

AKTIVNOST ALKALNE FOSFATAZE U JUŽNOM JADRANU



Disertacija je izrađena pod mentorstvom dr. sc. Marine Carić, više znanstvene suradnice u Institutu za more i priobalje Sveučilišta u Dubrovniku.

Doktorska disertacija je obranjena 22. svibnja 2013. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

- dr. sc. Ingrid Ivančić, viši znanstveni suradnik, Institut „Ruđer Bošković“, Centar za istraživanje mora (predsjednica);
- dr. sc. Mirjana Najdek Dragić, Institut „Ruđer Bošković“, Centar za istraživanje mora (članica);
- doc. dr. sc. Zrinka Ljubešić, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu (članica).

Dr. sc. Enis Hrustić, dipl. ing. bioteh.

ŽIVOTOPIS

Enis Hrustić je rođen 25. siječnja 1978. u Dubrovniku, gdje je maturirao u Općoj gimnaziji. Dobitnik je 1. nagrade iz predmeta geografija za učenike trećih razreda srednjih škola u Republici Hrvatskoj. Dodiplomski studij biotehnologije (biokemijsko inženjerstvo) na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (1996. – 2005.) završio je diplomskim radom „Elektrokemijsko određivanje polifenola u vinima“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Božidara Grabarića. Tijekom studiranja sudjelovao je na međunarodnom projektu biološke obrade otpadnih voda farmaceutskih industrija iz Hrvatske i Europske unije u suradnji Ekološkog inženjeringu d.o.o. iz Poreča i Laboratorija za biološku obradu otpadnih voda Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Margarete Glancer - Šoljan u periodu od 1. 11. 2001. do 1. 3. 2002.

Od 1. travnja 2006. do 14. prosinca 2006. bio je zaposlenik Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko - neretvanske županije u Higijensko - analitičkom laboratoriju, gdje se bavio kemijsko-mikrobiološkim analizama uzoraka otpadnih voda, voda za piće, mora za kupače te hotelskih i javnih bazena za rekreatciju.

Od 15. 12. 2006. zaposlen je na Institutu za more i priobalje Sveučilišta u Dubrovniku kao znanstveni novak, a Doktorski studij Oceanologije na Geološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu upisao je 16. travnja 2007. Tijekom izrade doktorata specijalizirao se u analizi nutrijenata i aktivnosti alkalne fosfataze u vodenim sustavima. Sudjelovao je u više domaćih i međunarodnih radionica i kongresa te u publiciranju dva znanstvena članka citirana u bazi Current Contents.

Trenutno je zaposlen kao znanstveni novak – viši asistent na Sveučilištu u Dubrovniku (Institut za more i priobalje) te sudjeluje na projektima: 1. Struktura planktonskih populacija u trofičkom gradijentu u južnom Jadranu (MZOS RH, voditelj dr. sc. Mirna Batistić, viši znanstveni suradnik, Institut za more i priobalje Sveučilišta u Dubrovniku) i 2. Prevencija onečišćenja mora zajedničkim djelovanjem – JASPPer – EU/IPA projekt iz komponente II (Prekogranična suradnja), Mjera 1.1. (Zajedničke mjere za zaštitu okoliša, prirode i kulturne baštine) u suradnji s Hrvatskim hidrografskim institutom (Split) i partnerskim institucijama u Crnoj Gori.

PRIKAZ RADA

Rad je napisan na 131 stranici, sadrži 74 slike, 33 tablice i 221 literaturni navod. Sastoji se od deset poglavlja.

U prvom poglavlju „Uvod“ opisana su svojstva i uloga alkalne fosfataze (AF) u vodenim ekosustavima. Izložen je pregled istraživanja aktivnosti alkalne fosfataze (AAF) u moru i estuarijima. Objasnjeni su ciljevi i hipoteze istraživanja AAF-a u južnom Jadranu, kao i strategije prevladavanja P - limitacije rasta fitoplanktona.

