

# Detaljna analiza bakterijske raznolikosti Jadranskog mora

---

**Korlević, Marino**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:824584>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
GEOLOŠKI ODSJEK

Marino Korlević

**DETALJNA ANALIZA BAKTERIJSKE  
RAZNOLIKOSTI JADRANSKOGA MORA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF GEOLOGY

Marino Korlević

# **IN-DEPTH ANALYSIS OF THE ADRIATIC SEA BACTERIAL DIVERSITY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
GEOLOŠKI ODSJEK

Marino Korlević

**DETALJNA ANALIZA BAKTERIJSKE  
RAZNOLIKOSTI JADRANSKOGA MORA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Sandi Orlić

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF GEOLOGY

Marino Korlević

# **IN-DEPTH ANALYSIS OF THE ADRIATIC SEA BACTERIAL DIVERSITY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: dr. sc. Sandi Orlić

Zagreb, 2015

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za morsku mikrobnu ekologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković, Rovinj, pod vodstvom dr. sc. Sandija Orlića, u sklopu Interdisciplinarnog doktorskog studija iz oceanologije pri Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Dr. sc. Sandiju Orliću, mentoru, zahvaljujem na ukazanom povjerenju te podršci, poticaju, savjetima i pomoći tijekom izrade doktorskog rada.

Dr. sc. Mirjani Najdek Dragić, voditeljici Laboratorija za morsku mikrobnu ekologiju, zahvaljujem na ukazanom povjerenju i podršci tijekom izrade doktorskog rada te na pomoći prilikom statističke obrade podataka.

Prof. dr. sc. Rudolfu Amannu zahvaljujem na kritičkom čitanju rada o južnom Jadranu te na pruženoj prilici za boravak i rad na Max Planck institutu za morsku mikrobiologiju u Bremenu.

Zahvaljujem se članovima povjerenstva, prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perica, doc. dr. sc. Zrinki Ljubešić i dr. sc. Mirjani Najdek Dragić na kritičkom čitanju rada te na korisnim i konstruktivnim savjetima.

Hvala kolegama iz Laboratorija za morsku mikrobnu ekologiju, Paolu P., Tini, Kseniji, Dragici, Ingrid i Mariji, na susretljivosti, savjetima i pomoći tijekom izrade rada. Puno hvala Ingrid na pomoći prilikom grafičke obrade podataka.

Dr. sc. Petri Pop Ristovoj zahvaljujem na pomoći u upoznavanju sa statističkim metodama te na podršci prilikom statističke obrade podataka.

Dr. sc. Renzu Kottmannu i prof. dr. sc. Franku Oliveru Glöckneru zahvaljujem na pomoći u upoznavanju s programima za analizu podataka dobivenih 454 sekvenciranjem, na analizi podataka SILVAngs softverom te na pruženoj prilici za boravak i rad u Grupi za genomiku mikroorganizma i bioinformatiku Max Planck instituta za morsku mikrobiologiju u Bremenu.

Dr. sc. Bernhardu Fuchs zahvaljujem na pomoći i savjetima u upoznavanju s molekularnim metodama u mikrobnj ekolojiji te na dizajnu sonde za CARD-FISH.

Dr. sc. Petri Pjevac zahvaljujem na pomoći, susretljivosti, korisnim savjetima i temperamentnim raspravama.

Dr. sc. Dannyu Ionescu i dr. sc. Mini Bižić-Ionescu zahvaljujem na pomoći i susretljivosti prilikom boravka na Max Planck institutu za morsku mikrobiologiju.

Kolegama iz Instituta za more i priobalje Sveučilišta u Dubrovniku zahvaljujem na susretljivosti i pomoći prilikom uzorkovanja te na oceanografskim podacima iz južnog Jadrana.

Dr. sc. Zrinki Ljubešić, dr. sc. Jorijntje Henderiks i dr. sc. Hrvoju Mihanoviću zahvaljujem na mogućnosti uzorkovanja estuarija rijeke Krke, na susretljivosti i pomoći prilikom uzorkovanja te na oceanografskim podacima estuarija.

Kolegama iz Laboratorija za procese u ekosustavu mora zahvaljujem na oceanografskim podacima sjevernog Jadrana.

Kapetanima i posadama istraživačkih brodova Naše more, Hidra i Vila Velebita zahvaljujem na susretljivosti i pomoći prilikom uzorkovanja.

Hvala svim kolegama iz Centra za istraživanje mora! Hvala Ani, Emini, Ines, Barbari, Sandi, Mirti, Danieli, Jeleni, Petri, Vidi, Ugu, Vedrani, Loreni, Ljiljani, Jasni, Giti, Paolu K. i Martinu na zajedničkim druženjima, raspravama i pomoći.

Hvala svim mojim prijateljima!

Puno hvala mami, tati i bratu na pomoći i podršci tijekom svih godina školovanja!

