMG.6.79471>
- Simmons, M. P., Sudek, S., Monier, A., Limardo, A. J., Jimenez, V., Perle, C. R., Elrod, V. A., Pennington, J. T., & Worden, A. Z. (2016). Abundance and Biogeography of Picoprasinophyte Ecotypes and Other Phytoplankton in the Eastern North Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1693–1705. <https://doi.org/10.1128/AEM.02730-15>
- Skejić, S., Milić Roje, B., Matić, F., Arapov, J., Francé, J., Bužančić, M., Bakrač, A., Straka, M., & Ninčević Gladan, Ž. (2024). Phytoplankton Assemblage over a 14-Year Period in the Adriatic Sea: Patterns and Trends. *Biology*, 13(7), 493. <https://doi.org/10.3390/biology13070493>
- Skjelbred, B., Horsberg, T. E., Tollefsen, K. E., Andersen, T., & Edvardsen, B. (2011). Toxicity of the ichthyotoxic marine flagellate *Pseudochattonella* (Dictyochophyceae, Heterokonta) assessed by six bioassays. *Harmful Algae*, 10(2), 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.08.007>

- Slišković, M., Piria, M., Nerlović, V., Ivelja, K. P., Gavrilović, A., & Mrčelić, G. J. (2021). Non-indigenous species likely introduced by shipping into the Adriatic Sea. *Marine Policy*, 129, 104516. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2021.104516>
- Specchia, V., Zangaro, F., Tzafesta, E., Saccomanno, B., Vadrucchi, M. R., & Pinna, M. (2023). Environmental DNA detects biodiversity and ecological features of phytoplankton communities in Mediterranean transitional waters. *Scientific Reports*, 13(1), 15192. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42389-3>
- Stachowicz, J. J., Terwin, J. R., Whitlatch, R. B., & Osman, R. W. (2002). Linking climate change and biological invasions: Ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15497–15500. <https://doi.org/10.1073/pnas.242437499>
- Sterner, R. W., & Elser, J. J. (2017). *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press. <https://doi.org/10.1515/9781400885695>
- Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M. D. M., Breiner, H. W., & Richards, T. A. (2010a). Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, 19 Suppl 1(SUPPL. 1), 21–31. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2009.04480.X>
- Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M. D. M., Breiner, H. W., & Richards, T. A. (2010b). Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, 19(SUPPL. 1), 21–31. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2009.04480.X>
- Stoecker, D. K. (1999). Mixotrophy among Dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 397–401. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04619.x>
- Streftaris, N., & Papathanassiou, A. Z. & E. (2005). Globalisation in Marine Ecosystems: The Story of Non-Indigenous Marine Species Across European Seas. In *Oceanography and Marine Biology*. CRC Press.
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Tanabe, A. S., Nagai, S., Hida, K., Yasuike, M., Fujiwara, A., Nakamura, Y., Takano, Y., & Katakura, S. (2016). Comparative study of the validity of three regions of the 18S-rRNA gene for massively parallel sequencing-based monitoring of the planktonic eukaryote community. *Molecular Ecology Resources*, 16(2), 402–414. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12459>

- Taylor, F. J. R., Hoppenrath, M., & Saldarriaga, J. F. (2008). Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiversity and Conservation*, 17(2), 407–418. <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9258-3>
- Teixeira, H., Berg, T., Uusitalo, L., Fürhaupter, K., Heiskanen, A. S., Mazik, K., Lynam, C. P., Neville, S., Rodriguez, J. G., Papadopoulou, N., Moncheva, S., Churilova, T., Kryvenko, O., Krause-Jensen, D., Zaiko, A., Veríssimo, H., Pantazi, M., Carvalho, S., Patrício, J., ... Borja, À. (2016). A catalogue of marine biodiversity indicators. *Frontiers in Marine Science*, 3(NOV), 207. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2016.00207/BIBTEX>
- Thalinger, B., Deiner, K., Harper, L. R., Rees, H. C., Blackman, R. C., Sint, D., Traugott, | Michael, Goldberg, C. S., & Bruce, K. (2021). A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. *Environmental DNA*, 3, 823–836. <https://doi.org/10.1002/edn3.189>
- Tilman, D., Kilham, S. S., & Kilham, P. (1982). Phytoplankton Community Ecology: The Role of Limiting Nutrients. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 13(Volume 13,), 349–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.13.110182.002025>
- Torresan, S., Gallina, V., Gualdi, S., Bellafore, D., Umgiesser, G., Carniel, S., Sclavo, M., Benetazzo, A., Giubilato, E., & Critto, A. (2019). Assessment of Climate Change Impacts in the North Adriatic Coastal Area. Part I: A Multi-Model Chain for the Definition of Climate Change Hazard Scenarios. *Water*, 11(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/w11061157>
- Totti, C., Romagnoli, T., Accoroni, S., Coluccelli, A., Pellegrini, M., Campanelli, A., Grilli, F., & Marini, M. (2019). Phytoplankton communities in the northwestern Adriatic Sea: Interdecadal variability over a 30-years period (1988–2016) and relationships with meteoroclimatic drivers. *Journal of Marine Systems*, 193, 137–153. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2019.01.007>
- Tragin, M., Zingone, A., & Vaulot, D. (2018). Comparison of coastal phytoplankton composition estimated from the V4 and V9 regions of the 18S rRNA gene with a focus on photosynthetic groups and especially Chlorophyta. *Environmental Microbiology*, 20(2), 506–520. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13952>
- Tsirintanis, K., Azzurro, E., Crocetta, F., Dimiza, M., Frogli, C., Gerovasileiou, V., Langeneck, J., Mancinelli, G., Rosso, A., Stern, N., Triantaphyllou, M., Tsiamis, K., Turon, X., Verlaque, M., Zenetos, A., & Katsanevakis, S. (2022). Bioinvasion impacts on biodiversity, ecosystem services, and human health in the Mediterranean Sea. *Aquatic Invasions*, 17(3), 308–352. <https://doi.org/10.3391/ai.2022.17.3.01>
- Türk Dermastia, T., Vascotto, I., Francé, J., Stanković, D., & Mozetič, P. (2023). Evaluation of the rbcL marker for metabarcoding of marine diatoms and inference of population structure of selected genera. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1071379>
- Tweddle, J. F., Gubbins, M., & Scott, B. E. (2018). Should phytoplankton be a key consideration for marine management? *Marine Policy*, 97, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.08.026>

Ugya, A. Y., Yan, C., Chen, H., & Wang, Q. (2025). Unravelling the eco-monitoring potential of phytoplankton towards a sustainable aquatic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*, 216, 118021. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.118021>

Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik: Mit 1 Tabelle und 15 abbildungen im Text und auf 1 Tafel. *Internationale Vereinigung Für Theoretische Und Angewandte Limnologie: Mitteilungen*, 9(1), 1–38. <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>

Uusitalo, L., Blanchet, H., Andersen, J. H., Beauchard, O., Berg, T., Bianchelli, S., Cantafaro, A., Carstensen, J., Carugati, L., Cochrane, S., Danovaro, R., Heiskanen, A.-S., Karvinen, V., Moncheva, S., Murray, C., Neto, J. M., Nygård, H., Pantazi, M., Papadopoulou, N., ... Borja, A. (2016). Indicator-Based Assessment of Marine Biological Diversity—Lessons from 10 Case Studies across the European Seas. *Frontiers in Marine Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00159>

Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110–117. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2008.09.011>

van der Loos, L. M., & Nijland, R. (2021). Biases in bulk: DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved. *Molecular Ecology*, 30(13), 3270–3288. <https://doi.org/10.1111/MEC.15592>

Varkitzi, I., Francé, J., Basset, A., Cozzoli, F., Stanca, E., Zervoudaki, S., Giannakourou, A., Assimakopoulou, G., Venetsanopoulou, A., Mozetič, P., Tinta, T., Skejic, S., Vidjak, O., Cadiou, J.-F., & Pagou, K. (2018). Pelagic habitats in the Mediterranean Sea: A review of Good Environmental Status (GES) determination for plankton components and identification of gaps and priority needs to improve coherence for the MSFD implementation. *Ecological Indicators*, 95, 203–218. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.07.036>

Vascotto, I., Mozetič, P., & Francé, J. (2021). Phytoplankton Time-Series in a LTER Site of the Adriatic Sea: Methodological Approach to Decipher Community Structure and Indicative Taxa. *Water*, 13(15), 2045. <https://doi.org/10.3390/w13152045>

Vaulot, D., Eikrem, W., Viprey, M., & Moreau, H. (2008). The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 795–820. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00121.x>

Vaulot, D., Mahé, F., & Geisen, S. (2020). pr2-primer: An 18S rRNA primer database for protists. *Methods in Ecology and Evolution*, submitted, 0–2.

Vierna, J., Doña, J., Vizcaíno, A., Serrano, D., Jovani, R., & Chain, F. (2017). PCR cycles above routine numbers do not compromise high-throughput DNA barcoding results. *Genome*, 60(10), 868–873. <https://doi.org/10.1139/GEN-2017-0081>

Viličić, D. (1989). Phytoplankton population density and volume as indicators of eutrophication in the eastern part of the Adriatic Sea. *Hydrobiologia*, 174(2), 117–132. <https://doi.org/10.1007/BF00014060>

Viličić, D., Djakovac, T., Burić, Z., & Bosak, S. (2009). Composition and annual cycle of phytoplankton assemblages in the northeastern Adriatic Sea. *Botanica Marina*, 52(4), 291–305. <https://doi.org/10.1515/BOT.2009.004>

Viličić, D., Marasović, I., & Mioković, D. (2002). Checklist of phytoplankton in the eastern Adriatic Sea. *Acta Botanica Croatica*, 61(1), 57–91.

Vlašiček, I., Marić Pfannkuchen, D., Smoldaka Tanković, M., Baričević, A., Kužat, N., Knjaz, M., Grižančić, L., Podolšak, I., Kogovšek, T., & Pfannkuchen, M. (2025). Cluster analysis of long-term phytoplankton data from the Northern Adriatic reveals environmental influences and disruptions in seasonal patterns. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 13. <https://doi.org/10.3389/fevo.2025.1498307>

Wang, C., Gu, J., Li, W., Wang, J., Wang, Z., & Lin, Q. (2024). Metabarcoding reveals a high diversity and complex eukaryotic microalgal community in coastal waters of the northern Beibu Gulf, China. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1403964>

Wang, H., Lu, D., Huang, H., Göbel, J., Dai, X., & Xia, P. (2011). First observation of *Karlodinium veneficum* from the East China Sea and the coastal waters of Germany. *Acta Oceanologica Sinica*, 30(6), 112–121. <https://doi.org/10.1007/s13131-011-0168-6>

Wang, J., Liu, Q., Huang, S., Mertens, K. N., Pospelova, V., Shen, X., & Gu, H. (2025). High-resolution DNA metabarcoding of modern surface sediments uncovers a diverse assemblage of dinoflagellate cysts in the Pacific and Arctic Oceans. *Marine Pollution Bulletin*, 215, 117899. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.117899>

Wangensteen, O. S., Palacín, C., Guardiola, M., & Turon, X. (2018). DNA metabarcoding of littoral hardbottom communities: High diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*, 2018(5), e4705. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.4705/SUPP-12>

Wasmund, N., Göbel, J., & Bodungen, B. v. (2008). 100-years-changes in the phytoplankton community of Kiel Bight (Baltic Sea). *Journal of Marine Systems*, 73(3), 300–322. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2006.09.009>

Weigand, H., Beermann, A. J., Čiampor, F., Costa, F. O., Csabai, Z., Duarte, S., Geiger, M. F., Grabowski, M., Rimet, F., Rulik, B., Strand, M., Szucsich, N., Weigand, A. M., Willassen, E., Wyler, S. A., Bouchez, A., Borja, A., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Ferreira, S., ... Ekrem, T. (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of The Total Environment*, 678, 499–524. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.247>

Weydmann-Zwolicka, A., Dąbrowska, A. M., Mioduchowska, M., & Zwolicki, A. (2024). Comparison of DNA metabarcoding and microscopy in analysing planktonic protists from the European Arctic. *Marine Biodiversity*, 54(3), 44. <https://doi.org/10.1007/s12526-024-01436-6>

Wickham, H. (2009). Ggplot2. *Ggplot2*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>

- Wilkinson, M. D., Dumontier, M., Aalbersberg, I. J. J., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg, N., Boiten, J.-W., da Silva Santos, L. B., Bourne, P. E., Bouwman, J., Brookes, A. J., Clark, T., Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C. T., Finkers, R., ... Mons, B. (2016). The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Scientific Data*, 3, 160018. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.18>
- Wiltshire, K. H., & Manly, B. F. J. (2004). The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: Phytoplankton response. *Helgoland Marine Research*, 58(4), 269–273. <https://doi.org/10.1007/s10152-004-0196-0>
- Winder, M., & Sommer, U. (2012). Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia*, 698(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1149-2>
- Worden, A. Z. (2006). Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 43, 165–175. <https://doi.org/10.3354/ame043165>
- Wu, N., Schmalz, B., & Fohrer, N. (2011). A comparison of phytoplankton assemblages generated by two sampling protocols in a German lowland catchment. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 47(4), 313–323. <https://doi.org/10.1051/limn/2011045>
- Xue, Y., Chen, H., Yang, J. R., Liu, M., Huang, B., & Yang, J. (2018). Distinct patterns and processes of abundant and rare eukaryotic plankton communities following a reservoir cyanobacterial bloom. *The ISME Journal*, 12(9), 2263–2277. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0159-0>
- Yarimizu, K., Fujiiyoshi, S., Kawai, M., Norambuena-Subiabre, L., Cascales, E.-K., Rilling, J.-I., Vilugrón, J., Cameron, H., Vergara, K., Morón-López, J., Acuña, J. J., Gajardo, G., Espinoza-González, O., Guzmán, L., Jorquera, M. A., Nagai, S., Pizarro, G., Riquelme, C., Ueki, S., & Maruyama, F. (2020). Protocols for Monitoring Harmful Algal Blooms for Sustainable Aquaculture and Coastal Fisheries in Chile. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207642>
- Yoccoz, N. G. (2012). The future of environmental DNA in ecology. *Molecular Ecology*, 21(8), 2031–2038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05505>
- Zenetos, A., Çinar, M. E., Crocetta, F., Golani, D., Rosso, A., Servello, G., Shenkar, N., Turon, X., & Verlaque, M. (2017). Uncertainties and validation of alien species catalogues: The Mediterranean as an example. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 191, 171–187. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.03.031>
- Zhang, G. K., Chain, F. J. J., Abbott, C. L., & Cristescu, M. E. (2018). Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. *Evolutionary Applications*, 11(10), 1901–1914. <https://doi.org/10.1111/eva.12694>
- Zimmermann, J., Abarca, N., Enk, N., Skibbe, O., Kusber, W.-H., & Jahn, R. (2014). Taxonomic Reference Libraries for Environmental Barcoding: A Best Practice Example from Diatom Research. *PLOS ONE*, 9(9), e108793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108793>

7. PRILOZI

Prilog 1. Popis postaja uključenih u uzorkovanje s pripadajućim koordinatama, načinom uzorkovanja te učestalošću uzorkovanja

Naziv postaje	Teren	Koordinate	Način uzorkovanja	Učestalost uzorkovanja
RV001	LTRV/PO	45°4'48" N, 13°36'36" E	Mreža i crpac	Mjesečno
RV004	LTRV	45°3'43" N, 13°32'57" E	Mreža i crpac	Mjesečno
SJ107	PO	45°2'54" N, 13°19' E	Mreža i crpac	Sezonski
SJ101	PO	44°59'54" N, 12°49'48" E	Mreža i crpac	Sezonski
SJ108	PO	44°45'24" N, 12°45' E	Mreža i crpac	Sezonski
ZI012	RC	45°26'6" N, 13°23'48" E	Mreža	Sezonski
ZI052	RC	44°42'6" N, 13°48'12" E	Mreža	Sezonski
RI019	RC	45°14'48" N, 14°25' E	Mreža	Sezonski
JPA23	RC	44°35'27" N, 13°59'41" E	Mreža	Sezonski
FPA34	RC	44°54'3.18" N, 14°28'21" E	Mreža	Sezonski
CR001	RC	45°10'24" N, 14°39'24" E	Mreža	Sezonski

Prilog 2. Popis evaluacijskih uzoraka korištenih za procjenu operativnosti referentne baze CIMPhyl8

Uzorak	Datum	Geografska širina	Geografska dužina	Pristupni broj uzorka	Pristupni broj studije	Naziv institucije	Projekt	Broj čitanja
ERR10370679	3.4.2012	40.808334 N	14.25 E	SAMEA 111457681	PRJEB 56637	Stazione Zoologica Anton Dohrn	LTER- Marechiaro_2011- 2013	314529
ERR10370686	18.9.2012	40.808334 N	14.25 E	SAMEA 111457688	PRJEB 56637	Stazione Zoologica Anton Dohrn	LTER- Marechiaro_2011- 2013	251712
ERR10370688	23.10.2012	40.808334 N	14.25 E	SAMEA 111457690	PRJEB 56637	Stazione Zoologica Anton Dohrn	LTER- Marechiaro_2011- 2013	251508
ERR10370680	4.5.2012	40.808334 N	14.25 E	SAMEA 111457682	PRJEB 56637	Stazione Zoologica Anton Dohrn	LTER- Marechiaro_2011- 2013	374150
ERR10370703	10.9.2013	40.808334 N	14.25 E	SAMEA 111457705	PRJEB 56637	Stazione Zoologica Anton Dohrn	LTER- Marechiaro_2011- 2013	277740
ERR10370669	16.8.2011	40.808334 N	14.25 E	SAMEA 111478410	PRJEB 56637	Stazione Zoologica Anton Dohrn	LTER- Marechiaro_2011- 2013	112647
ERR10370678	7.3.2012	40.808334 N	14.25 E	SAMEA 111457680	PRJEB 56637	Stazione Zoologica Anton Dohrn	LTER- Marechiaro_2011- 2013	289001

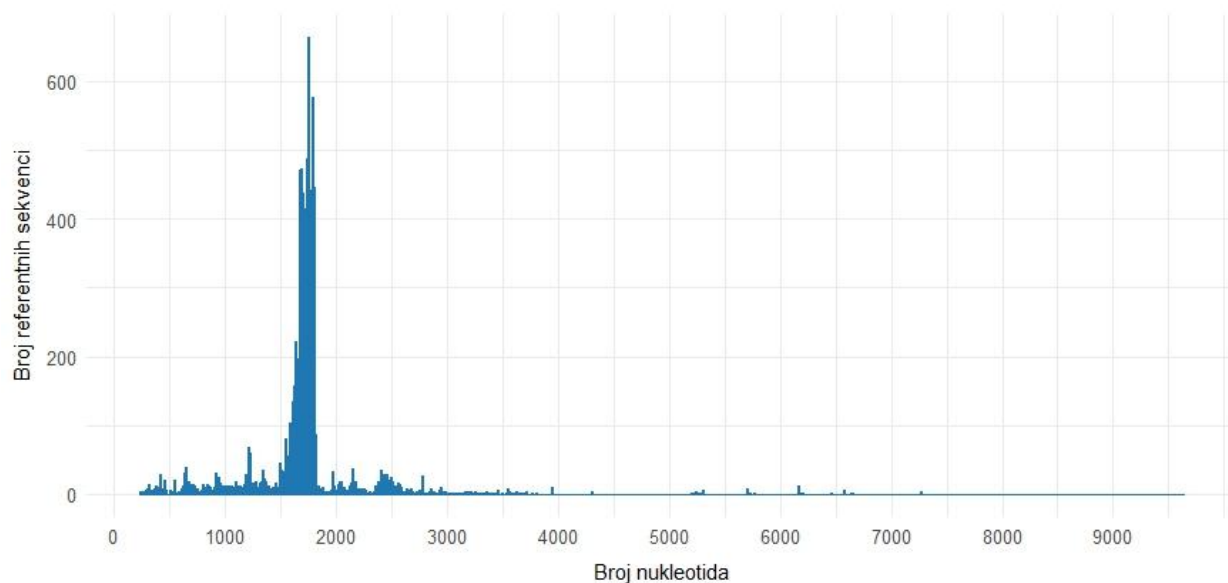
Prilog 2. Popis evaluacijskih uzoraka korištenih za procjenu operativnosti referentne baze CIMPhyl8 - nastavak

ERR10370681	5.6.2012	40.808334 N	14.25 E	SAMEA 111457683	PRJEB 56637	Stazione Zoologica Anton Dohrn	LTER- Marechiaro_2011- 2013	416063
ERR7228413	15.12.2010	48.7717 N	3.9683 W	SAMEA 10768898	PRJEB 48571	Station Biologique de Roscoff	SOMLIT-Astan time-series (2009- 2016)	48493
ERR7228407	15.10.2010	48.7717 N	3.9683 W	SAMEA 10768892	PRJEB 48571	Station Biologique de Roscoff	SOMLIT-Astan time-series (2009- 2016)	45271
ERR7228399	19.8.2010	48.7717 N	3.9683 W	SAMEA 10768884	PRJEB 48571	Station Biologique de Roscoff	SOMLIT-Astan time-series (2009- 2016)	41831
ERR7228393	6.7.2010	48.7717 N	3.9683 W	SAMEA 10768878	PRJEB 48571	Station Biologique de Roscoff	SOMLIT-Astan time-series (2009- 2016)	34678
ERR7228432	25.5.2011	48.7717 N	3.9683 W	SAMEA 10768917	PRJEB 48571	Station Biologique de Roscoff	SOMLIT-Astan time-series (2009- 2016)	46534
ERR7228483	12.7.2012	48.7717 N	3.9683 W	SAMEA 10768969	PRJEB 48571	Station Biologique de Roscoff	SOMLIT-Astan time-series (2009- 2016)	117488
ERR7228487	10.8.2012	48.7717 N	3.9683 W	SAMEA 10768973	PRJEB 48571	Station Biologique de Roscoff	SOMLIT-Astan time-series (2009- 2016)	107932
ERR7228477	29.5.2012	48.7717 N	3.9683 W	SAMEA 10768963	PRJEB 48571	Station Biologique de Roscoff	SOMLIT-Astan time-series (2009- 2016)	176087
LTRV86	11.12.2020	45.06185 N	13.549164 E	Nije objavljeno		Centar za istraživanje mora, IRB	LTRV	50957