Fosfor (P) čini 2 - 4 % suhe tvari živog svijeta te je neophodan u ishrani svih živih bića kako za rast i prijenos energije, tako i za biošku produkciju u vodenim ekosustavima. U estuarijima i obalnom moru dostupnost reaktivnog P, tj. otopljenog ortofosfata PO_4^{3-} (PO_4) je često smanjena zbog velikog afiniteta adsorpcije na čestice aluminijevih i željeznih oksida. P se smatra glavnim limitirajućim elementom rasta primarnih proizvođača u slatkovodnim ekosustavima, dok je u priobalnim i otvorenim morima potvrđena kako P tako i N - limitacija. Geokemija P je gotovo neovisna o atmosferi, dok je donos dušikovih spojeva atmosferom u vodene sustave značajniji. N_2 se dodatno uvodi u vodene sustave diazotrofnom aktivnošću cijanobakterija. Otopljeni organofosforni spojevi (DOP) mogu biti dio ishrane fitoplanktona, no PO_4 je preferirani izvor P. Fitoplankton u uvjetima nedostatka P inducira sintezu fosfataza, čijim djelovanjem na membrani i u vanstaničnom prostoru posjepuje unos i dobavu PO_4 iz fosfomonoestera (FME).

AAF fitoplanktona reguliraju koncentracija PO_4 , bioška dostupnost DOP, međudjelovanje fitoplanktona i bakterija, UV-B inhibicija, unutarstanični sadržaj polifosfata i N/P omjer, promjene pH i temperature te omjer vanstaničnih izvora otopljenog ukupnog anorganskog dušika i ortofosfata (TIN/ PO_4). Pored defosforilacije FME, ekstracelularna AF ima važnu ulogu pri unosu Na, K, tiamina i PO_4 u stanicu te je nerealno očekivati potpuni izostanak fosfatazne aktivnosti u vodenim ekosustavima.

AAF bakterija je povezana i s dobavom organskog ugljika i dušika, što ih čini manje pouzdanim indikatorom P statusa mikrobnih zajednica. Značajna količina AF bakterija smještena je u periplazmatskom prostoru, pa su relativno postojanje i otpornije na okolišne promjene, a ujedno iskazuju i veću aktivnost od fitoplanktona pri manjim koncentracijama FME, tj. AF pikoplanktona imaju veći afinitet (manji K_m) za FME od AF nanofitoplanktona i mikrofitoplanktona. Budući da nukleotidi i većina fosforiliranih organskih spojeva ne prolaze citoplazmatsku membranu, regeneracija P je uglavnom ekstracelularni proces. Otpuštanje enzima s membrane u otopljenu fazu nije energetski povoljno, ali povećava doseg djelovanja enzima i dobavu PO_4 . Obzirom na višestruku ulogu AF i miješano podrijetlo enzima u slobodnoj fazi, P - limitaciju fitoplanktona lakše je razmatrati iz mjerjenja partikulatne AAF (organizmi u frakciji mora $> 0.2 \mu\text{m}$) u odnosu na biomasu organizama, tj. specifičnu AAF (AAF/biomasa), jednostavnije sAAF.

Fitoplanktonske zajednice prilagođavaju se P - limitaciji višestrukim strategijama. Jedna od najlakše uočljivih posljedica limitacije nutrijentima je dominacija manjih organizama