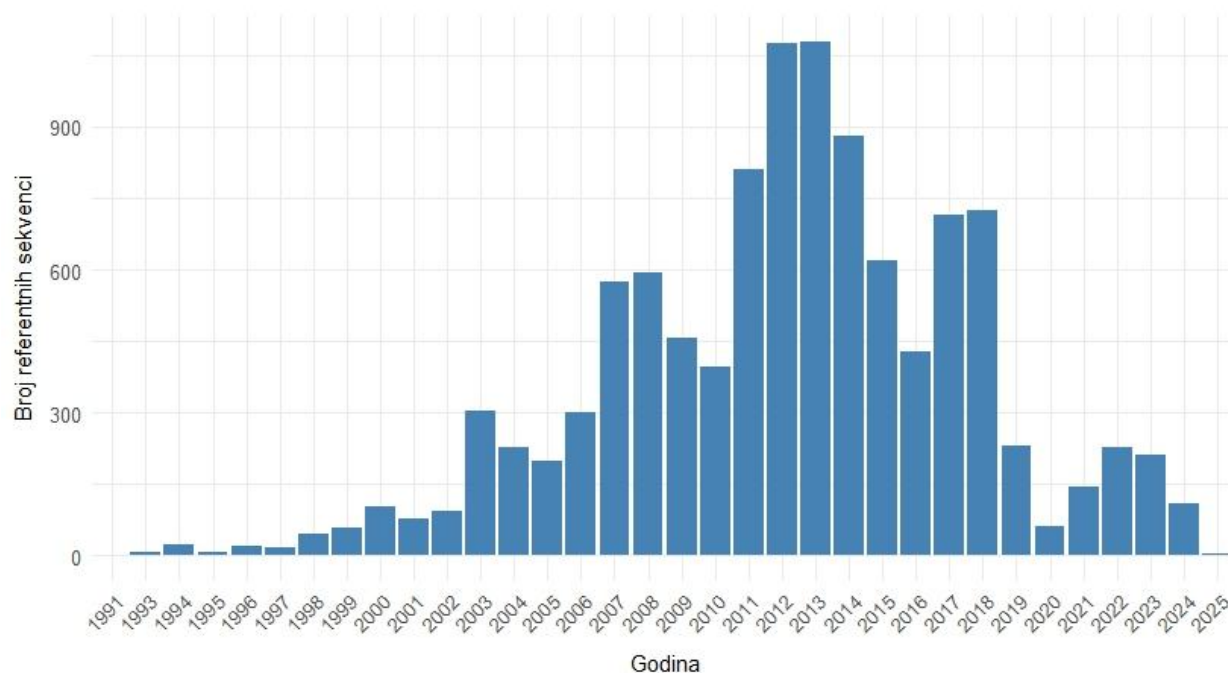
Prilog 2. Popis evaluacijskih uzoraka korištenih za procjenu operativnosti referentne baze CIMPhyl8 – nastavak

LTRV87	11.12.2020	45.06185 N	13.549164 E	Nije objavljeno	Centar za istraživanje mora, IRB	LTRV	51466
LTRV224	16.5.2022	45.06185 N	13.549164 E	Nije objavljeno	Centar za istraživanje mora, IRB	LTRV	48758
LTRV152	20.8.2021	45.06185 N	13.549164 E	Nije objavljeno	Centar za istraživanje mora, IRB	LTRV	61028
LTRV151	20.8.2021	45.06185 N	13.549164 E	Nije objavljeno	Centar za istraživanje mora, IRB	LTRV	71949
PO107	15.6.2021	44.75667 N	12.75 E	Nije objavljeno	Centar za istraživanje mora, IRB	LTRV	56548
PO171	27.4.2022	44.75667 N	12.75 E	Nije objavljeno	Centar za istraživanje mora, IRB	LTRV	64055
PO172	27.4.2022	44.75667 N	12.75 E	Nije objavljeno	Centar za istraživanje mora, IRB	LTRV	70035

Prilog 3. Distribucija duljine referentnih sekvenci u CIMPhy18. Većina sekvenci duljine je oko 1800 nukleotidnih baza (min = 233, maks = 9 649, medijan = 1731)



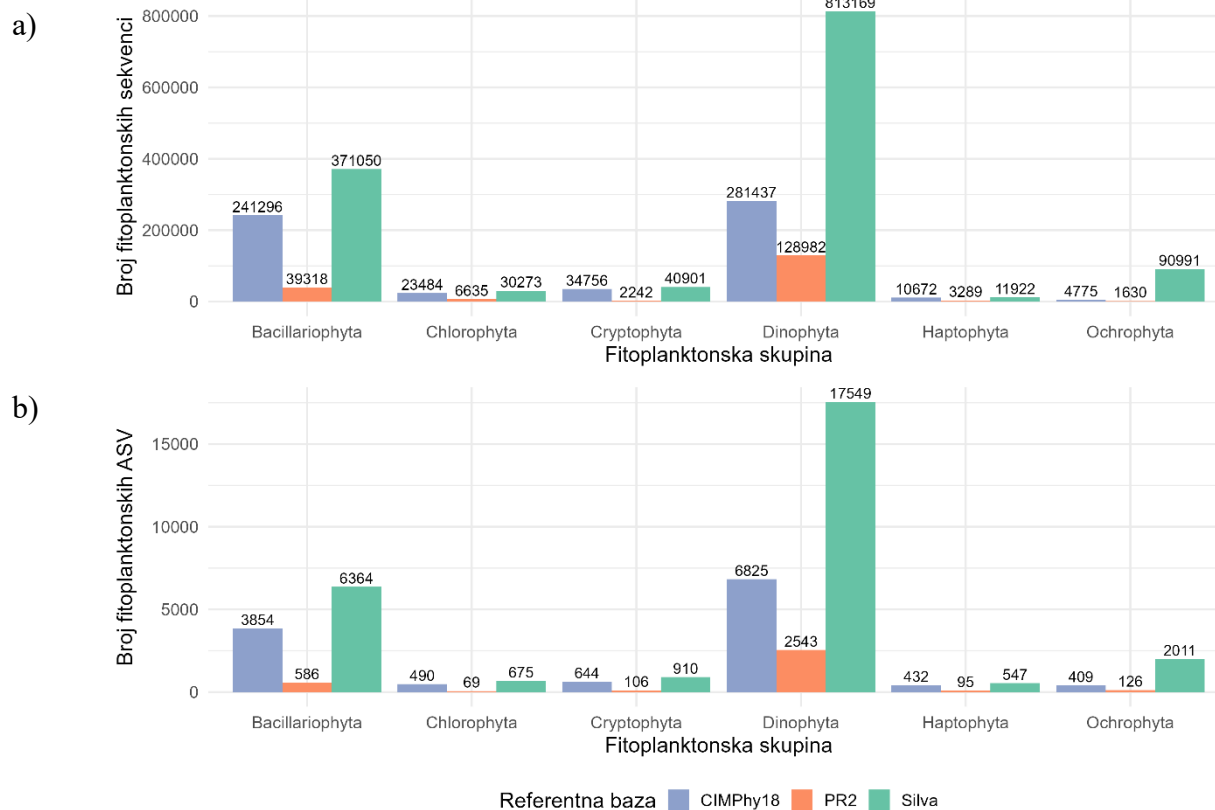
Prilog 4. Distribucija referentnih sekvenci u CIMPhy18 s obzirom na datum objavljivanja u referentnim bazama, unesenih do 01.01.2025.



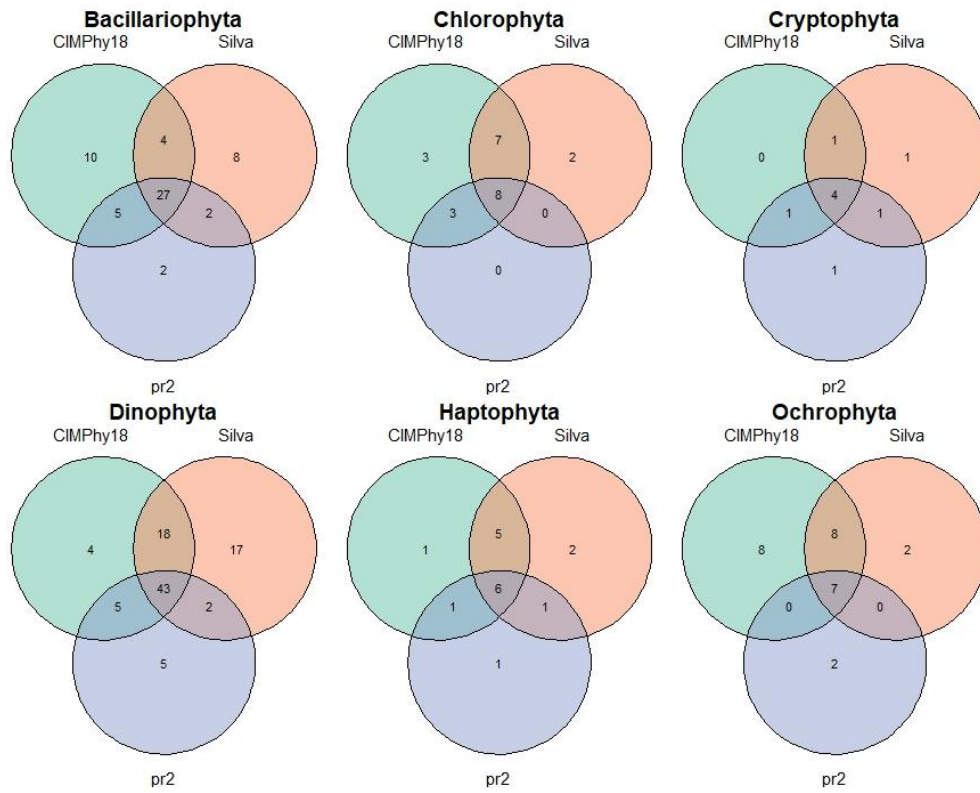
Prilog 5. Udio nedodijeljenih sekvenci na razini roda ili vrste po skupinama za evaluacijski set okolišnih uzoraka za svaku korištenu referentnu bazu



Prilog 1. Brojnosti taksonomski određenih fitoplanktonskih sekvenci i fitoplanktonskih ASV dobivenih korištenjem tri različite referentne baze: CIMPhy18, PR2, i Silva



Prilog 7. Usporedba taksonomske pokrivenosti na razini roda između tri korištene referentne baze prema fitoplanktonskim skupinama



Prilog 8. Indeksi alfa raznolikosti za evaluacijske okolišne uzorke po referentnim bazama

Referentna baza	Izvor	Uzorak	Shannon	Simpson	InvSimpson	Pielou
CIMPhy18	Napulj	ERR10370669	4,457905	0,949704	19,88231	0,985872
Silva	Napulj	ERR10370669	4,789471	0,95818	23,91189	1,056672
pr2	Napulj	ERR10370669	2,193583	0,635391	2,742665	0,56974
CIMPhy18	Napulj	ERR10370678	4,84708	0,967152	30,44362	1,129734
Silva	Napulj	ERR10370678	5,172279	0,962145	26,41682	1,197983
pr2	Napulj	ERR10370678	3,055451	0,783453	4,617926	0,839967
CIMPhy18	Napulj	ERR10370679	5,356717	0,984761	65,62089	1,222429
Silva	Napulj	ERR10370679	5,501003	0,974002	38,46438	1,244897
pr2	Napulj	ERR10370679	3,167006	0,793226	4,836191	0,831964
CIMPhy18	Napulj	ERR10370680	5,627933	0,986095	71,91431	1,224763
Silva	Napulj	ERR10370680	5,129799	0,952211	20,92539	1,109152
pr2	Napulj	ERR10370680	2,556036	0,638907	2,769371	0,640774
CIMPhy18	Napulj	ERR10370681	5,429917	0,977223	43,90442	1,23219
Silva	Napulj	ERR10370681	6,161769	0,989485	95,09918	1,36934
pr2	Napulj	ERR10370681	4,492625	0,949029	19,61912	1,142631
CIMPhy18	Napulj	ERR10370686	4,741139	0,969091	32,35272	1,064385
Silva	Napulj	ERR10370686	5,324291	0,979547	48,8936	1,192208
pr2	Napulj	ERR10370686	3,763937	0,939996	16,66562	0,9831
CIMPhy18	Napulj	ERR10370688	5,560345	0,985612	69,50462	1,232658
Silva	Napulj	ERR10370688	5,664293	0,981378	53,69864	1,224719
pr2	Napulj	ERR10370688	3,161738	0,872597	7,84913	0,825812
CIMPhy18	Napulj	ERR10370703	5,384611	0,984013	62,55053	1,161796
Silva	Napulj	ERR10370703	5,900637	0,988644	88,06097	1,255326
pr2	Napulj	ERR10370703	4,023056	0,916315	11,94958	0,990792
CIMPhy18	Roscoff	ERR7228393	4,194458	0,953921	21,70206	0,980777
Silva	Roscoff	ERR7228393	4,883074	0,971856	35,53163	1,124147
pr2	Roscoff	ERR7228393	1,934648	0,56934	2,322017	0,563382
CIMPhy18	Roscoff	ERR7228399	4,355362	0,964301	28,01217	1,043354
Silva	Roscoff	ERR7228399	5,044366	0,980014	50,03576	1,195487
pr2	Roscoff	ERR7228399	3,412467	0,932116	14,73102	1,003313
CIMPhy18	Roscoff	ERR7228407	4,720693	0,976334	42,25448	1,080387
Silva	Roscoff	ERR7228407	5,489588	0,988018	83,45809	1,263774
pr2	Roscoff	ERR7228407	3,613776	0,941247	17,02053	1,073198
CIMPhy18	Roscoff	ERR7228413	4,949316	0,984049	62,6937	1,153563
Silva	Roscoff	ERR7228413	5,518892	0,989314	93,58042	1,282251
pr2	Roscoff	ERR7228413	3,62749	0,936922	15,85333	1,100628
CIMPhy18	Roscoff	ERR7228432	4,637201	0,974279	38,87866	1,038356
Silva	Roscoff	ERR7228432	5,285648	0,986335	73,17825	1,202801
pr2	Roscoff	ERR7228432	3,717634	0,944168	17,91081	0,982412

Prilog 8. Indeksi alfa raznolikosti za evaluacijske okolišne uzorke po referentnim bazama - nastavak

CIMPhy18	Roscoff	ERR7228477	4,748821	0,961253	25,80871	1,066109
Silva	Roscoff	ERR7228477	5,512901	0,985207	67,59779	1,240903
pr2	Roscoff	ERR7228477	4,390782	0,967678	30,93904	1,146825
CIMPhy18	Roscoff	ERR7228483	4,711083	0,972398	36,22865	1,098037
Silva	Roscoff	ERR7228483	5,275849	0,982778	58,06419	1,203975
pr2	Roscoff	ERR7228483	2,778705	0,754387	4,071439	0,781556
CIMPhy18	Roscoff	ERR7228487	4,304664	0,952739	21,15928	0,966396
Silva	Roscoff	ERR7228487	5,005007	0,973088	37,15881	1,12959
pr2	Roscoff	ERR7228487	3,982306	0,955781	22,61488	1,087004
CIMPhy18	CIM	LTRV151	4,540223	0,97718	43,82156	1,192704
Silva	CIM	LTRV151	4,028034	0,920573	12,59023	1,029655
pr2	CIM	LTRV151	2,925156	0,791157	4,788283	0,932917
CIMPhy18	CIM	LTRV152	5,001121	0,988462	86,66939	1,321583
Silva	CIM	LTRV152	5,455503	0,989226	92,81314	1,374081
pr2	CIM	LTRV152	3,00077	0,863093	7,30425	0,910473
CIMPhy18	CIM	LTRV224	4,567563	0,981415	53,80708	1,264931
Silva	CIM	LTRV224	4,299786	0,954353	21,90739	1,116785
pr2	CIM	LTRV224	4,179116	0,967326	30,60556	1,475044
CIMPhy18	CIM	LTRV86	5,464007	0,987084	77,42616	1,229898
Silva	CIM	LTRV86	6,147496	0,992933	141,4987	1,373025
pr2	CIM	LTRV86	4,382972	0,958664	24,19214	1,172648
CIMPhy18	CIM	LTRV87	5,037435	0,968792	32,04267	1,127976
Silva	CIM	LTRV87	5,990083	0,98437	63,98104	1,318445
pr2	CIM	LTRV87	3,968469	0,92782	13,85429	1,075793
CIMPhy18	CIM	PO107	4,195946	0,956603	23,04316	1,037817
Silva	CIM	PO107	4,640738	0,96738	30,65645	1,120103
pr2	CIM	PO107	3,259682	0,907662	10,8298	1,000487
CIMPhy18	CIM	PO171	4,086986	0,946448	18,6736	1,168877
Silva	CIM	PO171	4,480959	0,961749	26,14326	1,250435
pr2	CIM	PO171	2,69865	0,750625	4,010023	0,933669
CIMPhy18	CIM	PO172	3,693802	0,945417	18,32064	1,108516
Silva	CIM	PO172	3,337549	0,868418	7,599808	0,963013
pr2	CIM	PO172	3,719927	0,961785	26,1675	1,615544

Prilog 8a Statistička analiza indeksa raznolikosti na temelju Kruskal-Wallis s Dunn post hoc testom na okolišnim evaluacijskim uzorcima s obzirom na korištenu referentnu bazu (ns - nije statistički značajno, $p > 0.05$; $p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: ***; $p < 0.0001$: ****)

Kruskal-Wallis	χ^2	Stupnjevi slobode	p- vrijednost	Značajnost
InvSimpson	34,85	2	0,000000027100	****
Pielou	20,67	2	0,000032500000	****
Richness	33,14	2	0,000000063700	****
Shannon	42,52	2	0,000000000584	****
Simpson	34,85	2	0,000000027100	****

Indeks	Usporedba	Z- vrijednost	p- vrijednost	Prilagođena p- vrijednost	Značajnost
InvSimpson	CIMPhy18 - PR2	-4,7449	0,0000020857	0,0000062570	****
InvSimpson	CIMPhy18 - Silva	0,6690	0,5035073260	1,0000000000	ns
InvSimpson	PR2 - Silva	5,4139	0,0000000617	0,0000001850	****
Pielou	CIMPhy18 - PR2	-2,7035	0,0068610853	0,0205832559	*
Pielou	CIMPhy18 - Silva	1,8138	0,0697029414	0,2091088243	ns
Pielou	PR2 - Silva	4,5173	0,0000062619	0,0000187856	****
Richness	CIMPhy18 - PR2	-4,6803	0,0000028642	0,0000085926	****
Richness	CIMPhy18 - Silva	0,5622	0,5739860212	1,0000000000	ns
Richness	PR2 - Silva	5,2425	0,0000001584	0,0000004752	****
Shannon	CIMPhy18 - PR2	-4,6346	0,0000035764	0,0000107292	****
Shannon	CIMPhy18 - Silva	1,6552	0,0978815471	0,2936446413	ns
Shannon	PR2 - Silva	6,2898	0,0000000003	0,0000000010	****
Simpson	CIMPhy18 - PR2	-4,7449	0,0000020857	0,0000062570	****
Simpson	CIMPhy18 - Silva	0,6690	0,5035073260	1,0000000000	ns
Simpson	PR2 - Silva	5,4139	0,0000000617	0,0000001850	****

Prilog 8b. Rezultati višestruke usporedbe srednjih vrijednosti (Turkey test) sastava fitoplanktonske zajednice s obzirom na korištenu referentnu bazu (razina pouzdanosti, 95%)

Usporedba	Razlika u sredini	Donja granica (lwr)	Gornja granica (upr)	Prilagođena p-vrijednost
PR2 - CIMPhy18	0,02561319	-0,01747809	0,06870447	0,3344159
Silva - CIMPhy18	-0,02965230	-0,07274358	0,01343899	0,2326053
Silva - PR2	-0,05526548	-0,09835677	-0,01217420	0,0084435

***Prilog 9.** Popis korištenih kontrolnih uzoraka. Ukupno je sekvencirano 19 kontrolnih uzoraka, tri pozitivne kontrole te 16 negativnih kontrola*

Oznaka	Broj čitanja	Vrsta kontrolnog uzorka	
Mock3	80148	Zajednica kultura	Pozitivna kontrola
Mock4	99655	Zajednica kultura	Pozitivna kontrola
PC1	62988	Zajednica kultura	Pozitivna kontrola
NC1	2652	Filter sa sterilnom morskom vodom	Negativna kontrola
NC2	94	Izolacija DNA bez materijala	Negativna kontrola
BPCR11	870	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR12	333	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR13	235	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR16	309	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR3	840	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR4	675	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR5	412	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR5B	78	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR5	195	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR6	57	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR7	143	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR8	365	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR8	82	PCR kontrola	Negativna kontrola
BPCR9	65	PCR kontrola	Negativna kontrola

Prilog 10. Popis terenskih uzorkovanja s pripadajućim podacima

Datum	Uzorak	Terensko uzorkovanje	Broj čitanja	Postaja	Metoda uzorkovanja	Dubina uzorkovanja
15.1.2020	LTRV6	LTRV	71870	RV001	Niskin crpac	20m
15.1.2020	LTRV5	LTRV	84863	RV001	Niskin crpac	5m
15.1.2020	LTRV1	LTRV	55434	RV001	Mreža	vodeni stupac
15.1.2020	LTRV8	LTRV	75963	RV004	Niskin crpac	20m
15.1.2020	LTRV7	LTRV	75465	RV004	Niskin crpac	5m
15.1.2020	LTRV2	LTRV	72529	RV004	Mreža	vodeni stupac
13.2.2020	LTRV9	LTRV	47802	RV001	Mreža	vodeni stupac
13.2.2020	LTRV16	LTRV	69810	RV004	Niskin crpac	20m
13.2.2020	LTRV15	LTRV	64786	RV004	Niskin crpac	5m
13.2.2020	LTRV10	LTRV	70845	RV004	Mreža	vodeni stupac
11.3.2020	LTRV22	LTRV	51887	RV001	Niskin crpac	20m
11.3.2020	LTRV21	LTRV	55326	RV001	Niskin crpac	5m
11.3.2020	LTRV17	LTRV	57229	RV001	Mreža	vodeni stupac
11.3.2020	LTRV24	LTRV	50371	RV004	Niskin crpac	20m
11.3.2020	LTRV23	LTRV	64896	RV004	Niskin crpac	5m
11.3.2020	LTRV18	LTRV	54851	RV004	Mreža	vodeni stupac
14.5.2020	LTRV30	LTRV	60265	RV001	Niskin crpac	20m
14.5.2020	LTRV29	LTRV	66025	RV001	Niskin crpac	5m
14.5.2020	LTRV32	LTRV	61476	RV004	Niskin crpac	20m
14.5.2020	LTRV31	LTRV	77772	RV004	Niskin crpac	5m
14.5.2020	LTRV26	LTRV	46324	RV004	Mreža	vodeni stupac
12.6.2020	LTRV38	LTRV	75160	RV001	Niskin crpac	20m
12.6.2020	LTRV37	LTRV	75924	RV001	Niskin crpac	5m
12.6.2020	LTRV33	LTRV	56048	RV001	Mreža	vodeni stupac
12.6.2020	LTRV40	LTRV	42357	RV004	Niskin crpac	20m
12.6.2020	LTRV39	LTRV	79009	RV004	Niskin crpac	5m
12.6.2020	LTRV34	LTRV	55721	RV004	Mreža	vodeni stupac
15.7.2020	LTRV46	LTRV	55628	RV001	Niskin crpac	20m
15.7.2020	LTRV45	LTRV	65377	RV001	Niskin crpac	5m
15.7.2020	LTRV41	LTRV	33456	RV001	Mreža	vodeni stupac
15.7.2020	LTRV48	LTRV	52694	RV004	Niskin crpac	20m
15.7.2020	LTRV47	LTRV	51037	RV004	Niskin crpac	5m
15.7.2020	LTRV42	LTRV	59080	RV004	Mreža	vodeni stupac
19.8.2020	LTRV54	LTRV	42885	RV001	Niskin crpac	20m
19.8.2020	LTRV53	LTRV	50356	RV001	Niskin crpac	5m
19.8.2020	LTRV49	LTRV	57784	RV001	Mreža	vodeni stupac
19.8.2020	LTRV56	LTRV	60512	RV004	Niskin crpac	20m
19.8.2020	LTRV55	LTRV	58238	RV004	Niskin crpac	5m
19.8.2020	LTRV50	LTRV	83695	RV004	Mreža	vodeni stupac

Prilog 10. Popis terenskih uzorkovanja s pripadajućim podacima - nastavak

17.9.2020	LTRV62	LTRV	64246	RV001	Niskin crpac	20m
17.9.2020	LTRV61	LTRV	41158	RV001	Niskin crpac	5m
17.9.2020	LTRV57	LTRV	73981	RV001	Mreža	vodeni stupac
17.9.2020	LTRV64	LTRV	45987	RV004	Niskin crpac	20m
17.9.2020	LTRV63	LTRV	53489	RV004	Niskin crpac	5m
17.9.2020	LTRV58	LTRV	39168	RV004	Mreža	vodeni stupac
13.10.2020	LTRV70	LTRV	16642	RV001	Niskin crpac	20m
13.10.2020	LTRV69	LTRV	48815	RV001	Niskin crpac	5m
13.10.2020	LTRV65	LTRV	61344	RV001	Mreža	vodeni stupac
13.10.2020	LTRV72	LTRV	53504	RV004	Niskin crpac	20m
13.10.2020	LTRV71	LTRV	49875	RV004	Niskin crpac	5m
19.11.2020	LTRV78	LTRV	44886	RV001	Niskin crpac	20m
19.11.2020	LTRV77	LTRV	46963	RV001	Niskin crpac	5m
19.11.2020	LTRV73	LTRV	45811	RV001	Mreža	vodeni stupac
19.11.2020	LTRV73A	LTRV	22804	RV001	Mreža	vodeni stupac
19.11.2020	LTRV80	LTRV	58715	RV004	Niskin crpac	20m
19.11.2020	LTRV79	LTRV	59696	RV004	Niskin crpac	5m
19.11.2020	LTRV74	LTRV	51196	RV004	Mreža	vodeni stupac
11.12.2020	LTRV86	LTRV	50957	RV001	Niskin crpac	20m
11.12.2020	LTRV85	LTRV	51926	RV001	Niskin crpac	5m
11.12.2020	LTRV81	LTRV	36926	RV001	Mreža	vodeni stupac
11.12.2020	LTRV88	LTRV	50321	RV004	Niskin crpac	20m
11.12.2020	LTRV87	LTRV	51466	RV004	Niskin crpac	5m
11.12.2020	LTRV82	LTRV	39074	RV004	Mreža	vodeni stupac
15.1.2021	LTRV94	LTRV	58955	RV001	Niskin crpac	20m
15.1.2021	LTRV93	LTRV	41334	RV001	Niskin crpac	5m
15.1.2021	LTRV89	LTRV	63515	RV001	Mreža	vodeni stupac
15.1.2021	LTRV96	LTRV	56865	RV004	Niskin crpac	20m
15.1.2021	LTRV95	LTRV	50833	RV004	Niskin crpac	5m
15.1.2021	LTRV90	LTRV	27191	RV004	Mreža	vodeni stupac
22.2.2021	LTRV102	LTRV	64527	RV001	Niskin crpac	20m
22.2.2021	LTRV101	LTRV	48952	RV001	Niskin crpac	5m
22.2.2021	LTRV97	LTRV	38545	RV001	Mreža	vodeni stupac
22.2.2021	LTRV104	LTRV	48332	RV004	Niskin crpac	20m
22.2.2021	LTRV103	LTRV	48805	RV004	Niskin crpac	5m
22.2.2021	LTRV98	LTRV	31738	RV004	Mreža	vodeni stupac
18.3.2021	LTRV110	LTRV	42525	RV001	Niskin crpac	20m
18.3.2021	LTRV109	LTRV	45754	RV001	Niskin crpac	5m
18.3.2021	LTRV105	LTRV	44747	RV001	Mreža	vodeni stupac
18.3.2021	LTRV112	LTRV	49241	RV004	Niskin crpac	20m
18.3.2021	LTRV111	LTRV	67959	RV004	Niskin crpac	5m

Prilog 10. Popis terenskih uzorkovanja s pripadajućim podacima - nastavak

18.3.2021	LTRV106	LTRV	47953	RV004	Mreža	vodeni stupac
19.4.2021	LTRV118	LTRV	54787	RV001	Niskin crpac	20m
19.4.2021	LTRV117	LTRV	58315	RV001	Niskin crpac	5m
19.4.2021	LTRV113	LTRV	45572	RV001	Mreža	vodeni stupac
19.4.2021	LTRV120	LTRV	56281	RV004	Niskin crpac	20m
19.4.2021	LTRV119	LTRV	52424	RV004	Niskin crpac	5m
19.4.2021	LTRV114	LTRV	38324	RV004	Mreža	vodeni stupac
21.5.2021	LTRV126	LTRV	50722	RV001	Niskin crpac	20m
21.5.2021	LTRV125	LTRV	53627	RV001	Niskin crpac	5m
21.5.2021	LTRV121	LTRV	51958	RV001	Mreža	vodeni stupac
21.5.2021	LTRV128	LTRV	50976	RV004	Niskin crpac	20m
21.5.2021	LTRV127	LTRV	61926	RV004	Niskin crpac	5m
21.5.2021	LTRV122	LTRV	85201	RV004	Mreža	vodeni stupac
11.6.2021	LTRV134	LTRV	54203	RV001	Niskin crpac	20m
11.6.2021	LTRV133	LTRV	46231	RV001	Niskin crpac	5m
11.6.2021	LTRV129	LTRV	50440	RV001	Mreža	vodeni stupac
11.6.2021	LTRV136	LTRV	58650	RV004	Niskin crpac	20m
11.6.2021	LTRV135	LTRV	52510	RV004	Niskin crpac	5m
11.6.2021	LTRV130	LTRV	78463	RV004	Mreža	vodeni stupac
23.7.2021	LTRV142	LTRV	58203	RV001	Niskin crpac	20m
23.7.2021	LTRV141	LTRV	69931	RV001	Niskin crpac	5m
23.7.2021	LTRV137	LTRV	50714	RV001	Mreža	vodeni stupac
23.7.2021	LTRV144	LTRV	59069	RV004	Niskin crpac	20m
23.7.2021	LTRV143	LTRV	59306	RV004	Niskin crpac	5m
23.7.2021	LTRV138	LTRV	77546	RV004	Mreža	vodeni stupac
20.8.2021	LTRV150	LTRV	48573	RV001	Niskin crpac	20m
20.8.2021	LTRV149	LTRV	63230	RV001	Niskin crpac	5m
20.8.2021	LTRV145	LTRV	52330	RV001	Mreža	vodeni stupac
20.8.2021	LTRV152	LTRV	61028	RV004	Niskin crpac	20m
20.8.2021	LTRV151	LTRV	71949	RV004	Niskin crpac	5m
20.8.2021	LTRV146	LTRV	65306	RV004	Mreža	vodeni stupac
22.9.2021	LTRV158	LTRV	62696	RV001	Niskin crpac	20m
22.9.2021	LTRV157	LTRV	59190	RV001	Niskin crpac	5m
22.9.2021	LTRV153	LTRV	47744	RV001	Mreža	vodeni stupac
22.9.2021	LTRV160	LTRV	62484	RV004	Niskin crpac	20m
22.9.2021	LTRV159	LTRV	59852	RV004	Niskin crpac	5m
22.9.2021	LTRV154	LTRV	37868	RV004	Mreža	vodeni stupac
20.10.2021	LTRV166	LTRV	51685	RV001	Niskin crpac	20m
20.10.2021	LTRV165	LTRV	56781	RV001	Niskin crpac	5m
20.10.2021	LTRV161	LTRV	53940	RV001	Mreža	vodeni stupac
20.10.2021	LTRV168	LTRV	59612	RV004	Niskin crpac	20m

Prilog 10. Popis terenskih uzorkovanja s pripadajućim podacima - nastavak

20.10.2021	LTRV167	LTRV	62239	RV004	Niskin crpac	5m
20.10.2021	LTRV162	LTRV	44272	RV004	Mreža	vodeni stupac
24.11.2021	LTRV174	LTRV	58159	RV001	Niskin crpac	20m
24.11.2021	LTRV173	LTRV	60007	RV001	Niskin crpac	5m
24.11.2021	LTRV169	LTRV	64006	RV001	Mreža	vodeni stupac
24.11.2021	LTRV176	LTRV	65357	RV004	Niskin crpac	20m
24.11.2021	LTRV175	LTRV	64553	RV004	Niskin crpac	5m
24.11.2021	LTRV170	LTRV	61823	RV004	Mreža	vodeni stupac
15.12.2021	LTRV182	LTRV	56033	RV001	Niskin crpac	20m
15.12.2021	LTRV181	LTRV	49559	RV001	Niskin crpac	5m
15.12.2021	LTRV177	LTRV	55741	RV001	Mreža	vodeni stupac
15.12.2021	LTRV184	LTRV	53763	RV004	Niskin crpac	20m
15.12.2021	LTRV183	LTRV	59587	RV004	Niskin crpac	5m
15.12.2021	LTRV178	LTRV	60532	RV004	Mreža	vodeni stupac
14.1.2022	LTRV190	LTRV	78019	RV001	Niskin crpac	20m
14.1.2022	LTRV190A	LTRV	54079	RV001	Niskin crpac	20m
14.1.2022	LTRV189	LTRV	66609	RV001	Niskin crpac	5m
14.1.2022	LTRV189A	LTRV	69661	RV001	Niskin crpac	5m
14.1.2022	LTRV185	LTRV	62751	RV001	Mreža	vodeni stupac
14.1.2022	LTRV192	LTRV	183804	RV004	Niskin crpac	20m
14.1.2022	LTRV192A	LTRV	68958	RV004	Niskin crpac	20m
14.1.2022	LTRV191	LTRV	46263	RV004	Niskin crpac	5m
14.1.2022	LTRV191A	LTRV	71823	RV004	Niskin crpac	5m
14.1.2022	LTRV186	LTRV	48534	RV004	Mreža	vodeni stupac
16.2.2022	LTRV198	LTRV	54810	RV001	Niskin crpac	20m
16.2.2022	LTRV198A	LTRV	62340	RV001	Niskin crpac	20m
16.2.2022	LTRV197	LTRV	48099	RV001	Niskin crpac	5m
16.2.2022	LTRV197A	LTRV	32514	RV001	Niskin crpac	5m
16.2.2022	LTRV193	LTRV	80643	RV001	Mreža	vodeni stupac
16.2.2022	LTRV200	LTRV	52517	RV004	Niskin crpac	20m
16.2.2022	LTRV200A	LTRV	63305	RV004	Niskin crpac	20m
16.2.2022	LTRV199	LTRV	58780	RV004	Niskin crpac	5m
16.2.2022	LTRV199A	LTRV	49687	RV004	Niskin crpac	5m
16.2.2022	LTRV194	LTRV	66038	RV004	Mreža	vodeni stupac
15.3.2022	LTRV206	LTRV	81775	RV001	Niskin crpac	20m
15.3.2022	LTRV205	LTRV	53668	RV001	Niskin crpac	5m
15.3.2022	LTRV201	LTRV	74457	RV001	Mreža	vodeni stupac
15.3.2022	LTRV208	LTRV	70908	RV004	Niskin crpac	20m
15.3.2022	LTRV207	LTRV	60043	RV004	Niskin crpac	5m
15.3.2022	LTRV202	LTRV	67252	RV004	Mreža	vodeni stupac
13.4.2022	LTRV214	LTRV	79867	RV001	Niskin crpac	20m

Prilog 10. Popis terenskih uzorkovanja s pripadajućim podacima - nastavak

13.4.2022	LTRV213	LTRV	61938	RV001	Niskin crpac	5m
13.4.2022	LTRV209	LTRV	55655	RV001	Mreža	vodeni stupac
13.4.2022	LTRV216	LTRV	63992	RV004	Niskin crpac	20m
13.4.2022	LTRV215	LTRV	49945	RV004	Niskin crpac	5m
13.4.2022	LTRV210	LTRV	93717	RV004	Mreža	vodeni stupac
16.5.2022	LTRV222	LTRV	55346	RV001	Niskin crpac	20m
16.5.2022	LTRV221	LTRV	53592	RV001	Niskin crpac	5m
16.5.2022	LTRV217	LTRV	58005	RV001	Mreža	vodeni stupac
16.5.2022	LTRV224	LTRV	48758	RV004	Niskin crpac	20m
16.5.2022	LTRV223	LTRV	61254	RV004	Niskin crpac	5m
16.5.2022	LTRV218	LTRV	65623	RV004	Mreža	vodeni stupac
14.6.2022	LTRV230	LTRV	68840	RV001	Niskin crpac	20m
14.6.2022	LTRV229	LTRV	66490	RV001	Niskin crpac	5m
14.6.2022	LTRV225	LTRV	64950	RV001	Mreža	vodeni stupac
14.6.2022	LTRV232	LTRV	60979	RV004	Niskin crpac	20m
14.6.2022	LTRV231	LTRV	70734	RV004	Niskin crpac	5m
14.6.2022	LTRV226	LTRV	59877	RV004	Mreža	vodeni stupac
14.7.2022	LTRV238	LTRV	54403	RV001	Niskin crpac	20m
14.7.2022	LTRV237	LTRV	56787	RV001	Niskin crpac	5m
14.7.2022	LTRV233	LTRV	38646	RV001	Mreža	vodeni stupac
14.7.2022	LTRV240	LTRV	57093	RV004	Niskin crpac	20m
14.7.2022	LTRV239	LTRV	67197	RV004	Niskin crpac	5m
14.7.2022	LTRV234	LTRV	56161	RV004	Mreža	vodeni stupac
22.8.2022	LTRV246	LTRV	57328	RV001	Niskin crpac	20m
22.8.2022	LTRV245	LTRV	60733	RV001	Niskin crpac	5m
22.8.2022	LTRV241	LTRV	37853	RV001	Mreža	vodeni stupac
22.8.2022	LTRV248	LTRV	56392	RV004	Niskin crpac	20m
22.8.2022	LTRV247	LTRV	57535	RV004	Niskin crpac	5m
22.8.2022	LTRV242	LTRV	5176	RV004	Mreža	vodeni stupac
13.9.2022	LTRV254	LTRV	61436	RV001	Niskin crpac	20m
13.9.2022	LTRV253	LTRV	77030	RV001	Niskin crpac	5m
13.9.2022	LTRV249	LTRV	43497	RV001	Mreža	vodeni stupac
13.9.2022	LTRV256	LTRV	47441	RV004	Niskin crpac	20m
13.9.2022	LTRV255	LTRV	48741	RV004	Niskin crpac	5m
13.9.2022	LTRV250	LTRV	42341	RV004	Mreža	vodeni stupac
12.10.2022	LTRV262	LTRV	54302	RV001	Niskin crpac	20m
12.10.2022	LTRV261	LTRV	55821	RV001	Niskin crpac	5m
12.10.2022	LTRV257	LTRV	44865	RV001	Mreža	vodeni stupac
12.10.2022	LTRV264	LTRV	50573	RV004	Niskin crpac	20m
12.10.2022	LTRV263	LTRV	46832	RV004	Niskin crpac	5m
12.10.2022	LTRV258	LTRV	58773	RV004	Mreža	vodeni stupac

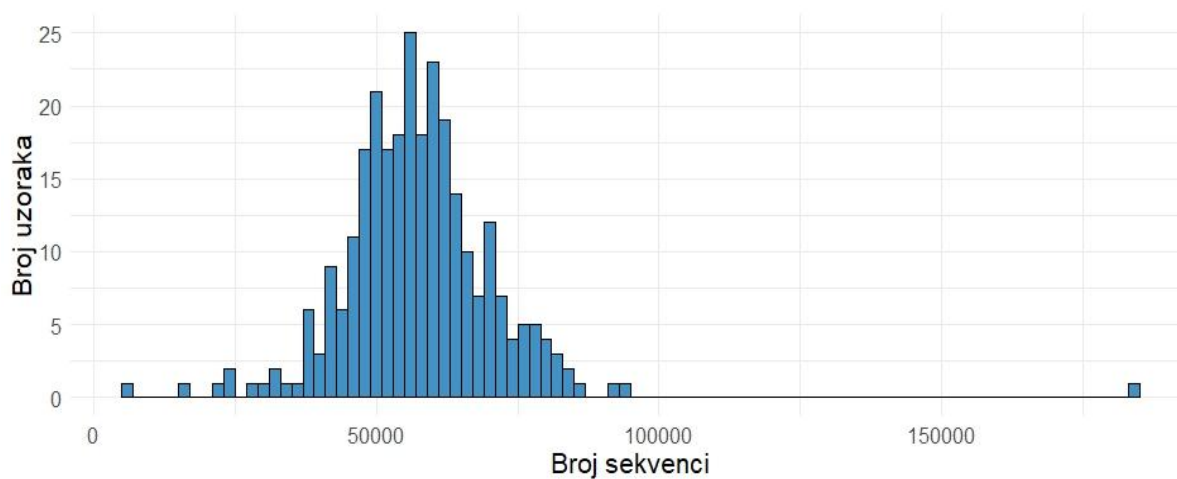
Prilog 10. Popis terenskih uzorkovanja s pripadajućim podacima - nastavak

15.11.2022	LTRV270	LTRV	69186	RV001	Niskin crpac	20m
15.11.2022	LTRV269	LTRV	58077	RV001	Niskin crpac	5m
15.11.2022	LTRV265	LTRV	71356	RV001	Mreža	vodeni stupac
15.11.2022	LTRV272	LTRV	55383	RV004	Niskin crpac	20m
15.11.2022	LTRV271	LTRV	54086	RV004	Niskin crpac	5m
15.11.2022	LTRV266	LTRV	24238	RV004	Mreža	vodeni stupac
15.12.2022	LTRV278	LTRV	73643	RV001	Niskin crpac	20m
15.12.2022	LTRV277	LTRV	56245	RV001	Niskin crpac	5m
15.12.2022	LTRV280	LTRV	55487	RV004	Niskin crpac	20m
15.12.2022	LTRV279	LTRV	47743	RV004	Niskin crpac	5m
20.12.2022	LTRV273	LTRV	58370	RV001	Mreža	vodeni stupac
20.12.2022	LTRV274	LTRV	44463	RV004	Mreža	vodeni stupac
20.7.2020	PO7	PO	24003	SJ108	Mreža	vodeni stupac
4.9.2020	PO13	PO	47860	RV001	Mreža	vodeni stupac
4.9.2020	PO17	PO	51029	SJ101	Mreža	vodeni stupac
4.9.2020	PO15	PO	45418	SJ107	Mreža	vodeni stupac
12.10.2020	PO33	PO	79492	SJ108	Mreža	vodeni stupac
3.3.2021	PO59	PO	49042	SJ107	Mreža	vodeni stupac
20.4.2021	PO77	PO	50210	RV001	Mreža	vodeni stupac
20.4.2021	PO81	PO	69291	SJ101	Mreža	vodeni stupac
20.4.2021	PO79	PO	47255	SJ107	Mreža	vodeni stupac
20.4.2021	PO86	PO	60279	SJ108	Niskin crpac	20m
20.4.2021	PO85	PO	65422	SJ108	Niskin crpac	5m
20.4.2021	PO83	PO	70363	SJ108	Mreža	vodeni stupac
15.6.2021	PO108	PO	64172	SJ108	Niskin crpac	20m
15.6.2021	PO107	PO	56548	SJ108	Niskin crpac	5m
15.6.2021	PO105	PO	76364	SJ108	Mreža	vodeni stupac
21.7.2021	PO113	PO	74593	SJ101	Mreža	vodeni stupac
21.7.2021	PO111	PO	42263	SJ107	Mreža	vodeni stupac
21.7.2021	PO118	PO	61525	SJ108	Niskin crpac	20m
21.7.2021	PO117	PO	59997	SJ108	Niskin crpac	5m
21.7.2021	PO115	PO	64687	SJ108	Mreža	vodeni stupac
13.9.2021	PO140	PO	62079	SJ108	Niskin crpac	20m
13.9.2021	PO139	PO	61672	SJ108	Niskin crpac	5m
5.4.2022	PO153	PO	51194	RV001	Mreža	vodeni stupac
5.4.2022	PO155	PO	52669	SJ107	Mreža	vodeni stupac
5.4.2022	PO162	PO	67349	SJ108	Niskin crpac	20m
5.4.2022	PO161	PO	56964	SJ108	Niskin crpac	5m
27.4.2022	PO163	PO	62771	RV001	Mreža	vodeni stupac
27.4.2022	PO167	PO	67906	SJ101	Mreža	vodeni stupac
27.4.2022	PO165	PO	52399	SJ107	Mreža	vodeni stupac