većeg omjera površina/volumen. Pri malim koncentracijama najbrže uzimanje PO_4 bilježi se u manjem fitoplanktonu i bakterioplanktonu. U pikocijanobakterijama, osim povećanog omjera površina/volumen, induktivne sinteze AF pri niskim koncentracijama PO_4 i velikog afiniteta uzimanja PO_4 , zabilježena je induktivna sinteza PO_4 - vezujućeg proteina i njegovo pozicioniranje u staničnu membranu kada je vanstanična koncentracija $\text{PO}_4 < 0.05 \mu\text{M}$. Ponekad iznenadjuće veliki rast većeg fitoplanktona tijekom limitacije nutrijentima pokušava se objasniti kompromisom između kompeticijskih sposobnosti uzimanja nutrijenata i razvoja većih stanica s relativno nepromijenjenim potrebama za nutrijentima (npr. dijatomeje s velikim vakuolama) kako bi se izbjegao status plijena. Fitoplankton može smanjiti potrebe za P i do 50 % u uvjetima P - limitacije. Jedna od najinteresantnijih prilagodbi je zamjena fosfora u fosfolipidnim membranama nefosfornim spojevima sličnih ionskih karakteristika. Premda fosfonati čine oko 25 % DOP, njihov udio u ukupnom P sadržaju fitoplanktona i tonućih čestica je svega nekoliko %. Zbog veće stabilnosti fosfonatne C-P nego esterske C-O-P veze, fosfonati su donedavno smatrani bioški nedostupnima. Međutim, bakterijska C-P liazna djeluje na prirodnim i sintetičkim organofosfornim supstratima, čak i na toksičnim herbicidima i pesticidima. U morskom fitoplanktonu dokazano je kodiranje C-P liazne samo u *Trichodesmium erythraeum* IMS101. Zalihe P i energije su značajno pohranjene u staničnim polifosfatima. Kapacitet fitoplanktona u pohrani polifosfata je velik nakon izglađnjivanja, pri čemu sadržaj polifosfata može doseći i do 50 % ukupnog P - sadržaja stanica. Kada stanični sadržaj polifosfata padne ispod 10 % od ukupnog P sadržaja stanice, dolazi do induktivne sinteze AF.

U ekstremno oligotrofnim okolišima fitoplankton može biti izložen snažnom ograničenju rasta, tj. „fiziološkoj limitaciji“ (npr. nedostatna sinteza DNA), dok značajan rast fitoplanktona podržan povremenim pulsevima limitirajućih nutrijentima odgovara tzv. „sustavnoj limitaciji“.

U južnom Jadranu se redovno bilježe koncentracije $\text{PO}_4 < 0.2 \mu\text{M}$, a istraživanje je obavljeno s ciljem utvrđivanja razlika sAAF pikoplanktona (sAAFP), sAAF nanofitoplanktona (sAAF-nf) i sAAF mikrofitoplanktona (sAAFMf) uz procjenu vremenske postojanosti P - limitacije u različitim područjima južnog Jadrana: visokostratificirani estuarij Omble, obalno more kod Lokruma, otvoreno more Južnojadranske kotline (P-1200), Veliko jezero (VJ) i Malo jezero (MJ) na Mljetu s kontrolnom postajom u Uvali Gonoturska. Mjerenja AAF u južnom Jadranu temperaturno su korigirana kako bi se mogla uspoređivati s potencijalnim AAF iz istraživanja susjednih i udaljenih mora pri ambijentalnim temperaturama.

Prepostavljeni eksponencijalni rast sAAF fitoplanktona pri niskim koncentracijama PO_4 , omogućio je fino razlučivanje intenziteta induktivne sinteze AF fitoplanktona i uočavanje graničnih koncentracija PO_4 pri smanjenju kojih nastupa brzi rast sAAF fitoplanktona za svako područje istraživanja. U sustavima s postojanjem P - limitacijom rasta fitoplanktona očekuje se značajna aktivnost vezane i slobodne AF, kao i pozitivna korelacija među njima. U prethodnom istraživanju AAF u Mljetskim jezerima (listopad 2006. i ožujak 2007.) us-

postavljena je hipoteza o važnoj ulozi koralja *Cladocora caspitosus* pri uzimanju fitoplanktona iz površinskih struja na ulazu u VJ, čime se potencijalno smanjuje AAF i koncentracija Chl *a* uz preuzimanje viška PO₄ s koraljnog grebena strujama u oba smjera. Prema jednom od rijetkih detaljnih istraživanja godišnjeg obrasca strujanja u Mljetском akvatoriju iz 1990. – 1991. očekivala se značajno manja AAF i koncentracija Chl *a* na postaji Vrbovačka (VJ) u prijelaznim sezonomama (proleće i jesen).