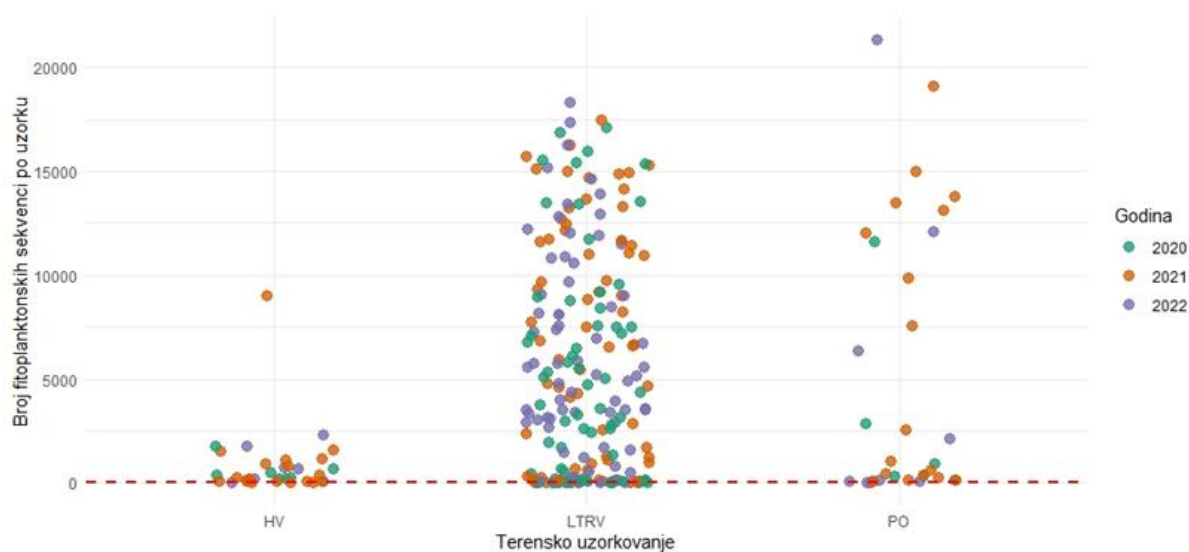
Prilog 10. Popis terenskih uzorkovanja s pripadajućim podacima - nastavak

27.4.2022	PO172	PO	70035	SJ108	Niskin crpac	20m
27.4.2022	PO171	PO	64055	SJ108	Niskin crpac	5m
27.4.2022	PO169	PO	62010	SJ108	Mreža	vodeni stupac
2.9.2020	PO9	RC	54908	ZI012	Mreža	vodeni stupac
2.9.2020	PO11	RC	52947	ZI052	Mreža	vodeni stupac
8.9.2020	PO23	RC	37310	FPA34	Mreža	vodeni stupac
8.9.2020	PO25	RC	56426	JPA23	Mreža	vodeni stupac
8.9.2020	PO21	RC	65733	RI019	Mreža	vodeni stupac
30.10.2020	PO37	RC	72410	ZI052	Mreža	vodeni stupac
2.11.2020	PO39	RC	54031	RI019	Mreža	vodeni stupac
18.1.2021	PO45	RC	59477	ZI012	Mreža	vodeni stupac
26.1.2021	PO49	RC	55804	CR001	Mreža	vodeni stupac
26.1.2021	PO51	RC	60107	RI019	Mreža	vodeni stupac
2.2.2021	PO53	RC	57500	JPA23	Mreža	vodeni stupac
15.2.2021	PO55	RC	50915	FPA34	Mreža	vodeni stupac
30.3.2021	PO71	RC	55372	RI019	Mreža	vodeni stupac
31.3.2021	PO69	RC	49997	CR001	Mreža	vodeni stupac
31.3.2021	PO75	RC	60698	FPA34	Mreža	vodeni stupac
1.6.2021	PO93	RC	62025	RI019	Mreža	vodeni stupac
2.6.2021	PO91	RC	53906	CR001	Mreža	vodeni stupac
2.6.2021	PO97	RC	55249	FPA34	Mreža	vodeni stupac
3.6.2021	PO95	RC	47610	JPA23	Mreža	vodeni stupac
3.6.2021	PO89	RC	60574	ZI052	Mreža	vodeni stupac
4.6.2021	PO87	RC	81203	ZI012	Mreža	vodeni stupac
8.7.2021	PO93a	RC	46411	RI019	Mreža	vodeni stupac
2.9.2021	PO125	RC	42150	RI019	Mreža	vodeni stupac
7.9.2021	PO123	RC	39276	CR001	Mreža	vodeni stupac
7.9.2021	PO129	RC	29774	FPA34	Mreža	vodeni stupac
7.9.2021	PO127	RC	81675	JPA23	Mreža	vodeni stupac
23.2.2022	PO141	RC	70709	ZI012	Mreža	vodeni stupac
23.2.2022	PO143	RC	60491	ZI052	Mreža	vodeni stupac
23.3.2022	PO145	RC	50657	CR001	Mreža	vodeni stupac
23.3.2022	PO151	RC	91098	FPA34	Mreža	vodeni stupac
23.3.2022	PO149	RC	70810	JPA23	Mreža	vodeni stupac
23.3.2022	PO147	RC	72021	RI019	Mreža	vodeni stupac
26.10.2022	PO197	RC	42108	ZI052	Mreža	vodeni stupac
27.10.2022	PO195	RC	49038	ZI012	Mreža	vodeni stupac

Prilog 11. Broj sirovih sekvencipo uzorku nakon sekvenciranja i sparivanja komplementarnih sekvenci



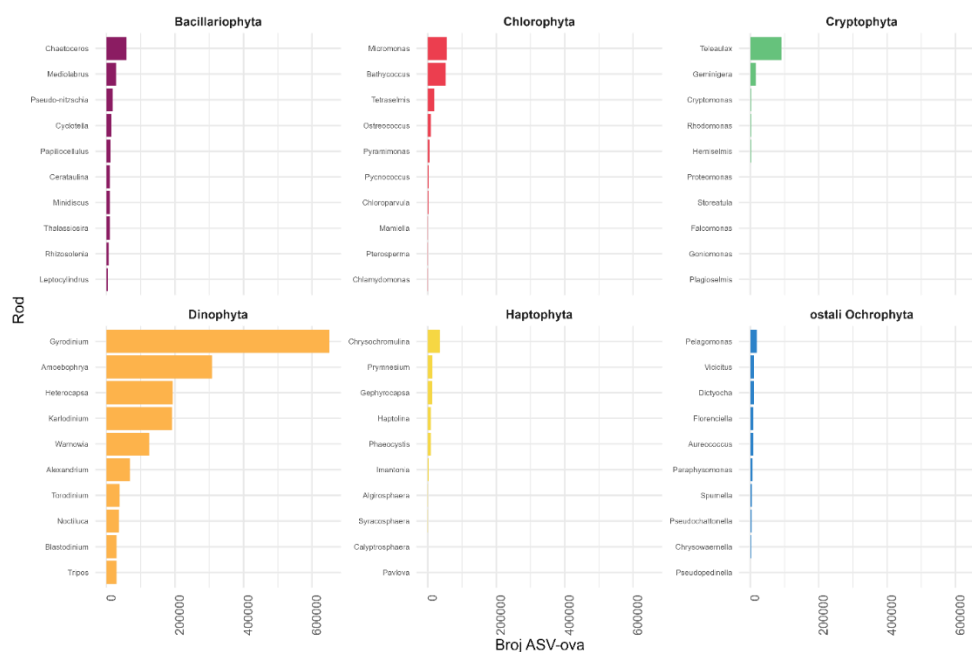
Prilog 12. Broj klasificiranih fitoplanktonskih sekvenci po uzorku. Uzorci su grupirani na temelju terena s kojeg su prikupljeni, dok različite boje prikazuju godine uzorkovanja (zelena - 2020, narančasta – 2021 i ljubičasta – 2022). Crvena isprekidana linija prikazuje prag – svi uzorci s manje od 20 fitoplanktonskih sekvenci uklonjeni su iz daljnje analize.



Prilog 13. Popis uzoraka s manje od 20 taksonomski određenih fitoplanktonskih sekvenci. Ukupno 13 uzoraka uklonjeno je iz analize zbog nedostatne kvalitete

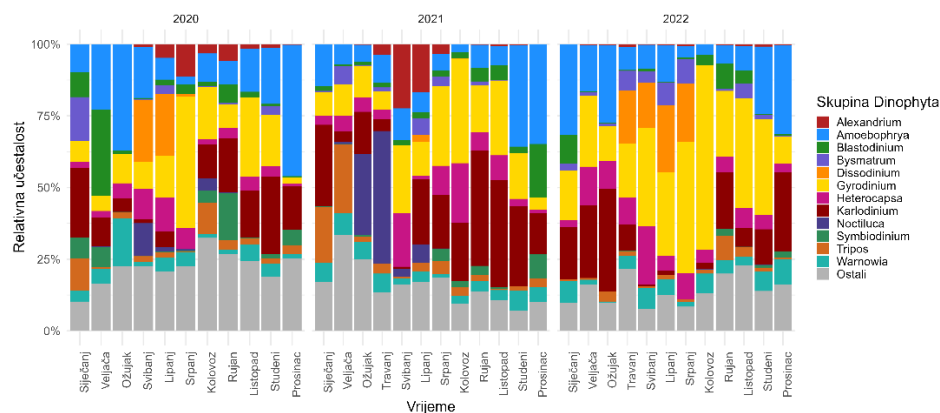
Naziv uzorka	Broj fitoplanktonskih čitanja
LTRV121	1
LTRV201	3
LTRV193	4
PO75	6
LTRV17	6
LTRV9	6
LTRV194	9
LTRV202	9
LTRV122	11
LTRV18	11
PO165	13
LTRV186	14
LTRV218	15

Prilog 14. Stupičasti dijagram broja ASV-ova taksonomski klasificiranih u 10 najčešćih rodova za pojedinu skupinu

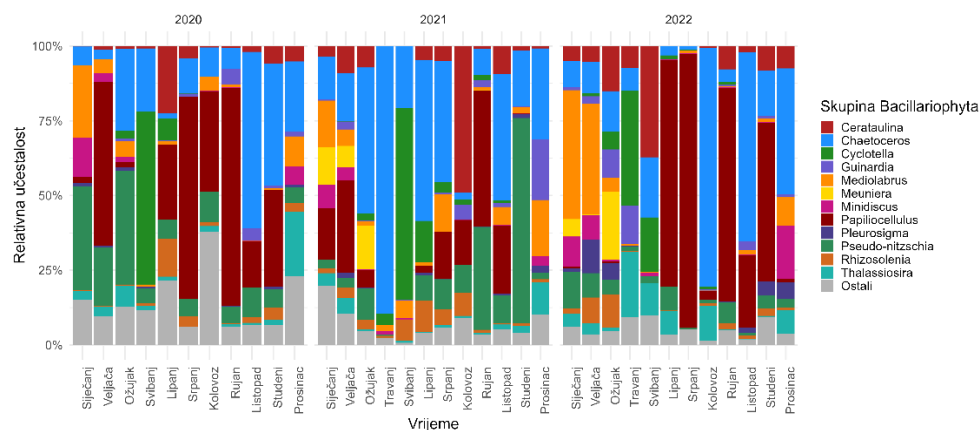


Prilog 2. Dijagram relativne učestalosti rodova pojedine fitoplanktonske skupine na postajama LTRV, kombiniranim uzorkovanjem fitoplanktonskom mrežom i crpcem, mjesečno u razdoblju od tri godine. Prikazano je 12 najučestalijih rodova, dok su preostali zastupljeni u manjim udjelima grupirani u "Ostali" (sivo).

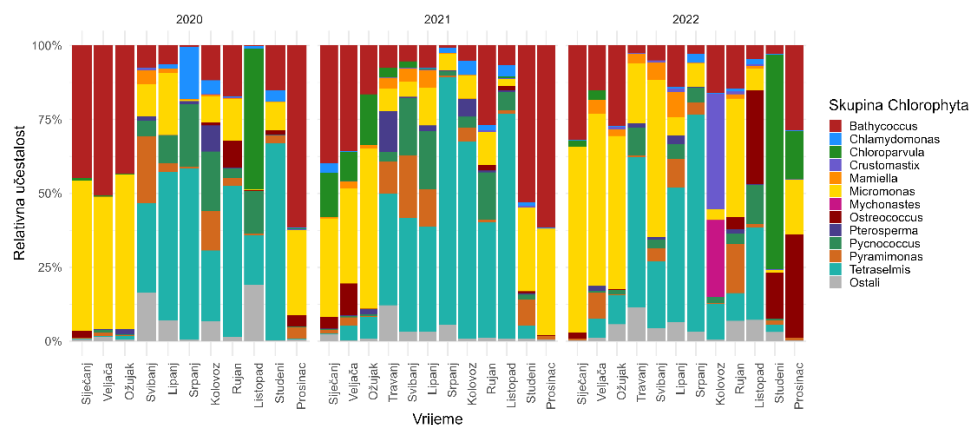
a) Sastav i relativna učestalost skupine Dinophyta



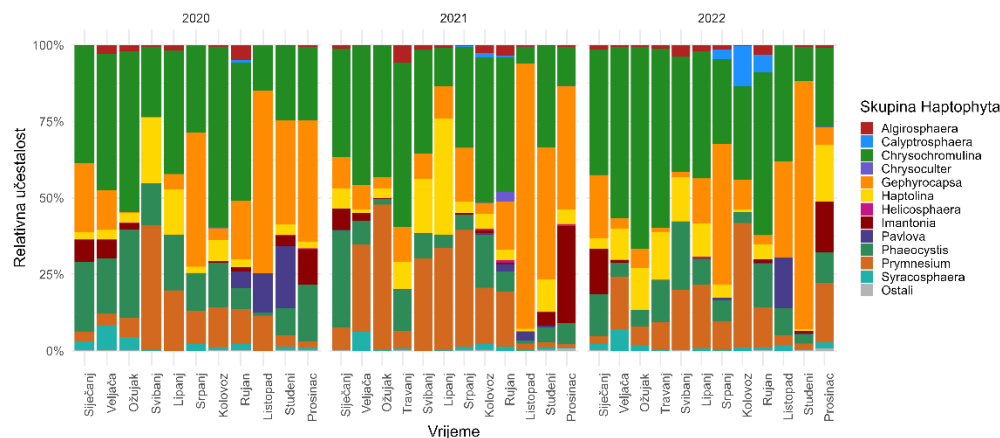
b) Sastav i relativna učestalost skupine Bacillariophyta



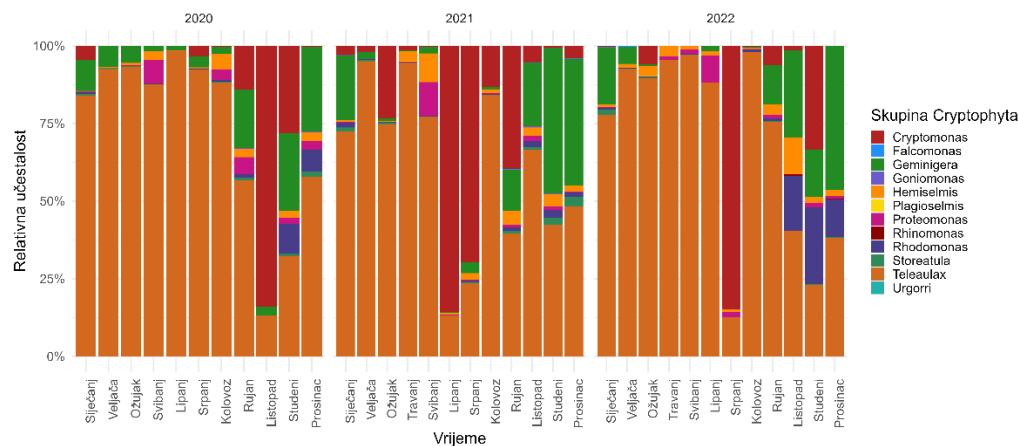
c) Sastav i relativna učestalost skupine Chlorophyta



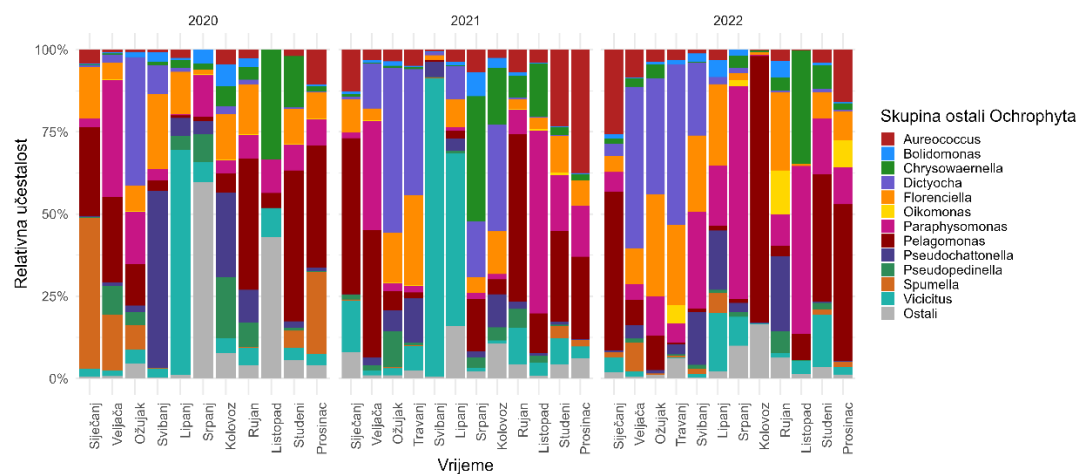
d) Sastav i relativna učestalost skupine Haptophyta



e) Sastav i relativna učestalost skupine Cryptophyta



f) Sastav i relativna učestalost skupine ostalih Ochrophyta



Prilog 16. Popis fitoplanktonskih rodova koji se pojavljuju u >20% istraživanih uzoraka

Skupina	Red	Rod	Broj uzoraka	Postotak uzoraka
Bacillariophyta	Chaetocerotales	<i>Chaetoceros</i>	211	78,73
Bacillariophyta	Bacillariales	<i>Pseudo-nitzschia</i>	180	67,16
Bacillariophyta	Hemiaulales	<i>Cerataulina</i>	156	58,21
Bacillariophyta	Rhizosoleniales	<i>Rhizosolenia</i>	152	56,72
Bacillariophyta	Thalassiosirales	<i>Thalassiosira</i>	151	56,34
Bacillariophyta	Cymatosirales	<i>Papiliocellulus</i>	150	55,97
Bacillariophyta	Melosirales	<i>Stephanopyxis</i>	145	54,10
Bacillariophyta	Stephanodiscales	<i>Cyclotella</i>	130	48,51
Bacillariophyta	Thalassiosirales	<i>Mediolabrus</i>	130	48,51
Bacillariophyta	Rhizosoleniales	<i>Guinardia</i>	123	45,90
Bacillariophyta	Thalassiosirales	<i>Minidiscus</i>	111	41,42
Bacillariophyta	Chaetocerotales	<i>Leptocylindrus</i>	110	41,04
Bacillariophyta	Naviculales	<i>Pleurosigma</i>	104	38,81
Bacillariophyta	Naviculales	<i>Navicula</i>	90	33,58
Bacillariophyta	Bacillariales	<i>Nitzschia</i>	89	33,21
Bacillariophyta	Chaetocerotales	<i>Bacteriastrium</i>	81	30,22
Bacillariophyta	Thalassionemales	<i>Thalassionema</i>	72	26,87
Bacillariophyta	Bacillariales	<i>Cylindrotheca</i>	68	25,37
Bacillariophyta	Asterolamprales	<i>Asteromphalus</i>	58	21,64
Chlorophyta	Chlorodendrales	<i>Tetraselmis</i>	172	64,18
Chlorophyta	Pseudoscurfieldiales	<i>Pycnococcus</i>	142	52,99
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Bathycoccus</i>	134	50,00
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Micromonas</i>	133	49,63
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pyramimonas</i>	133	49,63
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Chlamydomonas</i>	97	36,19
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pterosperma</i>	96	35,82
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Mamiella</i>	90	33,58
Chlorophyta	Chloropicales	<i>Chloroparvula</i>	72	26,87
Chlorophyta	Dolichomastigales	<i>Crustomastix</i>	70	26,12
Chlorophyta	Nephroselmidales	<i>Nephroselmis</i>	63	23,51
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Ostreococcus</i>	58	21,64
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Teleaulax</i>	160	59,70
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Hemiselms</i>	120	44,78
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Geminigera</i>	102	38,06
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Proteomonas</i>	98	36,57
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Rhodomonas</i>	84	31,34
Cryptophyta	Cryptomonadales	<i>Cryptomonas</i>	68	25,37
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Storeatula</i>	62	23,13
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Karlodinium</i>	249	92,91

Prilog 16. Popis fitoplanktonskih rodova koji se pojavljuju u >20% istraživanih uzoraka - nastavak

Dinophyta	Syndiniales	<i>Amoebophrya</i>	244	91,04
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Tripos</i>	221	82,46
Dinophyta	Syndiniales	<i>Euduboscquella</i>	200	74,63
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	197	73,51
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Gyrodinium</i>	191	71,27
Dinophyta	Peridinales	<i>Heterocapsa</i>	189	70,52
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Warnowia</i>	185	69,03
Dinophyta	Peridinales	<i>Bysmatrum</i>	173	64,55
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Azadinium</i>	167	62,31
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Lepidodinium</i>	162	60,45
Dinophyta	Tovelliales	<i>Katodinium</i>	157	58,58
Dinophyta	Thoracosphaerales	<i>Scrippsiella</i>	157	58,58
Dinophyta	Suessiales	<i>Biecheleria</i>	156	58,21
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Gymnodinium</i>	156	58,21
Dinophyta	Suessiales	<i>Biecheleriopsis</i>	150	55,97
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	147	54,85
Dinophyta	Suessiales	<i>Pelagodinium</i>	144	53,73
Dinophyta	Torodinales	<i>Torodinium</i>	143	53,36
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Ceratoperidinium</i>	139	51,87
Dinophyta	Suessiales	<i>Symbiodinium</i>	139	51,87
Dinophyta	Syndiniales	<i>Hematodinium</i>	137	51,12
Dinophyta	Prorocentrales	<i>Prorocentrum</i>	136	50,75
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Paragymnodinium</i>	133	49,63
Dinophyta	Peridinales	<i>Protopteridinium</i>	126	47,01
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Takayama</i>	120	44,78
Dinophyta	Dinophysiales	<i>Dinophysis</i>	109	40,67
Dinophyta	Noctilucales	<i>Kofoidinium</i>	108	40,30
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Erythroptidinium</i>	107	39,93
Dinophyta	Dinophysiales	<i>Phalacroma</i>	97	36,19
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Karenia</i>	88	32,84
Dinophyta	Suessiales	<i>Protodinium</i>	88	32,84
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Amphidoma</i>	86	32,09
Dinophyta	Noctilucales	<i>Noctiluca</i>	84	31,34
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Balechina</i>	82	30,60
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Chytriodinium</i>	81	30,22
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Fragilidium</i>	76	28,36
Dinophyta	Peridinales	<i>Lessardia</i>	76	28,36
Dinophyta	Suessiales	<i>Ansanella</i>	66	24,63
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Gonyaulax</i>	64	23,88
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Spiniferites</i>	57	21,27
Dinophyta	Akashiwales	<i>Akashiwo</i>	56	20,90

Prilog 16. *Popis fitoplanktonskih rodova koji se pojavljuju u >20% istraživanih uzoraka - nastavak*

Dinophyta	Peridinales	<i>Lissodinium</i>	54	20,15
Dinophyta	Dinophysiales	<i>Sinophysis</i>	54	20,15
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Chrysochromulina</i>	162	60,45
Haptophyta	Isochrysidales	<i>Gephyrocapsa</i>	161	60,07
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Prymnesium</i>	158	58,96
Haptophyta	Phaeocystales	<i>Phaeocystis</i>	139	51,87
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Haptolina</i>	129	48,13
Haptophyta	Syracosphaerales	<i>Algirosphaera</i>	103	38,43
Haptophyta	Syracosphaerales	<i>Syracosphaera</i>	98	36,57
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Imantonia</i>	85	31,72
ostali Ochrophyta	Paraphysomonadales	<i>Paraphysomonas</i>	135	50,37
ostali Ochrophyta	Florenciellales	<i>Florenciella</i>	131	48,88
ostali Ochrophyta	Dictyochales	<i>Vicicitus</i>	123	45,90
ostali Ochrophyta	Pelagomonadales	<i>Pelagomonas</i>	119	44,40
ostali Ochrophyta	Pelagomonadales	<i>Aureococcus</i>	118	44,03
ostali Ochrophyta	Florenciellales	<i>Pseudochattonella</i>	118	44,03
ostali Ochrophyta	Dictyochales	<i>Dictyocha</i>	110	41,04
ostali Ochrophyta	Parmales	<i>Bolidomonas</i>	100	37,31
ostali Ochrophyta	Chrysomeridales	<i>Chrysowaernella</i>	97	36,19
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Pseudopedinella</i>	94	35,07
ostali Ochrophyta	Parmales	<i>Triparma</i>	80	29,85
ostali Ochrophyta	Ochromonadales	<i>Spumella</i>	67	25,00

Prilog 17. Statistička analiza načina uzorkovanja Kruskal-Wallis na temelju broja generiranih sirovih sekvenci po uzorku, 5m i 20m predstavljaju uzorkovanja Niskin crpcima, a vodeni stupac predstavlja uzorkovanje fitoplanktonskom mrežom (ns – nije statistički značajno, $p > 0,05$; * - statistički značajno, $p > 0,01$).

	Kruskal-Wallis	χ^2	Stupnjevi slobode	p- vrijednost
a	Broj sirovih sekvenci	18.986	2	0.387
b	Broj fitoplanktonskih sekvenci	124.19	2	2,2E-16
c	Broj fitoplanktonskih sekvenci	124,19	2	1,08E-27
d	Broj rodova	128,86	2	1,04E-28
e	Broj rodova	383	5	1,66E-80

a) Dunnov post hoc test usporedbe broja sirovih sekvenci s obzirom na način uzorkovanja

Usporedba	Z-vrijednost	p- vrijednost	Prilagođena p- vrijednost	Značajnost
20m - 5m		0,6665434	1	ns
20m - vodeni stupac		0,3609051	1	ns
5m - vodeni stupac		0,1771852	0,5315555	ns

b) Dunnov post hoc test usporedbe broja generiranih fitoplanktonskih sekvenci s obzirom na način uzorkovanja

Usporedba	Z-vrijednost	p- vrijednost	Prilagođena p- vrijednost	Značajnost
5m - 20m	0,3627976	0,716756	1	ns
5m - vodeni stupac	-9,4244998	4,32E-21	1,3E-20	****
20m - vodeni stupac	-9,7915573	1,22E-22	3,67E-22	****

c) *Dunnov post hoc test usporedbe broja generiranih fitoplanktonskih sekvenci s obzirom na način uzorkovanja, po postajama*

	Usporedba	Z-vrijednost	p- vrijednost	Prilagođena p- vrijednost	Značajnost
RV001	5m - 20m	0,8301919	0,40643	1	ns
RV001	5m - vodeni stupac	-6,3112358	2,77E-10	8,3E-10	****
RV001	20m - vodeni stupac	-7,1677896	7,62E-13	2,29E-12	****
RV004	5m - 20m	0,3122643	0,75484	1	ns
RV004	5m - vodeni stupac	-6,0809367	1,19E-09	3,58E-09	****
RV004	20m - vodeni stupac	-6,393201	1,62E-10	4,87E-10	****
SJ108	5m - 20m	-1,436265	0,150927	0,452781	ns
SJ108	5m - vodeni stupac	-3,1715001	0,001517	0,00455	**
SJ108	20m - vodeni stupac	-1,8173764	0,069159	0,207478	ns

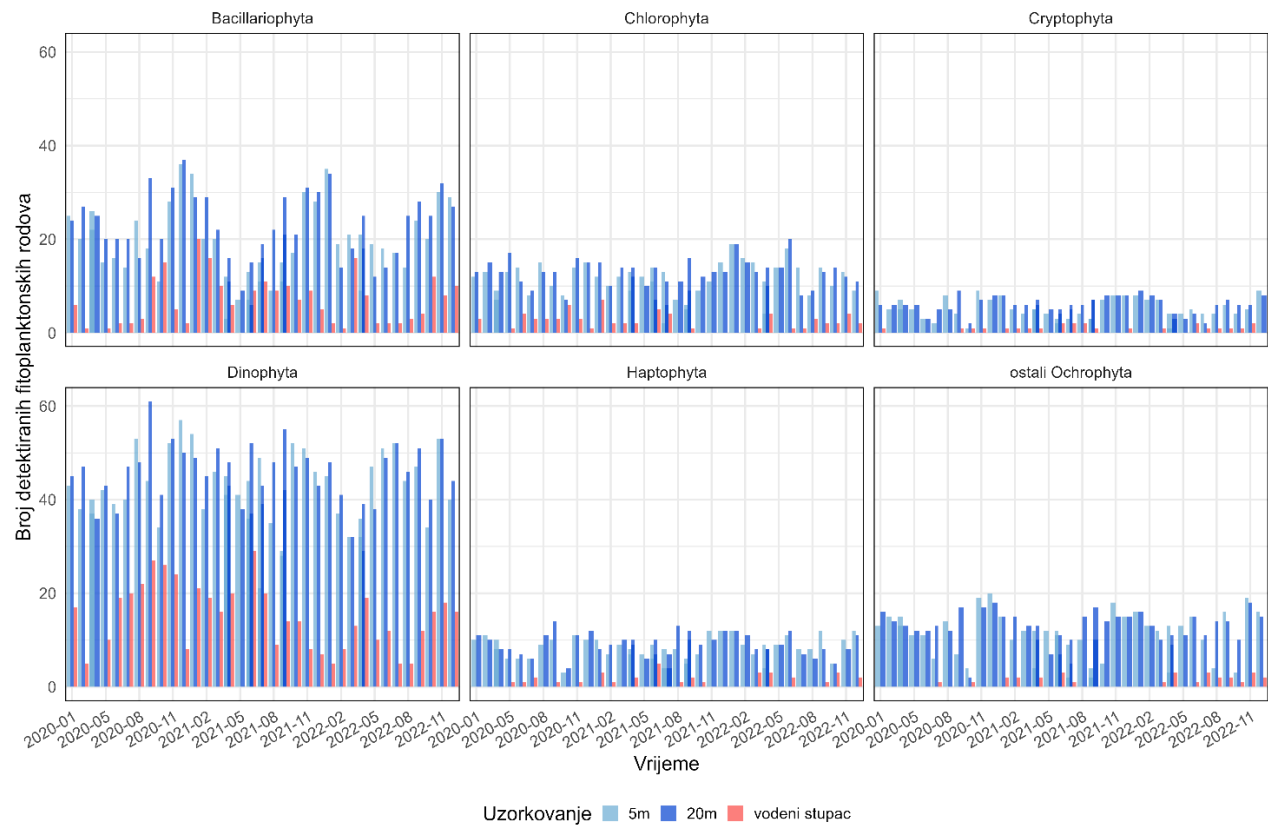
d) *Dunnov post hoc test usporedbe broja detektiranih fitoplanktonskih rodova s obzirom na način uzorkovanja, po postajama*

	Usporedba	Z-vrijednost	p- vrijednost	Prilagođena p- vrijednost	Značajnost
RV001	5m - 20m	1,37734298	0,168406	0,505219	ns
RV001	5m - vodeni stupac	-6,0588242	1,37E-09	4,11E-09	****
RV001	20m - vodeni stupac	-7,4799032	7,44E-14	2,23E-13	****
RV004	5m - 20m	0,04931338	0,96067	1	ns
RV004	5m - vodeni stupac	-6,41895837	1,37E-10	4,12E-10	****
RV004	20m - vodeni stupac	-6,46827175	9,91E-11	2,97E-10	****
SJ108	5m - 20m	0,90811321	0,363818	1	ns
SJ108	5m - vodeni stupac	-2,06909525	0,038537	0,115611	ns
SJ108	20m - vodeni stupac	-2,9252726	0,003442	0,010325	*

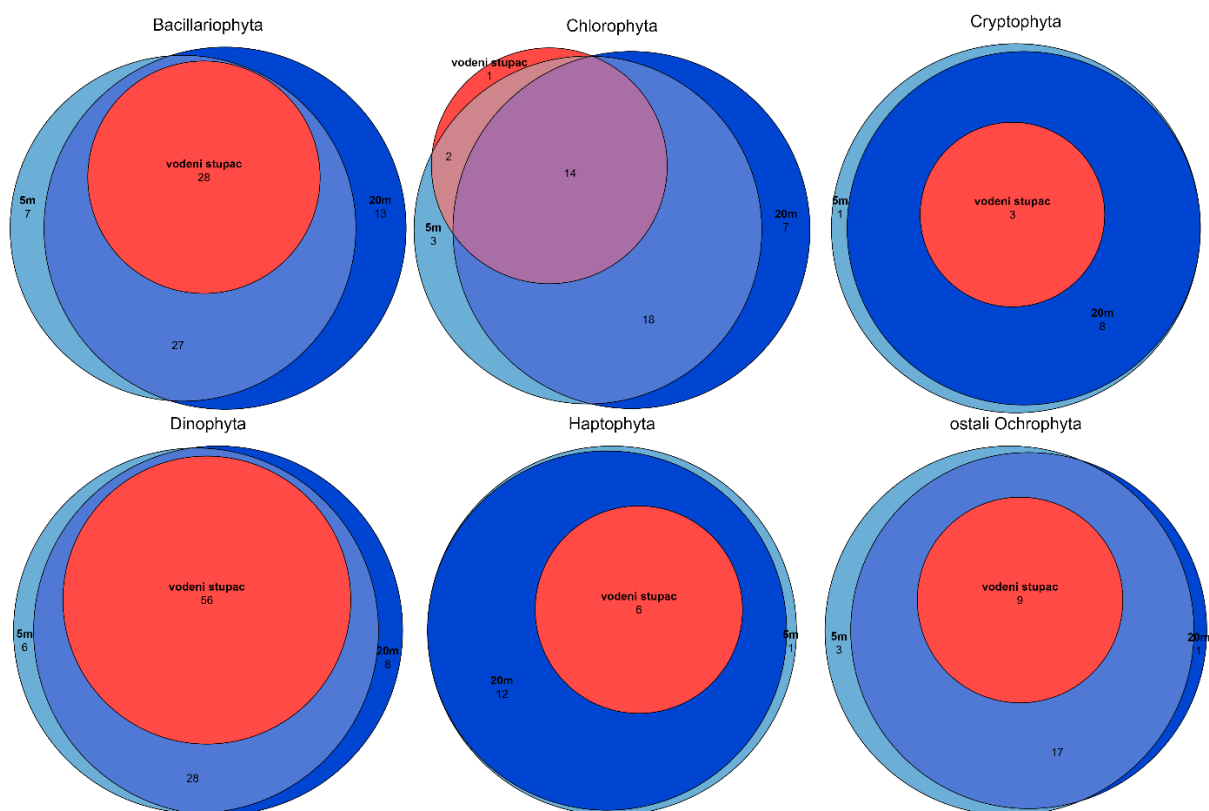
e) *Dunnov post hoc test usporedbe broja detektiranih fitoplanktonskih rodova s obzirom na način uzorkovanja, po fitoplanktonskim skupinama*

Skupina	Usporedba	Z-vrijednost	p- vrijednost	Prilagođena p- vrijednost	Značajnost
Bacillariophyta	5m - 20m	1,4492023	0,147281	0,441843	ns
Bacillariophyta	5m - vodeni stupac	-9,6686232	4,1E-22	1,23E-21	****
Bacillariophyta	20m - vodeni stupac	-11,2071491	3,76E-29	1,13E-28	****
Chlorophyta	5m - 20m	1,1247183	0,260708	0,782125	ns
Chlorophyta	5m - vodeni stupac	-8,9511228	3,52E-19	1,06E-18	****
Chlorophyta	20m - vodeni stupac	-9,9590049	2,3E-23	6,91E-23	****
Cryptophyta	5m - 20m	1,8071270	0,070742	0,212227	ns
Cryptophyta	5m - vodeni stupac	-6,7184089	1,84E-11	5,51E-11	****
Cryptophyta	20m - vodeni stupac	-8,1811895	2,81E-16	8,43E-16	****
Dinophyta	5m - 20m	0,9191004	0,358043	1	ns
Dinophyta	5m - vodeni stupac	-11,20610852	3,81E-29	1,14E-28	****
Dinophyta	20m - vodeni stupac	-12,19582837	3,27E-34	9,81E-34	****
Haptophyta	5m - 20m	0,780271221	0,435231	1	ns
Haptophyta	5m - vodeni stupac	-7,464905998	8,34E-14	2,5E-13	****
Haptophyta	20m - vodeni stupac	-8,043811884	8,71E-16	2,61E-15	****
ostali	5m - 20m	0,908532867	0,363597	1	ns
Ochrophyta	5m - vodeni stupac	-6,843504216	7,73E-12	2,32E-11	****
ostali	20m - vodeni stupac	-7,512036583	5,82E-14	1,75E-13	****
Ochrophyta					

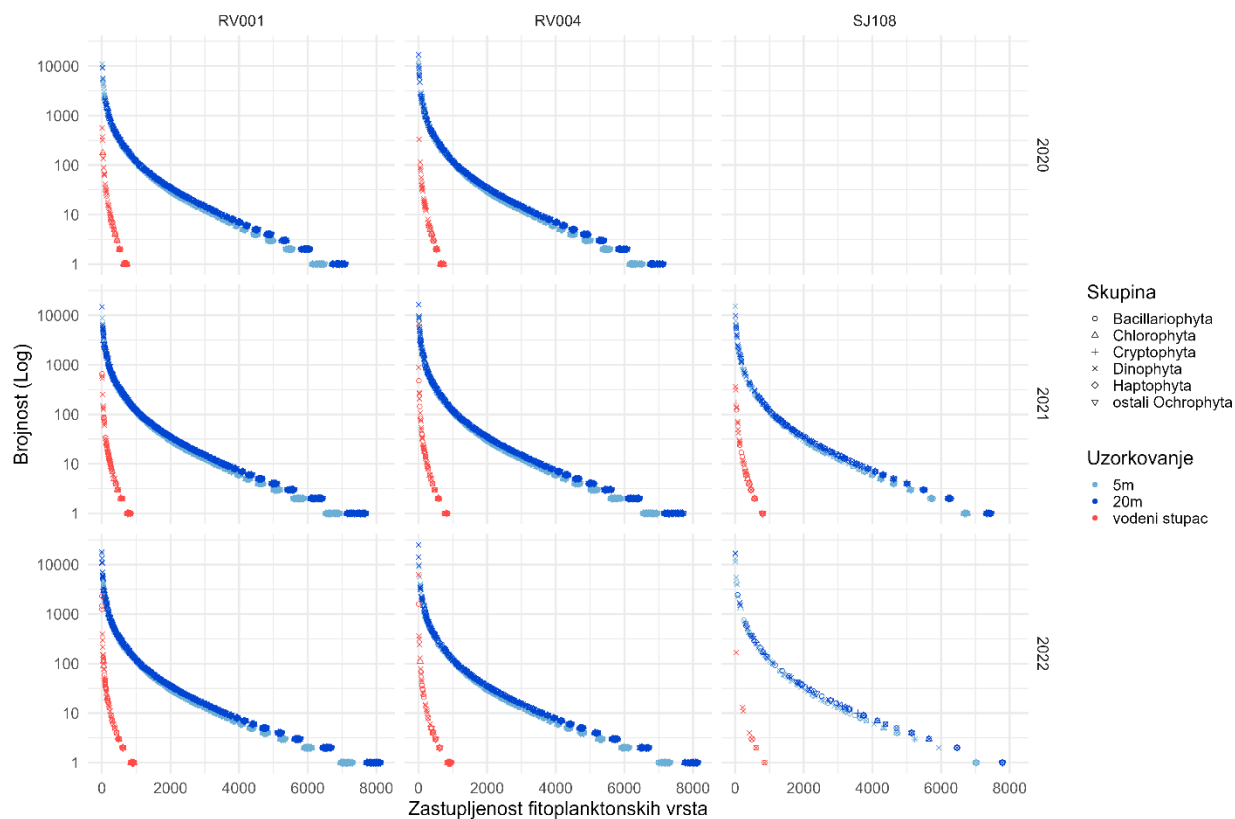
Prilog 18. Vremenska varijabilnost broja rodova među metodama uzorkovanja. Dijagrami prikazuju broj detektoranih fitoplanktonskih rodova prema metodi uzorkovanja (5 m i 20 m predstavljaju dubine uzorkovane Niskin crpcem, a vodeni stupac predstavlja ukupni vodeni stupac uzorkovan fitoplanktonskom mrežom). Na svim postajama vidljiva je značajna razlika u broju detektiranih rodova između uzorkovanja fitoplanktonskom mrežom i crpcem.



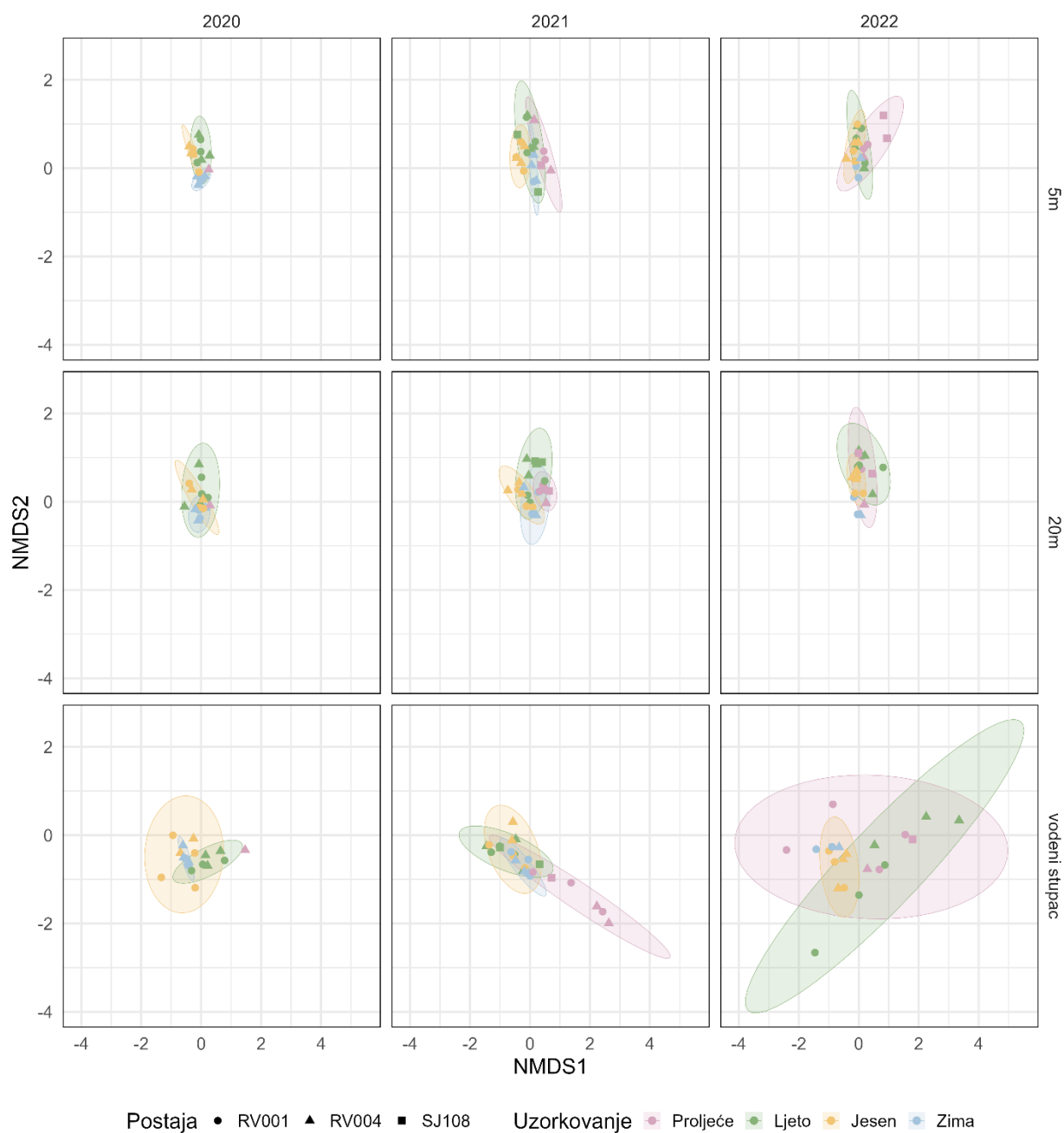
Prilog 19. Broj detektiranih zajedničkih fitoplanktonskih rodova po fitoplanktonskoj skupini obzirom na metodu uzorkovanja. Dijagrami prikazuju broj detektiranih fitoplanktonskih rodova prema metodi uzorkovanja (5 m i 20 m predstavljaju dubine uzorkovane Niskin crpcem, a vodeni stupac predstavlja ukupni vodeni stupac uzorkovan fitoplanktonskom mrežom). Na svim postajama vidljiva je značajna razlika u broju detektiranih rodova između uzorkovanja fitoplanktonskom mrežom i crpcem.