U drugom poglavlju „Područja istraživanja“ prikazane su geografske pozicije postaja, učestalost uzorkovanja unutar jednogodišnjih perioda na pojedinim postajama te su izložene opće karakteristike odabranih područja uz osvrт na pret-hodna istraživanja.

U trećem poglavlju "Metode i materijali" detaljno su opisani: uzorkovanje, filtracija mora za određivanje AAF i koncentracije Chl *a* u veličinskim frakcijama fitoplanktona, određivanje AAF, fluorimetrijsko određivanje koncentracije Chl *a*, procjena biomase nanofitoplanktona i mikrofitoplanktona, određivanje abundancije i procjena biomase pikoplanktona korištenjem epifluorescentnog mikroskopa, izvedba eksperimentata za određivanje vremena regeneracije PO₄ putem partikulatne AAF, tehnika Hanes – Woolf (HW) linearizacije Michaelis – Menten (MM) kinetike, izvedba grafa oligotrofnog kapaciteta za uzorce u kojima je procijenjeno vrijeme regeneracije PO₄, izvedba testa nekonkurentne inhibicije otopljene AF u estuariju Omble, upotreba CTD sonde (salinitet, temperatura, dubina, reducirana gustoća), korištenje Secchi ploče za određivanje dubine fotičkog sloja, određivanje trofičkog statusa putem izračuna TRIX indeksa, metode određivanja koncentracija hranjivih soli, određivanje koncentracije i zasićenja otopljenog kisika, testiranje prirode distribucije glavnih varijabli istraživanja, upotreba Pearson i Spearman Rank testova korelacije te Fisher i SNK testova pri analizi varijanci nizova podataka između postaja ili sezona na pojedinim postajama.

U četvrtom poglavlju „Rezultati“ prikazani su i objašnjeni eksperimentalni temelji metode spektrotometrijskog određivanja potencijalne AAF: baždarni pravac koncentracija p-nitrofenola, zasićenost ($S_0 \gg K_m$) supstratom (p-nitrofenil-fosfat *p*-NPP) tijekom trajanja reakcije (8 – 24 h) pri 37 °C (AAF kao relativna mjera količine enzima), stabilnost aktivnosti i ovisnost o temperaturi modelnog enzima „alkaline phosphatase from calf intestine“ (Roche), što je iskorišteno za temperaturne korekcije AAF, ali i za masenu normalizaciju sAAF pojedinih veličinskih kategorija planktona.

Vrijeme regeneracije PO₄ koje pripada AAF vezanih enzima u Mljetском akvatoriju procijenjeno je u rujnu 2010. (dubina 5 m), dok je za ostale postaje isto napravljeno u veljači 2012. (dubina 5 m). Za procjenu vremena regeneracije PO₄ upotrebljene su konstante poluzasićenja K_m (supstrat *p*-NPP) i maksimalne brzine enzimske hidrolize V_{maks} nakon HW linearizacije MM kinetike. Vrijeme regeneracije PO₄ jednako je K_m/V_{maks}. Na postajama Mljetskog akvatorija tijekom stratifikacije eufotskog sloja, vrijeme regeneracije PO₄ koje pripada partikulatnoj AAF ukazalo je na zadovoljavajući P status planktona. Dugo vrijeme regeneracije PO₄ u VJ možda je djelomič-

no posljedica P i N kolimitacije rasta fitoplanktona. Zimi u izmiješanom vodenom stupcu procijenjen je zadovoljavajući P status planktona na postaji Lokrum, P-1200 i u estuariju Omble, iako koncentracije PO₄ upućuju na P – limitaciju. Obzirom na 10 puta veći srednjak ukupne AAF ljeti u odnosu na zimu (P-1200), vrijeme regeneracije PO₄ koje pripada AAF u eufotskom sloju otvorenog mora ljeti vjerojatno je kraće od 2 h i ukazuje na P – limitaciju rasta fitoplanktona.

Koncentracija PO₄ značajno je limitirala rast fitoplanktona. Nisu detektirane statistički značajne ($p < 0.05$) razlike koncentracije PO₄ među postajama, no i male razlike su značajno utjecale na razvoj biomase pikoplanktona, nano-fitoplanktona i mikrofitoplanktona. Pri najvećim koncentracijama PO₄ razvila se najveća biomasa fitoplanktona u MJ. Pri najmanjim koncentracijama PO₄ zabilježena je najmanja biomasa fitoplanktona u Južnojadranskoj kotlini. Biomasa pikoplanktona dominirala je nad biomasom fitoplanktona. Nano-fitoplankton je imao veću biomasu od mikrofitoplanktona. Biomasm pikoplanktona dominirale su cijanobakterije. Maksimalni godišnji srednjak biomase cijanobakterija zabilježen je u VJ.

Prikazan je odnos sAAF fitoplanktona u frakciji 2 – 53 µm (sAAFF) prema sAAFP na skupnim podatcima cijelog istraživanja, kao i granična koncentracija PO₄, pri čijem padu je na svakoj postaji utvrđen nagli rast sAAFF. Prikazani su odnosi biomase fitoplanktona i pikoplanktona pri kojima dolazi do brzog rasta sAAFF, kao i srednjaci svih važnih parametara unutar četiri raspona koncentracije PO₄ (< 0.05 µM, 0.05 – 0.1 µM, 0.1 – 0.2 µM i 0.2 – 0.5 µM). Biomasa fitoplanktona bila je snižena pri koncentraciji PO₄ < 0.1 µM. S porastom biomase fitoplanktona zabilježen je stalni pad sAAFF. Najizuzitiji rast sAAFF je zabilježen pri 20 i više puta većoj biomasi pikoplanktona od biomase fitoplanktona. Kada je biomasa fitoplanktona u frakciji 2 – 53 µm bila ~ 5 µg C/L i manja, zabilježene su najveće sAAFF.

Koncentracija PO₄ bila je važna za regulaciju sinteze AF. Pri koncentraciji PO₄ < 0.05 µM zabilježeni su maksimumi sAAFP, sAAFnF i sAAFmf. Uz povećanje koncentracije PO₄ od < 0.05 µM do 0.05 – 0.1 µM utvrđen je prijelaz prema smanjenju sintezi AF fitoplanktona. Pri koncentraciji PO₄ 0.1 – 0.2 µM događao se najznačajniji rast biomase fitoplanktona uz linearni rast AAF, ali i pad sAAFF. Pri koncentracijama PO₄ 0.2 – 0.5 µM zabilježen je snažni pad biomase fitoplanktona i nagli porast sAAFF. Veće stanicice fitoplanktona koje su preživjele predaciju vjerojatno su značajno doprinijele rastu sAAFF, budući da im i relativno visoke koncentracije PO₄ ne reprimiraju sintezu AF. Pri najvećim koncentracijama PO₄ povećao se udio AAF frakcije > 53 µm u ukupnoj AAF s potencijalnim doprinosom velikih stanica fitoplanktona i kopepoda koji su vjerojatno bili najodgovorniji za pad biomase fitoplanktona u frakciji 2 – 53 µm. Ukupna AAF je opadala s rastom PO₄, a povećavao se udio AAF slobodnih enzima u ukupnoj AAF.

TIN/PO₄ nije pokazao jasnou ulogu u regulaciji sinteze AF fitoplanktona, dok su unutarstanični omjer N/P, sastav planktonske zajednice, potrebe za P i razina staničnih rezervi energetski bogatih polifosfata vjerojatno bile mnogo važniji regulatorni parametri ekspresije AF.