Prilog 20. Dominantnost i raznolikost fitoplanktonskih skupina. Vrlo jasna razlika u bogatstvu i učestalosti uočena je između uzoraka s 5 m i 20 m dubine u usporedbi s uzorcima iz vodenog stupca uzorkovanih fitoplanktonskom mrežom. Najveći broj taksona, kao i njihova ukupna brojnost, zabilježeni su na dubinama od 5 i 20 m, pri čemu se taksoni iz 20 m (tamno plava) ističu najvišom učestalošću pojedinačnih varijanti za sve istraživane postaje i sve godine



Prilog 21. NMDS analiza na temelju različitih načina uzorkovanja kroz vremensko razdoblje od tri godine (Bray-Courtis, 999 permutacija)



Prilog 22. Vrijednosti indeksa raznolikosti za uzorke iz crpaca s terenskog uzorkovanja LTRV

Uzorak	Shannon	Simpson	InvSimpson	Pielou
LTRV101	2,982103611	0,8972619	9,733487633	0,678607
LTRV102	3,475336291	0,94324197	17,61865151	0,66924
LTRV103	3,388477755	0,93299552	14,92437448	0,680864
LTRV104	3,446598202	0,93871883	16,31822685	0,670327
LTRV109	3,303259759	0,93003003	14,29184598	0,652484
LTRV110	3,519512865	0,95088976	20,36235338	0,68529
LTRV111	1,847845942	0,67554417	3,082083611	0,399537
LTRV112	3,622367548	0,95176778	20,73302878	0,703715
LTRV117	3,484626316	0,94204823	17,25572792	0,687452
LTRV118	3,309077225	0,93206815	14,72063559	0,647317
LTRV119	3,315447528	0,91652513	11,97965281	0,649331
LTRV120	3,396810073	0,93656498	15,7641641	0,668479
LTRV125	2,461895713	0,8303459	5,89434607	0,552695
LTRV126	2,600461356	0,87203092	7,814387473	0,564683
LTRV127	3,127761203	0,90046156	10,04636976	0,625901
LTRV128	2,888262544	0,89009204	9,098522044	0,618097
LTRV133	2,658940566	0,84990093	6,662266467	0,54288
LTRV134	3,119116185	0,87892408	8,259280448	0,610157
LTRV135	2,26564552	0,80052821	5,013240233	0,460499
LTRV136	2,272240901	0,77526403	4,44966595	0,478877
LTRV141	2,47718313	0,81046347	5,276027887	0,524007
LTRV142	1,739797834	0,64794374	2,840455138	0,366664
LTRV143	2,820444144	0,86735101	7,538692885	0,56517
LTRV144	1,388019848	0,44980088	1,817523798	0,302733
LTRV149	1,393034435	0,58494935	2,40934449	0,311926
LTRV15	3,491937594	0,93265354	14,84859125	0,673887
LTRV150	3,059458231	0,84814926	6,585414039	0,591068
LTRV151	1,519512102	0,61503005	2,597605348	0,322646
LTRV152	2,767578125	0,82179232	5,611430377	0,565926
LTRV157	2,01674674	0,718859	3,556934098	0,47157
LTRV158	3,878124174	0,95100596	20,41064538	0,695038
LTRV159	2,143906787	0,79136752	4,793117447	0,539987
LTRV16	3,515764588	0,93806437	16,14579436	0,670049
LTRV160	2,17352458	0,83208201	5,955287947	0,473007
LTRV165	2,050640839	0,76677615	4,28772612	0,453502
LTRV166	2,736458567	0,84305177	6,371527793	0,520487
LTRV167	2,772358777	0,84477742	6,442361824	0,544267
LTRV168	2,170957777	0,80423355	5,108127534	0,474556
LTRV173	3,258250838	0,89692566	9,70173565	0,600119
LTRV174	3,412650426	0,91555041	11,84138345	0,619425

Prilog 22. *Vrijednosti indeksa raznolikosti za uzorke iz crpaca s terenskog uzorkovanja LTRV - nastavak*

LTRV175	2,102614378	0,80596183	5,153625134	0,44819
LTRV176	2,034480813	0,78318969	4,612326847	0,422777
LTRV181	3,336923659	0,91386715	11,60997205	0,629808
LTRV182	3,381412656	0,91702884	12,052381	0,629067
LTRV183	3,246078276	0,91042451	11,16376804	0,60871
LTRV184	3,181852065	0,90343999	10,35625394	0,60888
LTRV189	3,081774242	0,90571983	10,60668418	0,604285
LTRV189A	3,397681359	0,93158078	14,61577575	0,647544
LTRV190	3,052471435	0,906738	10,72248046	0,589077
LTRV190A	3,283215089	0,91444174	11,68794241	0,626994
LTRV191	3,207510117	0,92404161	13,16510181	0,67115
LTRV191A	3,398755766	0,93691006	15,85038876	0,649058
LTRV192	3,244294455	0,92206514	12,83122872	0,604605
LTRV192A	3,433828578	0,93827146	16,19996126	0,655092
LTRV197	2,215108382	0,79109668	4,786903283	0,484207
LTRV197A	3,563738434	0,94931114	19,72820222	0,715092
LTRV198	2,187714672	0,79584458	4,898229032	0,460224
LTRV198A	2,868038954	0,88836793	8,957999413	0,578721
LTRV199	2,331235567	0,82168431	5,608031397	0,507329
LTRV199A	3,361455387	0,93540165	15,48027221	0,661521
LTRV200	2,593783746	0,84301953	6,370219363	0,540846
LTRV200A	3,3594519	0,92941307	14,16692828	0,657949
LTRV205	3,484502832	0,94082389	16,89871059	0,696351
LTRV206	2,476486416	0,82130759	5,596208631	0,538938
LTRV207	3,268872629	0,94008632	16,6906792	0,694097
LTRV208	3,255950971	0,93715032	15,91098012	0,668912
LTRV21	3,157143252	0,91302908	11,49809581	0,614031
LTRV213	3,097459618	0,91237062	11,41169752	0,612601
LTRV214	2,513200595	0,82535315	5,7258404	0,493986
LTRV215	3,151463579	0,93082517	14,45612518	0,675781
LTRV216	3,331313258	0,94489251	18,14635263	0,692266
LTRV22	3,116071928	0,91412874	11,64534016	0,628769
LTRV221	3,094235457	0,90793079	10,86139395	0,615905
LTRV222	1,872679751	0,66454768	2,981049588	0,380627
LTRV223	3,058185554	0,89082872	9,159918167	0,611978
LTRV224	1,891850504	0,71162835	3,467747244	0,411709
LTRV229	3,658158242	0,94338066	17,66181077	0,68114
LTRV230	2,067079052	0,64425894	2,811033386	0,409856
LTRV231	3,571991181	0,9411084	16,98035149	0,694715

Prilog 22. *Vrijednosti indeksa raznolikosti za uzorke iz crpaca s terenskog uzorkovanja LTRV - nastavak*

LTRV232	3,350608541	0,93093389	14,47888112	0,655441
LTRV237	2,013696233	0,71270876	3,480788371	0,41706
LTRV238	1,829846977	0,58570138	2,413717924	0,373603
LTRV239	1,528923676	0,50644345	2,026110271	0,308951
LTRV24	3,291399755	0,92621989	13,55378785	0,697552
LTRV240	1,65943665	0,56569771	2,302543716	0,349091
LTRV245	2,225239926	0,704719	3,386604666	0,456441
LTRV246	2,113315034	0,63097421	2,709837697	0,397015
LTRV247	2,39111019	0,76725598	4,296565858	0,577126
LTRV248	0,8650092	0,33623983	1,50656825	0,190842
LTRV253	3,228973436	0,87885333	8,254456958	0,616011
LTRV254	3,456148132	0,93384478	15,11596568	0,645785
LTRV255	3,148239287	0,87877778	8,249313014	0,63526
LTRV256	2,825764808	0,86061198	7,174217565	0,586224
LTRV261	1,557779974	0,53267906	2,139857031	0,334721
LTRV262	3,191468739	0,87577174	8,049698042	0,653614
LTRV263	2,59657949	0,81001787	5,263652979	0,615375
LTRV264	2,72574401	0,85478285	6,886238832	0,571353
LTRV269	3,370401933	0,91465537	11,7171994	0,620775
LTRV270	3,319181377	0,91718788	12,07552689	0,602018
LTRV271	2,650891214	0,7814538	4,575691454	0,496651
LTRV272	1,976355022	0,63481784	2,7383594	0,38266
LTRV277	3,204724177	0,91326671	11,52959896	0,612004
LTRV278	3,188215073	0,91449878	11,69573931	0,604044
LTRV279	3,137178969	0,92016481	12,52580474	0,627786
LTRV280	3,212909564	0,92232838	12,87471566	0,629249
LTRV29	3,591944014	0,94686897	18,8213939	0,739112
LTRV30	3,851792877	0,96234519	26,55702892	0,758948
LTRV31	3,757344405	0,95739819	23,47318318	0,73244
LTRV32	3,760393356	0,95668283	23,08553225	0,73913
LTRV37	2,99753439	0,88590755	8,764821501	0,666147
LTRV38	3,612840401	0,95533571	22,38925055	0,721034
LTRV39	3,563385784	0,94301993	17,54999505	0,706541
LTRV40	3,391493648	0,94796672	19,21846873	0,755573
LTRV45	2,17130046	0,758457	4,140049601	0,490045
LTRV46	2,336250271	0,69399842	3,267956993	0,455946
LTRV47	2,004300506	0,65068262	2,862726194	0,420128
LTRV48	1,3574645	0,51108412	2,045341618	0,321712
LTRV5	3,449413461	0,94288442	17,50835794	0,654804

Prilog 22. *Vrijednosti indeksa raznolikosti za uzorke iz crpaca s terenskog uzorkovanja LTRV - nastavak*

LTRV53	3,429254656	0,91696482	12,04308895	0,678222
LTRV54	3,80752231	0,94183657	17,19293265	0,738027
LTRV55	3,770998737	0,93065154	14,4199305	0,707144
LTRV56	2,128652997	0,7871902	4,699031656	0,51577
LTRV6	3,51898912	0,94977878	19,91190151	0,67409
LTRV61	3,364629542	0,91541819	11,82287371	0,695706
LTRV62	3,814596195	0,95075318	20,30588154	0,707241
LTRV63	3,006915104	0,88691585	8,842972465	0,63029
LTRV64	3,939083303	0,94755674	19,06822769	0,736022
LTRV69	1,772556886	0,7227918	3,607396838	0,406857
LTRV7	3,280991771	0,93415918	15,18814679	0,653079
LTRV70	2,256092628	0,8249531	5,712754588	0,483783
LTRV71	2,042018258	0,71433567	3,500612058	0,456079
LTRV72	2,431369613	0,81892508	5,522575821	0,535156
LTRV77	3,670618015	0,92684999	13,67053891	0,660102
LTRV78	3,569202624	0,91194136	11,35606913	0,64503
LTRV79	1,809669832	0,72232729	3,601362202	0,394696
LTRV8	3,267661269	0,93143075	14,58379706	0,638465
LTRV80	2,575312501	0,83689024	6,130841154	0,490814
LTRV85	3,477574586	0,89364762	9,402704294	0,631674
LTRV86	2,951714126	0,79661784	4,916852066	0,535368
LTRV87	2,754639341	0,73183809	3,729090411	0,499259
LTRV88	2,616544916	0,70104501	3,344985112	0,476694
LTRV93	3,262843511	0,9180427	12,20147537	0,623738
LTRV94	3,250280375	0,91597597	11,90135747	0,610052
LTRV95	3,642159338	0,95264421	21,11674154	0,697684
LTRV96	3,076400333	0,91539432	11,81953758	0,634044

Prilog 23. Statistička analiza indeksa raznolikosti Kruskal-Wallis s Dunn post hoc testom na temelju uzoraka s terenskog uzorkovanja LTRV s obzirom na postaju (ns – nije statistički značajno, $p > 0,05$; * - statistički značajno, $p > 0,01$)

Indeks	Sezona	Dubina	χ^2	Stupnjevi slobode	p-vrijednost	Statistički značajno
Shannon	Proljeće	5m	0,214286	1	0,643429	ns
Shannon	Proljeće	20m	0,893382	1	0,344562	ns
Shannon	Ljeto	5m	0,017544	1	0,894626	ns
Shannon	Ljeto	20m	1,421053	1	0,23323	ns
Shannon	Jesen	5m	0,438596	1	0,507801	ns
Shannon	Jesen	20m	5,475634	1	0,019283	*
Shannon	Zima	5m	0,004959	1	0,943861	ns
Shannon	Zima	20m	0,044628	1	0,832689	ns
Simpson	Proljeće	5m	0,214286	1	0,643429	ns
Simpson	Proljeće	20m	1,102941	1	0,293622	ns
Simpson	Ljeto	5m	0,001949	1	0,964784	ns
Simpson	Ljeto	20m	0,859649	1	0,353837	ns
Simpson	Jesen	5m	0,563353	1	0,452912	ns
Simpson	Jesen	20m	5,896686	1	0,015169	*
Simpson	Zima	5m	0,971901	1	0,324207	ns
Simpson	Zima	20m	0,71405	1	0,398103	ns
InvSimpson	Proljeće	5m	0,214286	1	0,643429	ns
InvSimpson	Proljeće	20m	1,102941	1	0,293622	ns
InvSimpson	Ljeto	5m	0,001949	1	0,964784	ns
InvSimpson	Ljeto	20m	0,859649	1	0,353837	ns
InvSimpson	Jesen	5m	0,563353	1	0,452912	ns
InvSimpson	Jesen	20m	5,896686	1	0,015169	*
InvSimpson	Zima	5m	0,971901	1	0,324207	ns
InvSimpson	Zima	20m	0,71405	1	0,398103	ns
Pielou	Proljeće	5m	0,013393	1	0,907869	ns
Pielou	Proljeće	20m	1,863971	1	0,172167	ns
Pielou	Ljeto	5m	0,157895	1	0,691102	ns
Pielou	Ljeto	20m	0,703704	1	0,401542	ns
Pielou	Jesen	5m	0,095517	1	0,757278	ns
Pielou	Jesen	20m	4,680312	1	0,03051	*
Pielou	Zima	5m	0,401653	1	0,526237	ns
Pielou	Zima	20m	1,269421	1	0,259875	ns

Prilog 24. Statistička analiza indeksa raznolikosti na temelju Kruskal-Wallis s Dunn post hoc testom na uzorcima s terenskog uzorkovanja LTRV s obzirom na dubinu (ns – nije statistički značajno, $p > 0,05$).

Indeks	Sezona	Postaja	χ^2	Stupnjevi slobode	p-vrijednost	Statistički značajno
Shannon	Proljeće	RV001	0,397059	1	0,528612	ns
Shannon	Proljeće	RV004	0,857143	1	0,354539	ns
Shannon	Ljeto	RV001	0,001949	1	0,964784	ns
Shannon	Ljeto	RV004	1,639376	1	0,200411	ns
Shannon	Jesen	RV001	2,964912	1	0,085089	ns
Shannon	Jesen	RV004	0,001949	1	0,964784	ns
Shannon	Zima	RV001	0,691429	1	0,405679	ns
Shannon	Zima	RV004	0,182178	1	0,669509	ns
Simpson	Proljeće	RV001	0,397059	1	0,528612	ns
Simpson	Proljeće	RV004	0,482143	1	0,487453	ns
Simpson	Ljeto	RV001	0,438596	1	0,507801	ns
Simpson	Ljeto	RV004	0,703704	1	0,401542	ns
Simpson	Jesen	RV001	3,276803	1	0,070266	ns
Simpson	Jesen	RV004	0,438596	1	0,507801	ns
Simpson	Zima	RV001	0	1	1	ns
Simpson	Zima	RV004	0,130435	1	0,717982	ns
InvSimpson	Proljeće	RV001	0,397059	1	0,528612	ns
InvSimpson	Proljeće	RV004	0,482143	1	0,487453	ns
InvSimpson	Ljeto	RV001	0,438596	1	0,507801	ns
InvSimpson	Ljeto	RV004	0,703704	1	0,401542	ns
InvSimpson	Jesen	RV001	3,276803	1	0,070266	ns
InvSimpson	Jesen	RV004	0,438596	1	0,507801	ns
InvSimpson	Zima	RV001	0	1	1	ns
InvSimpson	Zima	RV004	0,130435	1	0,717982	ns
Pielou	Proljeće	RV001	1,102941	1	0,293622	ns
Pielou	Proljeće	RV004	0,65625	1	0,417887	ns
Pielou	Ljeto	RV001	0,157895	1	0,691102	ns
Pielou	Ljeto	RV004	0,703704	1	0,401542	ns
Pielou	Jesen	RV001	2,122807	1	0,14512	ns
Pielou	Jesen	RV004	0,235867	1	0,627207	ns
Pielou	Zima	RV001	2,285714	1	0,13057	ns
Pielou	Zima	RV004	1,035932	1	0,308769	ns

Prilog 25a. Rezultati PERMANOVA analize na uzorcima iz crpaca s terenskog uzorkovanja LTRV ((SumOfSqs - suma kvadrata, Df - stupnjevi slobode, R2 - srednja kvadratna vrijednost, F - vrijednost F-statistike korištena u PERMANOVA testu, p - vrijednost značajnosti, ns - nije statistički značajno: , $p > 0.05$, $p < 0.05$: *, $p < 0.01$: **, $p < 0.001$: ***)

Faktor	Df	SumOfSqs	R2	F	p	Značajnost
Sezona	3	81,470	0,27556	188,893	0,001	***
Postaja	1	0,2595	0,00878	18,052	0,074	ns
Godina	2	13,484	0,04561	46,895	0,001	***
Dubina	1	0,3479	0,01177	24,196	0,028	*

Prilog 25b. Rezultati višestruke usporedbe srednjih vrijednosti (Turkey test) iz crpca s terenskih uzorkovanja LTRV s obzirom na godine i sezone (razina puzdanosti, 95%)

Usporedba	Razlika u sredini	Donja granica (lwr)	Gornja granica (upr)	Prilagođena p-vrijednost
2021-2020	0,02135377	-0,01708290	0,059790431	0,3887228
2022-2020	-0,03458748	-0,07173786	0,002562888	0,0737410
2022-2021	-0,05594125	-0,09149335	-0,020389148	0,0008113
Ljeto-Jesen	0,044449155	-0,01373850	0,10263681	0,1981342
Proljeće-Jesen	0,034738802	-0,02574964	0,09522725	0,4443362
Zima-Jesen	-0,039408208	-0,09547924	0,01666282	0,2648942
Proljeće-Ljeto	-0,009710353	-0,07019880	0,05077809	0,9754287
Zima-Ljeto	-0,083857363	-0,13992839	-0,02778633	0,0008833
Zima-Proljeće	-0,074147010	-0,13260220	-0,01569182	0,0066924

Prilog 26a. Rezultati PERMANOVA analize na uzorcima iz crpca s terenskih uzorkovanja LTRV i PO za preklapajuća uzorkovanja ((SumOfSqs - suma kvadrata, Df - stupnjevi slobode, R2 - srednja kvadratna vrijednost, F - vrijednost F-statistike korištena u PERMANOVA testu, p - vrijednost značajnosti, nije statistički značajno: ns, $p > 0.05$, $p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: ***)

Faktor	Df	SumOfSqs	R2	F	p	Značajnost
Postaja	1	0,1355	0,01816	0,7685	0,690	ns
Dubina	1	0,2463	0,03301	13,971	0,151	ns
Mjesec	3	23,892	0,32027	45,185	0,001	***

Prilog 26b. Rezultati višestruke usporedbe srednjih vrijednosti (Turkey test) na uzorcima iz crpca s terenskih uzorkovanja LTRV i PO za preklapajuća uzorkovanja (razina puzdanosti, 95%)

Usporedba	Razlika u sredini	Donja granica (lwr)	Gornja granica (upr)	Prilagodena p-vrijednost
RV004 – RV001	0,0604	–0,0162	0,1371	0,144
SJ108 – RV001	0,0652	–0,0082	0,1386	0,089
SJ108 – RV004	0,0047	–0,0687	0,0781	0,986

Prilog 27a. Rezultati PERMANOVA analize na uzorcima iz fitoplanktonske mreže s terenskih uzorkovanja LTRV, PO, Zapadna Istra i Kvarner ((SumOfSqs - suma kvadrata, Df - stupnjevi slobode, R2 - srednja kvadratna vrijednost, F - vrijednost F-statistike korištena u PERMANOVA testu, p - vrijednost značajnosti, nije statistički značajno: ., $p > 0.05$, $p < 0.05$: *, $p < 0.01$: **, $p < 0.001$: ***)

Faktor	Df	SumOfSqs	R2	F	p	Značajnost
Postaja	10	3,595	0,09204	12,312	0,037	*
Godina	2	2,078	0,05321	35,587	0,001	***
Mjesec	11	7,530	0,19280	23,445	0,001	***

Prilog 27b. Rezultati višestruke usporedbe srednjih vrijednosti (Turkey test) iz fitoplanktonske mreže s terenskih uzorkovanja LTRV, PO, Zapadna Istra i Kvarner (razina puzdanosti, 95%)

Usporedba	Razlika u sredini	Donja granica (lwr)	Gornja granica (upr)	Prilagođena p-vrijednost
RV004-RV001	0,016067530	-0,06886761	0,101002671	0,9999230
SJ107-RV001	-0,087486951	-0,24842674	0,073452842	0,7826136
SJ101-RV001	-0,077951439	-0,25556574	0,099662865	0,9333545
SJ108-RV001	-0,038917794	-0,18770669	0,109871097	0,9986351
JPA23-RV001	-0,161988514	-0,32292831	-0,001048721	0,0470778
ZI052-RV001	-0,089701446	-0,25064124	0,071238347	0,7557357
FPA34-RV001	-0,129082048	-0,29002184	0,031857745	0,2418782
CR001-RV001	-0,131511496	-0,29245129	0,029428297	0,2185485
ZI012-RV001	-0,148304075	-0,30924387	0,012635718	0,0993052
RI019-RV001	-0,145811464	-0,27784851	-0,013774421	0,0180399
SJ107-RV004	-0,103554481	-0,26626329	0,059154323	0,5824006
SJ101-RV004	-0,094018970	-0,27323777	0,085199833	0,8173403
SJ108-RV004	-0,054985324	-0,20568593	0,095715280	0,9808963
JPA23-RV004	-0,178056044	-0,34076485	-0,015347240	0,0199894
ZI052-RV004	-0,105768977	-0,26847778	0,056939827	0,5510551
FPA34-RV004	-0,145149578	-0,30785838	0,017559226	0,1258921
CR001-RV004	-0,147579026	-0,31028783	0,015129778	0,1117624
ZI012-RV004	-0,164371605	-0,32708041	-0,001662801	0,0454840
RI019-RV004	-0,161878994	-0,29606662	-0,027691370	0,0059980
SJ101-SJ107	0,009535512	-0,21586861	0,234939633	1,0000000
SJ108-SJ107	0,048569157	-0,15489659	0,252034906	0,9993793
JPA23-SJ107	-0,074501563	-0,28701461	0,138011481	0,9857540
ZI052-SJ107	-0,002214495	-0,21472754	0,210298548	1,0000000
FPA34-SJ107	-0,041595097	-0,25410814	0,170917946	0,9998949

Prilog 27b. Rezultati višestruke usporedbe srednjih vrijednosti (Turkey test) iz fitoplanktonske mreže s terenskih uzorkovanja LTRV, PO, Zapadna Istra i Kvarner - nastavak

CR001-SJ107	-0,044024545	-0,25653759	0,168488499	0,9998239
ZI012-SJ107	-0,060817124	-0,27333017	0,151695920	0,9971042
RI019-SJ107	-0,058324513	-0,24988118	0,133232156	0,9952111
SJ108-SJ101	0,039033645	-0,17786157	0,255928862	0,9999514
JPA23-SJ101	-0,084037074	-0,30944120	0,141367047	0,9776845
ZI052-SJ101	-0,011750007	-0,23715413	0,213654114	1,0000000
FPA34-SJ101	-0,051130609	-0,27653473	0,174273512	0,9996036
CR001-SJ101	-0,053560056	-0,27896418	0,171844065	0,9994036
ZI012-SJ101	-0,070352635	-0,29575676	0,155051486	0,9941661
RI019-SJ101	-0,067860025	-0,27362489	0,137904845	0,9910296
JPA23-SJ108	-0,123070720	-0,32653647	0,080395029	0,6542961
ZI052-SJ108	-0,050783652	-0,25424940	0,152682096	0,9990860
FPA34-SJ108	-0,090164254	-0,29363000	0,113301495	0,9292333
CR001-SJ108	-0,092593702	-0,29605945	0,110872047	0,9167831
ZI012-SJ108	-0,109386281	-0,31285203	0,094079468	0,7938672
RI019-SJ108	-0,106893670	-0,28836123	0,074573888	0,6892876
ZI052-JPA23	0,072287067	-0,14022598	0,284800111	0,9886403
FPA34-JPA23	0,032906466	-0,17960658	0,245419509	0,9999881
CR001-JPA23	0,030477018	-0,18203603	0,242990062	0,9999943
ZI012-JPA23	0,013684439	-0,19882860	0,226197483	1,0000000
RI019-JPA23	0,016177050	-0,17537962	0,207733719	1,0000000
FPA34-ZI052	-0,039380602	-0,25189365	0,173132442	0,9999364

Prilog 28. *Detektirani štetni i potencijalno toksični taksoni u setu podataka sjevernog Jadrana. Status označava kategoriju (T – toksični, H – štetni, ali ne toksični)*

Skupina	Red	Rod	Takson	Status
Dinophyta	Akashiwales	<i>Akashiwo</i>	<i>Akashiwo sanguinea</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	<i>Alexandrium affine</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	<i>Alexandrium andersonii</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	<i>Alexandrium leei</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	<i>Alexandrium minutum</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	<i>Alexandrium pseudogonyaulax</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	<i>Alexandrium tamarense</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	<i>Alexandrium tamiyavanichii</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Alexandrium</i>	<i>Alexandrium taylorii</i>	T
Dinophyta	Amphidinales	<i>Amphidinium</i>	<i>Amphidinium carterae</i>	T
Dinophyta	Amphidinales	<i>Amphidinium</i>	<i>Amphidinium massartii</i>	T
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Amphidoma</i>	<i>Amphidoma languida</i>	T
ostali Ochrophyta	Pelagomonadales	<i>Aureococcus</i>	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	H
ostali Ochrophyta	Sarcinochrysidales	<i>Aureoumbra</i>	<i>Aureoumbra lagunensis</i>	H
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Azadinium</i>	<i>Azadinium poporum</i>	T
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Azadinium</i>	<i>Azadinium spinosum</i>	T
Bacillariophyta	Hemiaulales	<i>Cerataulina</i>	<i>Cerataulina pelagica</i>	H
Bacillariophyta	Chaetocerotales	<i>Chaetoceros</i>	<i>Chaetoceros debilis</i>	H
Bacillariophyta	Chaetocerotales	<i>Chaetoceros</i>	<i>Chaetoceros tenuissimus</i>	H
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Chrysochromulina</i>	<i>Chrysochromulina leadbeateri</i>	T
Dinophyta	Dinophysiales	<i>Dinophysis</i>	<i>Dinophysis acuminata</i>	T
Dinophyta	Dinophysiales	<i>Dinophysis</i>	<i>Dinophysis fortii</i>	T
Dinophyta	Dinophysiales	<i>Dinophysis</i>	<i>Dinophysis norvegica</i>	T
Bacillariophyta	Hemiaulales	<i>Eucampia</i>	<i>Eucampia zodiacus</i>	H
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Gonyaulax</i>	<i>Gonyaulax bohaiensis</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Gonyaulax</i>	<i>Gonyaulax polygramma</i>	H
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Gonyaulax</i>	<i>Gonyaulax spinifera</i>	T
Bacillariophyta	Rhizosoleniales	<i>Guinardia</i>	<i>Guinardia striata</i>	H
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Gymnodinium</i>	<i>Gymnodinium catenatum</i>	T
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Gyrodinium</i>	<i>Gyrodinium spirale</i>	H
ostali Ochrophyta	Chattonellales	<i>Heterosigma</i>	<i>Heterosigma akashiwo</i>	T
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Karenia</i>	<i>Karenia brevis</i>	T
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Karenia</i>	<i>Karenia mikimotoi</i>	T
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Karlodinium</i>	<i>Karlodinium veneficum</i>	T
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Lepidodinium</i>	<i>Lepidodinium chlorophorum</i>	H
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Levanderina</i>	<i>Levanderina fissa</i>	H
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Margalefidinium</i>	<i>Margalefidinium fulvescens</i>	T
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Margalefidinium</i>	<i>Margalefidinium polykrikoides</i>	T

Prilog 28. *Detektirani štetni i potencijalno toksični taksoni u setu podataka sjevernog Jadrana. Status označava kategoriju (T – toksični, H – štetni, ali ne toksični) – nastavak*

Dinophyta	Noctilucales	<i>Noctiluca</i>	<i>Noctiluca scintillans</i>	H
Haptophyta	Phaeocystales	<i>Phaeocystis</i>	<i>Phaeocystis globosa</i>	T
Dinophyta	Dinophysiales	<i>Phalacroma</i>	<i>Phalacroma mitra</i>	T
Dinophyta	Prorocentrales	<i>Prorocentrum</i>	<i>Prorocentrum rhathymum</i>	T
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Protoceratium</i>	<i>Protoceratium reticulatum</i>	T
Dinophyta	Peridinales	<i>Proto-peridinium</i>	<i>Proto-peridinium depressum</i>	H
Haptophyta	Prymniales	<i>Prymnesium</i>	<i>Prymnesium polylepis</i>	T
ostali Ochrophyta	Florentiellales	<i>Pseudochattonella</i>	<i>Pseudochattonella farcimen</i>	T
ostali Ochrophyta	Florentiellales	<i>Pseudochattonella</i>	<i>Pseudochattonella verruculosa</i>	T
Bacillariophyta	Bacillariales	<i>Pseudo-nitzschia</i>	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	T
Bacillariophyta	Bacillariales	<i>Pseudo-nitzschia</i>	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	T
Bacillariophyta	Rhizosoleniales	<i>Rhizosolenia</i>	<i>Rhizosolenia</i>	H
Bacillariophyta	Thalassiosirales	<i>Skeletonema</i>	<i>Skeletonema</i>	H
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Sourniaea</i>	<i>Sourniaea diacantha</i>	H
Chlorophyta	Chlorodendrales	<i>Tetraselmis</i>	<i>Tetraselmis</i>	H
Bacillariophyta	Thalassiosirales	<i>Thalassiosira</i>	<i>Thalassiosira mala</i>	H
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Tripes</i>	<i>Tripes furca</i>	H
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Tripes</i>	<i>Tripes fusus</i>	H
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Tripes</i>	<i>Tripes muelleri</i>	H
ostali Ochrophyta	Dictyochales	<i>Vicicitus</i>	<i>Vicicitus globosus</i>	T

Prilog 29. Novodetektirani taksoni u setu podataka sjevernog Jadrana dobiveni metodom metabarkodiranja

Skupina	Red	Rod	Vrsta
Bacillariophyta	Bacillariales	<i>Fragilariopsis</i>	<i>Fragilariopsis</i> (neklasificirano)
Bacillariophyta	Bacillariophyceae Incertae sedis	<i>Undatella</i>	<i>Undatella</i> (neklasificirano)
Bacillariophyta	Naviculales	<i>Meuniera</i>	<i>Meuniera membranacea</i>
Bacillariophyta	Naviculales	<i>Carinasigma</i>	<i>Carinasigma minuta</i>
Bacillariophyta	Naviculales	<i>Fallacia</i>	<i>Fallacia</i> (neklasificirano)
Bacillariophyta	Naviculales	<i>Fallacia</i>	<i>Fallacia tenera</i>
Bacillariophyta	Melosirales	<i>Stephanopyxis</i>	<i>Stephanopyxis</i> (neklasificirano)
Bacillariophyta	Melosirales	<i>Stephanopyxis</i>	<i>Stephanopyxis turris</i>
Bacillariophyta	Stephanodiscales	<i>Stephanodiscus</i>	<i>Stephanodiscus minutulus</i>
Bacillariophyta	Thalassiosirales	<i>Conticribra</i>	<i>Conticribra weissflogii</i>
Bacillariophyta	Fragilariales	<i>Nanofrustulum</i>	<i>Nanofrustulum shiloi</i>
Bacillariophyta	Fragilariales	<i>Pseudostaurosira</i>	<i>Pseudostaurosira madagascariensis</i>
Bacillariophyta	Licmophorales	<i>Licmosphenia</i>	<i>Licmosphenia peragallioides</i>
Bacillariophyta	Licmophorales	<i>Falcula</i>	<i>Falcula</i> (neklasificirano)
Bacillariophyta	Rhabdonematales	<i>Hyalosira</i>	<i>Hyalosira</i> (neklasificirano)
Bacillariophyta	Biddulphiales	<i>Biddulphiopsis</i>	<i>Biddulphiopsis titiana</i>
Bacillariophyta	Biddulphiales	<i>Lampriscus</i>	<i>Lampriscus</i> (neklasificirano)
Bacillariophyta	Cymatosirales	<i>Arcocellulus</i>	<i>Arcocellulus</i> (neklasificirano)
Bacillariophyta	Cymatosirales	<i>Minutocellus</i>	<i>Minutocellus polymorphus</i>
Bacillariophyta	Cymatosirales	<i>Papiliocellulus</i>	<i>Papiliocellulus elegans</i>
Chlorophyta	Chaetophorales	<i>Coccobotrys</i>	<i>Coccobotrys verrucariae</i>
Chlorophyta	Chaetophorales	<i>Dilabifilum</i>	<i>Dilabifilum</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Chaetophorales	<i>Uronema</i>	<i>Uronema</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Brachiomonas</i>	<i>Brachiomonas</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Chlamydomonas</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Chlamydomonas parkeae</i>
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Microglena</i>	<i>Microglena</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Microglena</i>	<i>Microglena monadina</i>
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Spongiochloris</i>	<i>Spongiochloris spongiosa</i>
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Spongiococcum</i>	<i>Spongiococcum</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Chlamydomonadales	<i>Haematococcus</i>	<i>Haematococcus lacustris</i>
Chlorophyta	Sphaeropleales	<i>Chromochloris</i>	<i>Chromochloris zofingiensis</i>
Chlorophyta	Sphaeropleales	<i>Mychonastes</i>	<i>Mychonastes</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Sphaeropleales	<i>Pseudomuriella</i>	<i>Pseudomuriella engadinensis</i>
Chlorophyta	Sphaeropleales	<i>Desmodesmus</i>	<i>Desmodesmus</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Sphaeropleales	<i>Tetradasmus</i>	<i>Tetradasmus</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Chloropicales	<i>Chloroparvula</i>	<i>Chloroparvula</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Chloropicales	<i>Chloroparvula</i>	<i>Chloroparvula pacifica</i>
Chlorophyta	Chloropicales	<i>Chloropicon</i>	<i>Chloropicon</i> (neklasificirano)

Prilog 29. Novodetektirani taksoni u setu podataka sjevernog Jadrana dobiveni metodom metabarkodiranja - nastavak

Chlorophyta	Chloropicales	<i>Chloropicon</i>	<i>Chloropicon laureae</i>
Chlorophyta	Chloropicales	<i>Chloropicon</i>	<i>Chloropicon primus</i>
Chlorophyta	Dolichomastigales	<i>Crustomastix</i>	<i>Crustomastix (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Dolichomastigales	<i>Crustomastix</i>	<i>Crustomastix stigmatica</i>
Chlorophyta	Dolichomastigales	<i>Dolichomastix</i>	<i>Dolichomastix (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Dolichomastigales	<i>Dolichomastix</i>	<i>Dolichomastix tenuilepis</i>
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Bathycoccus</i>	<i>Bathycoccus prasinos</i>
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Ostreococcus</i>	<i>Ostreococcus (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Ostreococcus</i>	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Ostreococcus</i>	<i>Ostreococcus tauri</i>
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Mamiella</i>	<i>Mamiella (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Mantoniella</i>	<i>Mantoniella (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Micromonas</i>	<i>Micromonas (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Mamiellales	<i>Micromonas</i>	<i>Micromonas pusilla</i>
Chlorophyta	Nephroselmiales	<i>Nephroselmis</i>	<i>Nephroselmis (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Nephroselmiales	<i>Nephroselmis</i>	<i>Nephroselmis pyriformis</i>
Chlorophyta	Marsupiomonadales	<i>Marsupiomonas</i>	<i>Marsupiomonas (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Pseudoscourfieldiales	<i>Pycnococcus</i>	<i>Pycnococcus (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pterosperma</i>	<i>Pterosperma (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pterosperma</i>	<i>Pterosperma cristatum</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Cymbomonas</i>	<i>Cymbomonas (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Cymbomonas</i>	<i>Cymbomonas tetramitiformis</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Prasinopapilla</i>	<i>Prasinopapilla vacuolata</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pyramimonas</i>	<i>Pyramimonas (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pyramimonas</i>	<i>Pyramimonas australis</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pyramimonas</i>	<i>Pyramimonas disomata</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pyramimonas</i>	<i>Pyramimonas gelidicola</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pyramimonas</i>	<i>Pyramimonas obovata</i>
Chlorophyta	Pyramimonadales	<i>Pyramimonas</i>	<i>Pyramimonas propulsa</i>
Chlorophyta	Chlorellales	<i>Apatococcus</i>	<i>Apatococcus lobatus</i>
Chlorophyta	Chlorellales	<i>Nannochloris</i>	<i>Nannochloris (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Chlorellales	<i>Picochlorum</i>	<i>Picochlorum (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Chlorellales	<i>Picochlorum</i>	<i>Picochlorum oklahomense</i>
Chlorophyta	Prasiolales	<i>Pseudochlorella</i>	<i>Pseudochlorella (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Prasiolales	<i>Diplosphaera</i>	<i>Diplosphaera (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Prasiolales	<i>Pseudostichococcus</i>	<i>Pseudostichococcus (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Prasiolales	<i>Pseudostichococcus</i>	<i>Pseudostichococcus monallantoides</i>
Chlorophyta	Trebouxiales	<i>Lobosphaera</i>	<i>Lobosphaera incisa</i>
Chlorophyta	Trebouxiales	<i>Myrmecia</i>	<i>Myrmecia (neklasificirano)</i>
Chlorophyta	Trebouxiales	<i>Symbiochloris</i>	<i>Symbiochloris (neklasificirano)</i>

Prilog 29. Novodetektirani taksoni u setu podataka sjevernog Jadrana dobiveni metodom metabarkodiranja - nastavak

Chlorophyta	Trebouxiales	<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Trebouxiales	<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia aggregata</i>
Chlorophyta	Trebouxiales	<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia impressa</i>
Chlorophyta	Trebouxiales	<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia jamesii</i>
Chlorophyta	Trebouxiales	<i>Trebouxia</i>	<i>Trebouxia usneae</i>
Chlorophyta	Trebouxiales	<i>Vulcanochloris</i>	<i>Vulcanochloris guanchorum</i>
Chlorophyta	Trebouxiophyceae Incertae sedis	<i>Choricystis</i>	<i>Choricystis</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Trebouxiophyceae Incertae sedis	<i>Elliptochloris</i>	<i>Elliptochloris</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Trebouxiophyceae Incertae sedis	<i>Xylochloris</i>	<i>Xylochloris</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Watanabeales	<i>Chloroidium</i>	<i>Chloroidium</i> (neklasificirano)
Chlorophyta	Watanabeales	<i>Chloroidium</i>	<i>Chloroidium ellipsoideum</i>
Chlorophyta	Watanabeales	<i>Chloroidium</i>	<i>Chloroidium saccharophilum</i>
Chlorophyta	Watanabeales	<i>Phyllosiphon</i>	<i>Phyllosiphon arisari</i>
Chlorophyta	Watanabeales	<i>Watanabea</i>	<i>Watanabea reniformis</i>
Cryptophyta	Cryptomonadales	<i>Goniomonas</i>	<i>Goniomonas</i> (neklasificirano)
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Geminigera</i>	<i>Geminigera</i> (neklasificirano)
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Geminigera</i>	<i>Geminigera cryophila</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Plagioselmis</i>	<i>Plagioselmis prolunga</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Proteomonas</i>	<i>Proteomonas</i> (neklasificirano)
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Proteomonas</i>	<i>Proteomonas sulcata</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Teleaulax</i>	<i>Teleaulax</i> (neklasificirano)
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Teleaulax</i>	<i>Teleaulax acuta</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Teleaulax</i>	<i>Teleaulax amphioxeia</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Teleaulax</i>	<i>Teleaulax gracilis</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Urgorri</i>	<i>Urgorri complanatus</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Falcomonas</i>	<i>Falcomonas</i> (neklasificirano)
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Hemiselmis</i>	<i>Hemiselmis</i> (neklasificirano)
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Hemiselmis</i>	<i>Hemiselmis andersenii</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Hemiselmis</i>	<i>Hemiselmis cryptochromatica</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Rhinomonas</i>	<i>Rhinomonas</i> (neklasificirano)
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Rhinomonas</i>	<i>Rhinomonas nottbecki</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Rhodomonas</i>	<i>Rhodomonas</i> (neklasificirano)
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Rhodomonas</i>	<i>Rhodomonas salina</i>
Cryptophyta	Pyrenomonadales	<i>Storeatula</i>	<i>Storeatula major</i>
Dinophyta	Blastodinales	<i>Oodinium</i>	<i>Oodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Amphidoma</i>	<i>Amphidoma</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Amphidoma</i>	<i>Amphidoma fulgens</i>
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Amphidoma</i>	<i>Amphidoma languida</i>
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Eleftheros</i>	<i>Eleftheros xomoi</i>
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Gymnoxanthella</i>	<i>Gymnoxanthella</i> (neklasificirano)

Prilog 29. Novodetektirani taksoni u setu podataka sjevernog Jadrana dobiveni metodom metabarkodiranja - nastavak

Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Gymnoxanthella</i>	<i>Gymnoxanthella radiolariae</i>
Dinophyta	Dinophyceae Incertae sedis	<i>Qia</i>	<i>Qia lebouriae</i>
Dinophyta	Dinophysiales	<i>Pseudophalacroma</i>	<i>Pseudophalacroma</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Dinophysiales	<i>Sinophysis</i>	<i>Sinophysis</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Ellobiopsidales	<i>Ellobiopsis</i>	<i>Ellobiopsis chattonii</i>
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Impagidinium</i>	<i>Impagidinium pallidum</i>
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Sourniaea</i>	<i>Sourniaea diacantha</i>
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Spiniferites</i>	<i>Spiniferites</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Spiniferites</i>	<i>Spiniferites ramosus</i>
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Amylax</i>	<i>Amylax</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Amylax</i>	<i>Amylax triacantha</i>
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Amylax</i>	<i>Amylax triacantha</i> var. <i>buxus</i>
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Pyxidropsis</i>	<i>Pyxidropsis psilata</i>
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Fragilidium</i>	<i>Fragilidium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Fragilidium</i>	<i>Fragilidium mexicanum</i>
Dinophyta	Gonyaulacales	<i>Fragilidium</i>	<i>Fragilidium subglobosum</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Chytriodinium</i>	<i>Chytriodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Chytriodinium</i>	<i>Chytriodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Chytriodinium</i>	<i>Chytriodinium affine</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Chytriodinium</i>	<i>Chytriodinium roseum</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Gyrodiniellum</i>	<i>Gyrodiniellum</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Lepidodinium</i>	<i>Lepidodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Lepidodinium</i>	<i>Lepidodinium chlorophorum</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Margalefidinium</i>	<i>Margalefidinium fulvescens</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Margalefidinium</i>	<i>Margalefidinium polykrikoides</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Nusuttodinium</i>	<i>Nusuttodinium poecilochroum</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Paragymnodinium</i>	<i>Paragymnodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Paragymnodinium</i>	<i>Paragymnodinium shiwaense</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Cucumeridinium</i>	<i>Cucumeridinium coeruleum</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Dissodinium</i>	<i>Dissodinium pseudolunula</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Grammatodinium</i>	<i>Grammatodinium tongyeonginum</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Levanderina</i>	<i>Levanderina fissa</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Karlodinium</i>	<i>Karlodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Karlodinium</i>	<i>Karlodinium veneficum</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Takayama</i>	<i>Takayama</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Takayama</i>	<i>Takayama</i> cf. <i>pulchellum</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Balechina</i>	<i>Balechina coerulea</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Balechina</i>	<i>Balechina pachydermata</i>
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Erythrospidinium</i>	<i>Erythrospidinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Erythrospidinium</i>	<i>Erythrospidinium agile</i>

Prilog 29. Novodetektirani taksoni u setu podataka sjevernog Jadrana dobiveni metodom metabarkodiranja - nastavak

Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Nematodinium</i>	<i>Nematodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Gymnodiniales	<i>Proterothropsis</i>	<i>Proterothropsis</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Haplozoales	<i>Haplozoon</i>	<i>Haplozoon</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Noctilucales	<i>Abedinium</i>	<i>Abedinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Noctilucales	<i>Abedinium</i>	<i>Abedinium dasypus</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	<i>Blastodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	<i>Blastodinium cf. mangini</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	<i>Blastodinium contortum</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	<i>Blastodinium crassum</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	<i>Blastodinium galatheanum</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	<i>Blastodinium mangini</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	<i>Blastodinium navicula</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	<i>Blastodinium pruvoti</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Blastodinium</i>	<i>Blastodinium spinulosum</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Cryptocodinium</i>	<i>Cryptocodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Peridinales	<i>Pentaparsodinium</i>	<i>Pentaparsodinium tyrrhenicum</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Durinskia</i>	<i>Durinskia baltica</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Kryptoperidinium</i>	<i>Kryptoperidinium foliaceum</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Lessardia</i>	<i>Lessardia</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Peridinales	<i>Lessardia</i>	<i>Lessardia elongata</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Bysmatrum</i>	<i>Bysmatrum</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Peridinales	<i>Bysmatrum</i>	<i>Bysmatrum arenicola</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Bysmatrum</i>	<i>Bysmatrum subsalsum</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Blepharocysta</i>	<i>Blepharocysta splendor-maris</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Lissodinium</i>	<i>Lissodinium schilleri</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Archaeoperidinium</i>	<i>Archaeoperidinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Peridinales	<i>Archaeoperidinium</i>	<i>Archaeoperidinium saanichi</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Gotoius</i>	<i>Gotoius excentricus</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Islandinium</i>	<i>Islandinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Peridinales	<i>Islandinium</i>	<i>Islandinium tricingulatum</i>
Dinophyta	Peridinales	<i>Thecadinium</i>	<i>Thecadinium kofoidii</i>
Dinophyta	Suessiales	<i>Ansanella</i>	<i>Ansanella</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Suessiales	<i>Ansanella</i>	<i>Ansanella granifera</i>
Dinophyta	Suessiales	<i>Biecheleria</i>	<i>Biecheleria</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Suessiales	<i>Biecheleria</i>	<i>Biecheleria cincta</i>
Dinophyta	Suessiales	<i>Biecheleriopsis</i>	<i>Biecheleriopsis adriatica</i>
Dinophyta	Suessiales	<i>Pelagodinium</i>	<i>Pelagodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Suessiales	<i>Pelagodinium</i>	<i>Pelagodinium bei</i>
Dinophyta	Suessiales	<i>Yihiella</i>	<i>Yihiella yeosuensis</i>
Dinophyta	Suessiales	<i>Symbiodinium</i>	<i>Symbiodinium</i> (neklasificirano)

Prilog 29. Novodetektirani taksoni u setu podataka sjevernog Jadrana dobiveni metodom metabarkodiranja - nastavak

Dinophyta	Suessiales	<i>Symbiodinium</i>	<i>Syndinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Suessiales	<i>Symbiodinium</i>	<i>Syndinium turbo</i>
Dinophyta	Syndiniales	<i>Amoebophrya</i>	<i>Amoebophrya</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Syndiniales	<i>Euduboscquella</i>	<i>Euduboscquella</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Syndiniales	<i>Ichthyodinium</i>	<i>Ichthyodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Syndiniales	<i>Hematodinium</i>	<i>Hematodinium</i> (neklasificirano)
Dinophyta	Thoracosphaerales	<i>Apocalathium</i>	<i>Apocalathium aciculiferum</i>
Dinophyta	Thoracosphaerales	<i>Brandtodinium</i>	<i>Brandtodinium nutricula</i>
Dinophyta	Thoracosphaerales	<i>Cryptoperidiniopsis</i>	<i>Cryptoperidiniopsis brodyi</i>
Dinophyta	Thoracosphaerales	<i>Paulsenella</i>	<i>Paulsenella vonstoschii</i>
Dinophyta	Thoracosphaerales	<i>Posoniella</i>	<i>Posoniella tricarineloides</i>
Dinophyta	Thoracosphaerales	<i>Stoeckeria</i>	<i>Stoeckeria algicida</i>
Dinophyta	Tovelliales	<i>Woloszynskia</i>	<i>Woloszynskia halophila</i>
Haptophyta	Pavlovaes	<i>Exanthemachrysis</i>	<i>Exanthemachrysis</i> (neklasificirano)
Haptophyta	Pavlovaes	<i>Pavlova</i>	<i>Pavlova</i> (neklasificirano)
Haptophyta	Pavlovaes	<i>Rebecca</i>	<i>Rebecca salina</i>
Haptophyta	Coccolithales	<i>Umbilicosphaera</i>	<i>Umbilicosphaera</i> (neklasificirano)
Haptophyta	Isochrysidales	<i>Dicrateria</i>	<i>Dicrateria</i> (neklasificirano)
Haptophyta	Isochrysidales	<i>Dicrateria</i>	<i>Dicrateria inornata</i>
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Chrysoculter</i>	<i>Chrysoculter</i> (neklasificirano)
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Chrysocampanula</i>	<i>Chrysocampanula spinifera</i>
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Haptolina</i>	<i>Haptolina</i> (neklasificirano)
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Imantonia</i>	<i>Imantonia</i> (neklasificirano)
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Imantonia</i>	<i>Imantonia rotunda</i>
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Prymnesium</i>	<i>Prymnesium</i> (neklasificirano)
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Prymnesium</i>	<i>Prymnesium neolepis</i>
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Prymnesium</i>	<i>Prymnesium palpebrale</i>
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Prymnesium</i>	<i>Prymnesium pienaarii</i>
Haptophyta	Prymnesiales	<i>Prymnesium</i>	<i>Prymnesium polylepis</i>
ostali Ochrophyta	Parmales	<i>Bolidomonas</i>	<i>Bolidomonas</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Parmales	<i>Bolidomonas</i>	<i>Bolidomonas mediterranea</i>
ostali Ochrophyta	Parmales	<i>Triparma</i>	<i>Triparma</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Parmales	<i>Triparma</i>	<i>Triparma pacifica</i>
ostali Ochrophyta	Chrysomeridales	<i>Chrysowaernella</i>	<i>Chrysowaernella hieroglyphica</i>
ostali Ochrophyta	Chromulinales	<i>Chrysoxys</i>	<i>Chrysoxys</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Chromulinales	<i>Oikomonas</i>	<i>Oikomonas</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Ochromonadales	<i>Ochromonas</i>	<i>Ochromonas</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Ochromonadales	<i>Ochromonas</i>	<i>Ochromonas distigma</i>
ostali Ochrophyta	Ochromonadales	<i>Spumella</i>	<i>Spumella</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Ochromonadales	<i>Spumella</i>	<i>Spumella danica</i>

Prilog 29. Novodetektirani taksoni u setu podataka sjevernog Jadrana dobiveni metodom metabarkodiranja - nastavak

ostali Ochrophyta	Ochromonadales	<i>Spumella</i>	<i>Spumella elongata</i>
ostali Ochrophyta	Ochromonadales	<i>Spumella</i>	<i>Spumella vulgaris</i>
ostali Ochrophyta	Paraphysomonadales	<i>Paraphysomonas</i>	<i>Paraphysomonas</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Paraphysomonadales	<i>Paraphysomonas</i>	<i>Paraphysomonas bandaiensis</i>
ostali Ochrophyta	Paraphysomonadales	<i>Paraphysomonas</i>	<i>Paraphysomonas butcheri</i>
ostali Ochrophyta	Paraphysomonadales	<i>Paraphysomonas</i>	<i>Paraphysomonas foraminifera</i>
ostali Ochrophyta	Paraphysomonadales	<i>Paraphysomonas</i>	<i>Paraphysomonas imperforata</i>
ostali Ochrophyta	Paraphysomonadales	<i>Paraphysomonas</i>	<i>Paraphysomonas segmenta</i>
ostali Ochrophyta	Dictyochales	<i>Vicicitus</i>	<i>Vicicitus globosus</i>
ostali Ochrophyta	Florenciellales	<i>Florenciella</i>	<i>Florenciella</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Florenciellales	<i>Florenciella</i>	<i>Florenciella parvula</i>
ostali Ochrophyta	Florenciellales	<i>Pseudochattonella</i>	<i>Pseudochattonella</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Florenciellales	<i>Pseudochattonella</i>	<i>Pseudochattonella farcimen</i>
ostali Ochrophyta	Florenciellales	<i>Pseudochattonella</i>	<i>Pseudochattonella verruculosa</i>
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Actinomonas</i>	<i>Actinomonas</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Apedinella</i>	<i>Apedinella radians</i>
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Helicopedinella</i>	<i>Helicopedinella tricostrata</i>
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Pedinella</i>	<i>Pedinella</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Pedinella</i>	<i>Pedinella squamata</i>
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Pseudopedinella</i>	<i>Pseudopedinella</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Pseudopedinella</i>	<i>Pseudopedinella elastica</i>
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Pteridomonas</i>	<i>Pteridomonas</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Pedinellales	<i>Pteridomonas</i>	<i>Pteridomonas danica</i>
ostali Ochrophyta	Rhizochromulinales	<i>Ciliophrys</i>	<i>Ciliophrys infusionum</i>
ostali Ochrophyta	Rhizochromulinales	<i>Rhizochromulina</i>	<i>Rhizochromulina</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Pelagomonadales	<i>Aureococcus</i>	<i>Aureococcus</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Pelagomonadales	<i>Aureococcus</i>	<i>Aureococcus anophagefferens</i>
ostali Ochrophyta	Pelagomonadales	<i>Pelagococcus</i>	<i>Pelagococcus subviridis</i>
ostali Ochrophyta	Pelagomonadales	<i>Pelagomonas</i>	<i>Pelagomonas calceolata</i>
ostali Ochrophyta	Sarcinochrysidales	<i>Aureoumbra</i>	<i>Aureoumbra</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Sarcinochrysidales	<i>Aureoumbra</i>	<i>Sarcinochrysidales</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Sarcinochrysidales	<i>Pelagospilus</i>	<i>Pelagospilus aureus</i>
ostali Ochrophyta	Sarcinochrysidales	<i>Sarcinochrysis</i>	<i>Sarcinochrysis</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Sarcinochrysidales	<i>Sarcinochrysis</i>	<i>Sarcinochrysis marina</i>
ostali Ochrophyta	Pinguiochrysidales	<i>Phaeomonas</i>	<i>Phaeomonas parva</i>
ostali Ochrophyta	Pinguiochrysidales	<i>Pinguiochrysis</i>	<i>Pinguiochrysis pyriformis</i>
ostali Ochrophyta	Pinguiochrysidales	<i>Polypodochrysis</i>	<i>Polypodochrysis teissieri</i>
ostali Ochrophyta	Parmales	<i>Triparma</i>	<i>Triparma</i> (neklasificirano)
ostali Ochrophyta	Parmales	<i>Triparma</i>	<i>Triparma pacifica</i>

Prilog 30. *Uzorci korišteni za izračun Multimetrijskog indeksa fitoplanktona s postaja terenskog uzorkovanja LTRV u kojima je udio dominantnog taksona >50%*

Godina	Mjesec	Postaja	Dubina	Razred	Takson	Učestalost (%)
2020	Srpanj	RV001	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	52,70
2020	Srpanj	RV004	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	67,10
2020	Srpanj	RV004	5m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	51,76
2020	Prosinac	RV004	20m	Dinophyceae	<i>Amoebophrya</i>	54,07
2020	Prosinac	RV004	5m	Dinophyceae	<i>Amoebophrya</i>	51,08
2021	Ožujak	RV004	5m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	50,54
2021	Srpanj	RV001	20m	Dinophyceae	<i>Heterocapsa</i>	55,18
2021	Srpanj	RV004	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	72,77
2021	Kolovoz	RV001	5m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	57,47
2021	Kolovoz	RV004	5m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	53,76
2022	Svibanj	RV001	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	50,85
2022	Lipanj	RV001	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium heterogrammum</i>	58,55
2022	Srpanj	RV001	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	62,98
2022	Srpanj	RV004	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	64,25
2022	Srpanj	RV004	5m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	68,95
2022	Kolovoz	RV001	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	55,99
2022	Kolovoz	RV001	5m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	51,52
2022	Kolovoz	RV004	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	75,55
2022	Listopad	RV001	5m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	66,08
2022	Studen	RV004	20m	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	57,96

8. ŽIVOTOPIS

Lana Grižančić rođena je 31.05.1992. godine u Puli. Osnovnu školu završava u Fažani, a nakon završetka opće gimnazije u Puli, 2011. godine upisuje preddiplomski studij Molekularne biologije, a kasnije 2014. i diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija bila je demonstrator na laboratorijskim praktikumima kolegija Zoologija, aktivno je sudjelovala u znanstveno-popularnim aktivnostima te je bila članica studentske sekcije za sport. Diplomski rad izrađuje u Laboratoriju za proteinsku dinamiku, Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković te 2018. godine stječe akademski stupanj magistre molekularne biologije. Na Institutu Ruđer Bošković zaposlena je početkom 2021. kao stručni suradnik na projektu *ADRICLIM Project; funded by Interreg IT HR programe*, a krajem iste godine i kao asistent u Laboratoriju za evolucijsku ekologiju Centra za istraživanje mora na projektu Hrvatske zaklade za znanost. Iste godine upisuje poslijediplomski studij Oceanologije na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prvi autor je jednog znanstvenog rada te koautor na još četiri. Sudjeluje na popularizaciji znanosti. Tijekom studija sudjeluje na tri međunarodna kongresa s jednim usmenim izlaganjem i dvije poster prezentacije te dvije međunarodne radionice.

9. ZNANSTVENA AKTIVNOST I PUBLIKACIJE

Objavljeni znanstveni radovi:

- Baričević, Ana; Marić Pfannkuchen, Daniela; Smolaka Tanković, Mirta; Knjaz, Mia; Vlašiček, Ivan; **Grižančić, Lana**; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin. Identification of the heterotrophic nanoflagellate *Bilabrum latius* in the southern Adriatic (Mediterranean Sea) // *European journal of protistology*, 90 (2023), 125999, 9. doi: 10.1016/j.ejop.2023.125999
- **Grižančić, Lana**; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela. A metabarcoding based (species) inventory of the northern Adriatic phytoplankton // *Biodiversity data journal*, 11 (2023), e106947, 50. doi: 10.3897/BDJ.11.e106947
- Baričević, Ana; Kogovšek, Tjaša; Smolaka Tanković, Mirta; **Grižančić, Lana**; Knjaz, Mia; Vlašiček, Ivan; Podolšak, Ivan; Kužat, Nataša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela. Coastal Eukaryotic Plankton Diversity of the Southern Adriatic as Revealed by Metabarcoding // *Diversity*, 16 (2024), 5; 293, 19. doi: 10.3390/d16050293
- Knjaz, Mia; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Kužat, Nataša; Vlašiček, Ivan; **Grižančić, Lana**; Podolšak, Ivan; Pfannkuchen, Martin; Kogovšek, Tjaša; Marić Pfannkuchen, Daniela. First regional reference database of northern Adriatic diatom transcriptomes // *Scientific reports*, 14 (2024), 16209, 18. doi: 10.1038/s41598-024-67043-4
- Vlašiček, Ivan; Marić Pfannkuchen, Daniela; Smolaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Kužat, Nataša; Knjaz, Mia; **Grižančić, Lana**; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin. Cluster analysis of long-term phytoplankton data from the Northern Adriatic reveals environmental influences and disruptions in seasonal patterns // *Frontiers in ecology and evolution*, 13 (2025), 1498307, 15. doi: 10.3389/fevo.2025.1498307

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima:

- Knjaz, Mia; Baričević, Ana; **Grižančić, Lana**; Vlašiček, Ivan; Podolšak, Ivan; Smodlaka Tanković, Mirta; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela. Molecular characterization of the northern Adriatic (Mediterranean Sea) diatom community - the comprehensive approach // Molecular Life of Diatoms 7, San Diego (CA), Sjedinjene Američke Države, 16.07.2023-20.07.2023
- Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Marić Pfannkuchen, Daniela; Knjaz, Mia; Vlašiček, Ivan; **Grižančić, Lana**; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin. Insights into the life strategies of marine diatoms from the genus *Chaetoceros* // Molecular Life of Diatoms 7, San Diego (CA), Sjedinjene Američke Države, 16.07.2023-20.07.2023
- Marić Pfannkuchen, Daniela; **Grižančić, Lana**; Baričević, Ana; Knjaz, Mia; Vlašiček, Ivan; Podolšak, Ivan; Smodlaka Tanković, Mirta; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin. The ecology of genetic diversity in the northern Adriatic Sea // Molecular Life of Diatoms 7, San Diego (CA), Sjedinjene Američke Države, 16.07.2023-20.07.2023
- Marić Pfannkuchen, Daniela; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Kužat, Nataša; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; **Grižančić, Lana**; Vrana, Ivna; Ujević, Ivana; Gašparović, Blaženka; Pfannkuchen, Martin. Genus *Pseudo-nitzschia*: The physiology of success in a highly structures and dynamic phytoplankton ecosystem // 20th International Conference on Harmful Algae, ICHA 2023 : HAB Science and Human Well-being, Hiroshima, Japan: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2023.
- Pfannkuchen, Martin; Baričević, Ana; Smodlaka Tanković, Mirta; Kužat, Nataša; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; **Grižančić, Lana**; Kogovšek, Tjaša; Marić Pfannkuchen, Daniela; The ecology of *Ostreopsis ovata* spreading along the rocky coast of the eastern Adriatic // 20th International Conference on Harmful Algae, ICHA 2023 : HAB Science and Human Well-being, Hiroshima, Japan: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2023.
- Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Smodlaka Tanković, Mirta; Baričević, Ana; Kogovšek, Tjaša; **Grižančić, Lana**; Podolšak, Ivan; Kužat, Nataša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela. Cluster analysis reveals different HAB-related species assemblages in the northern Adriatic // 20th International Conference on Harmful Algae, ICHA 2023 : HAB

Science and Human Well-being, Hiroshima, Japan: International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), 2023.

- Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Marić Pfannkuchen, Daniela; Kogovšek, Tjaša; **Grižančić, Lana**; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Hervat, Martina; Pfannkuchen, Martin; Brijuni National Park (Adriatic Sea, Croatia) phytoplankton biodiversity assessment // "Scientific Opportunities for a Global Algal Revolution" : 8th European Phycological Congress, Brest: Federation of European Psychological Societies (FEPS), 2023.
- **Grižančić, Lana**; Baričević, Ana; Marić Pfannkuchen, Daniela; Smolaka Tanković, Mirta; Kogovšek, Tjaša; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Pfannkuchen, Martin. A metabarcoding based (species) inventory of the northern Adriatic phytoplankton // "Scientific Opportunities for a Global Algal Revolution" : 8th European Phycological Congress, Brest: Federation of European Psychological Societies (FEPS), 2023.
- Knjaz, Mia; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Kužat, Natasa; Vlašiček, Ivan; **Grižančić, Lana**; Podolšak, Ivan; Pfannkuchen, Martin; Kogovšek, Tjaša; Marić Pfannkuchen, Daniela. First regional reference database of northern Adriatic diatom transcriptomes // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 75, S1, 2024. str. 32-32
- Pfannkuchen, Martin; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; **Grižančić, Lana**; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Marić Pfannkuchen, Daniela. Genomics in coastal oceanography // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 75, S1, 2024. str. 79-79
- **Grižančić, Lana**; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela. Marine environmental DNA metabarcoding for northern Adriatic phytoplankton monitoring // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 75, S1, 2024. str. 128-128
- **Grižančić, Lana**; Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Kogovšek, Tjaša; Pfannkuchen, Martin; Marić Pfannkuchen, Daniela; Net or Niskin: sampling method most suitable for the northern Adriatic phytoplankton monitoring // AquaEcOmics meeting: exploring aquatic ecology through omics. March 17-20, 2025.
- Baričević, Ana; Smolaka Tanković, Mirta; Marić Pfannkuchen, Daniela; Kogovšek, Tjaša; **Grižančić, Lana**; Vlašiček, Ivan; Knjaz, Mia; Podolšak, Ivan; Pfannkuchen, Martin. Omics in the service of characterising the eukaryotic plankton community in the Adriatic Sea // AquaEcOmics meeting: exploring aquatic ecology through omics. March 17-20, 2025.