RastAAF slobodnih enzima prema biomasi planktona manjeg od 53 µm je opadao kako se biomasa fitoplanktona približavala izjednačenju s biomasom pikoplanktona. U području dominacije biomase fitoplanktona nad pikoplanktonom nije pronađena značajna korelacijaAAF slobodnih enzima prema biomasama pojedinih planktonskih skupina. Područje dominacije biomase pikoplanktona, odnosno limitacije rasta fitoplanktona popraćeno je većim otpuštanjem AF u otopljenu fazu. Za južni Jadran vrijedi da su visokeAAF slobodnih enzima detektirane kada je zajednička biomasa pikoplanktona i fitoplanktona u veličinskoj frakciji 2 – 53 µm iznosila ~ 70 µg C/L ili manje. Navedena granica odgovara biomasi fitoplanktona \leq 35 µg C/L, tj. koncentraciji Chl a \leq 0.7 µg/L u veličinskoj frakciji 2 – 53 µm.

Južnojadranska kotlina je karakterizirana najmanjim koncentracijama PO₄³⁻, najvećim omjerom Porg/PO₄³⁻, najvećom sAAFP, najmanjom biomasom fitoplanktona i najvećomAAF slobodnih enzima prema biomasi planktona frakcije 0.2 – 53 µm, što ukazuje na najpostojaniju P – limitaciju rasta fitoplanktona. Na obalnim postajama (Lokrum i Gonoturska) uočen je značajni potencijal P i N limitacije rasta fitoplanktona tijekom proljeća i ljeta.

Južni Jadran je oligotrofno more s umjerenom eutrofikacijom u dubokim slojevima MJ (dublje od 20 m) i VJ (dublje od 35 m) te u površinskom sloju estuarija Omble uz povećani protok rijeke zimi. U MJ (dublje od 25 m) i VJ (dublje od 40 m) detektirana je postojana jesenska hipoksija, tj. koncentracija otopljenog kisika < 2.8 mg/L. U MJ hipoksija se pojavila i ljeti. Lokrum je prema indeksu TRIX bio najoligotrofnija postaja uz pojedinačne maksimume sAAFnF i sAAFmf (ljeto 2011., dubina 5 – 10 m) te najveći godišnji srednjak sAAFF.

Uklanjanje fitoplanktona iz struja koje prelaze preko koraljnog grebena, uz najveće vrijednosti zbroja koncentracija PO₄³⁻ i Porg (neotopljeni anorganski, neotopljeni i otopljeni organski P spojevi) na postaji Vrbovačka, vjerojatno su glavni razlozi minimuma Chl a , ukupneAAF i biomase cijanobakterija u jesen uz očekivane najbrže površinske struje u Mljetskom akvatoriju. To je ujedno objašnjenje manje biomase fitoplanktona u VJ u odnosu na MJ kako u jesen tako i na razini cijele godine.

Usporavanje izmjene voda u poluzatvorenim obalnim sustavima može povoljno djelovati na dulje zadržavanje nutrijenata i značajniji rast fitoplanktona, što se pokazalo točnim za MJ i VJ ljeti te estuarij Omble u proljeće. Na tim postajama se razvila najveća biomasa fitoplanktona uz najveći udioAAF planktona > 53 µm u ukupnojAAF. U stratificiranom površinskom sloju estuarija Omble, uz usporen tok rijeke u proljeće razvio se najveći omjer partikulatneAAF iAAF slobodnih enzima. U estuariju Omble nije dokazana nekonkurentna inhibicija slobodnih enzima.

Tijekom ljetne stratifikacije eufotskog sloja temperaturno korigirane sAAFF (Lokrum i P-1200) (površinski sloj do 20 m) bile su veće od srednjaka sAAFF fitoplanktona u sjevernom Jadranu. Maksimalna zabilježena sAAFnF u sjevernom Jadranu bila je ~ 560 % veća nego u južnom Jadranu, dok je mak-

simalna zabilježena sAAFmf u južnom Jadranu bila ~ 34 % veća od maksimalne sAAFF mikrofitoplanktona u sjevernom Jadranu. Estuarij Omble je imao značajno manju maksimalnu sAAFF nego obalno more koje graniči s estuarijem Zrmanje. Južni Jadran je imao manje sAAFP nego sjeverni Jadran, što je vjerojatno povezano s većom primarnom produkcijom u sjevernom Jadranu. Južni Jadran je imao veće sAAFF tijekom zime nego istočni Mediteran i veće sAAFF tijekom stratifikacije eufotskog sloja od zapadnog Mediterana i Crvenog mora. P-1200 i postaja Lokrum imale su veće srednjake sAAFF od brojnih mora i oceana. Jesenske vrijednosti sAAFF fitoplanktona u jugozapadnom suptropskom Atlantiku bile su veće od odgovarajućih sezonskih srednjaka sAAFF u južnom Jadranu. Postaje Mljetskog akvatorija pokazale su općenito male sAAFF i sAAFP, što je ukazalo na relativno povoljan P status u odnosu na ostala istražena područja. U VJ ljeti opažena je 236 puta veća sAAFP i 21.6 puta veća sAAFF u odnosu na zimu. Temperaturno korigirani godišnji srednjak sAAFP bio je najveći u estuariju Omble za razliku od srednjaka pri 37 °C (maksimum na P-1200). sAAFF u MJ (dubina 0 – 20 m) bila je značajno ($p < 0.05$) veća u ožujku 2010. nego u prethodnom istraživanju u ožujku 2007.

sAAFF veličinskih frakcija planktona izražene su i kao masa modelnog enzima/biomasa planktona. sAAFnF je bila veća od sAAFmf i sAAFP na svim postajama. U prosjeku nanofitoplankton je imao 8 puta više AF prema svojoj biomasi nego pikoplankton i 3 puta više nego mikrofitoplankton. Nalaz je vjerojatno povezan s većom dostupnom površinom membra na za smještanje enzima u odnosu na pripadni volumen, što je nanofitoplanktonu osiguralo kompeticijsku prednost nad mikrofitoplanktonom u oligotrofnom južnom Jadranu. Pikoplankton je imao zadovoljavajući P status.

U petom poglavlu „Rasprava“ izneseno je opažanje o relativno nepromijenjenoj biomasi fitoplanktona na postaji Vrbovačka u VJ kao potencijalnoj posljedici suprotnih efekata ishrane *Aurelia sp.* i koralja *Cladocora caespitosa*. Naime, *Aurelia sp.* predacijom nad kopeopodima i vertikalnim dnevnim gibanjem indirektno pozitivno utječe na biomasu fitoplanktona, dok *Cladocora caespitosa* u neposrednoj blizini postaje Vrbovačka može značajno uklanjati fitoplankton iz struja koje prelaze preko koraljnog grebena. Složenost trofičkog lanca u VJ mogla je doprinjeti usporenom kruženju fosfora uz N i P kolimitaciju rasta fitoplanktona u rujnu 2010.

U šestom poglavlu „Zaključci“ naglašava se da je fitoplankton u južnom Jadranu značajnije P – limitiran u odnosu na sjeverni Jadran i brojna susjedna i udaljena mora. Tek u nekim oceanskim područjima tijekom proljeća zabilježene su veće sAAFF nego u južnom Jadranu. Manje sAAFF fitoplanktona nekih oceanskih područja u odnosu na Lokrum i P-1200 mogu biti odraz limitacije nekim drugim elementom, npr. N, a ne samo P, ali i posljedica dobre adaptacije oceanskog fitoplanktona na dugoročnu izloženost siromašnim izvorima nutrijenata.

Ostala poglavља su: 7. Popis kratica; 8. Literatura; 9. Popis znanstvenih članaka; 10. Životopis. ■