## DETALJNA ANALIZA BAKTERIJSKE RAZNOLIKOSTI JADRANSKOGA MORA

Marino Korlević

Laboratorij za morsku mikrobnu ekologiju, Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer  
Bošković, G. Paliage 5, Rovinj

### Sažetak

Bakterije u morskim ekosustavima predstavljaju morfološki, genetički te funkcionalno vrlo raznovrsnu skupinu mikroorganizama. Primjenom 454 pirosekvenciranja gena za 16S rRNA i fluorescencijske *in situ* hibridizacije kataliziranim taloženjem reportera određena je sezonska dinamika bakterijskih zajednica u otvorenom moru južnog i sjevernog Jadrana, te estuarija rijeke Krke. Brojnost bakterijskih operativnih taksonomskih jedinica i struktura zajednice u svim istraživanim područjima bile su pod utjecajem hidrografskih uvjeta. U južnom Jadranu snažan utjecaj imale su zimsko duboko miješanje vodenog stupca i ingresija Levantinske intermedijarne vode, u sjevernom Jadranu sezonski uvjeti okoliša te protok rijeke Po, a u estuariju rijeke Krke protok rijeke i snažan gradijent saliniteta. Prokariotskim pikoplanktonskim zajednicama Jadranskoga mora dominira klad SAR11 čiji je udio u zajednici bio najveći u oligotrofnom području južnog Jadrana. Razred *Betaproteobacteria* pojavljivao se u područjima pod utjecajem riječne vode. Predstavnici koljena *Actinobacteria* pojavljivali su se u svim istraživanim područjima, međutim jedino im je u riječnoj vodi estuarija rijeke Krke brojnost bila povećana sa snažno izraženom sezonalnošću. Morske skupine NS4 i NS5 koljena *Bacteroidetes* uz klad SAR86 razreda *Gammaproteobacteria* identificirane su kao podskupine koje su se pojavljivale tijekom fitoplanktonskih cvatova u svim istraživanim područjima. Cijanobakterijske zajednice Jadranskog mora činili su tipični morski rodovi *Synechococcus* i *Prochlorococcus*. Povećana prisutnost roda *Prochlorococcus* detektirana je jedino u južnom Jadranu dok je u sjevernom Jadranu dominirao rod *Synechococcus*. Tipične dubokooceanske skupine SAR324, SAR202 i SAR406 uz povećanu brojnost arheja karakterizirale su duboke vode Jadrana.

(106 stranica, 29 slika, 3 tablice, 197 literaturnih navoda, 16 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: raznolikost bakterija, pikoplankton, Jadransko more, 454 pirosekvenciranje, CARD-FISH

Mentor: dr. sc. Sandi Orlić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica  
doc. dr. sc. Zrinka Ljubešić  
dr. sc. Mirjana Najdek Dragić

Doktorski rad prihvaćen: 8. svibnja 2015.



## IN-DEPTH ANALYSIS OF THE ADRIATIC SEA BACTERIAL DIVERSITY

Marino Korlević

Laboratory for Marine Microbial Ecology, Center for Marine Research, Ruđer Bošković  
Institute, G. Paliaga 5, Rovinj

### Abstract

Bacteria in marine ecosystems are a morphologically, genetically and functionally diverse group. The seasonal dynamic of bacterial communities in the South and North Adriatic offshore waters and in the Krka river estuary was determined by using a combination of 454 pyrosequencing of the 16S rRNA gene and catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization. Bacterial richness and community structure were strongly influenced by hydrological conditions in all the studied areas. A strong, deep winter mixing of the water column and Levantine intermediate water ingression in the South Adriatic, seasonal environmental conditions and the Po river flow in the North Adriatic and the river flow coupled with a strong salinity gradient in the Krka river estuary had a pronounced impact on bacterial communities. Members of the SAR11 clade were dominating the prokaryotic picoplankton communities in the Adriatic Sea with maximal abundances in the oligotrophic area of the South Adriatic. *Betaproteobacteria* were mainly appearing in ecosystems under the influence of riverine waters. Members of the phylum *Actinobacteria* were present in all the studied areas but high abundances with a pronounced seasonality were detected only in the riverine waters of the Krka estuary. Marine groups NS4 and NS5 belonging to the phylum *Bacteroidetes* together with the gammaproteobacterial SAR86 clade were identified to co-occur with phytoplankton blooms in all the studies areas. Typical marine cyanobacteria, *Synechococcus* and *Prochlorococcus*, were dominating the cyanobacterial communities in the Adriatic. *Synechococcus* was dominating the cyanobacterial communities in the North Adriatic while *Prochlorococcus* was mainly constrained to the South Adriatic. The Deep Adriatic Sea was characterized by typical bacterial deep ocean clades: SAR324, SAR202 and SAR406. In addition, a higher abundance of *Archaea* was found in this deep part of the Adriatic Sea.

(106 pages, 29 figures, 3 tables, 197 references, 16 appendices, original in Croatian)

Keywords: bacterial diversity, picoplankton, Adriatic Sea, 454 pyrosequencing, CARD-FISH

Supervisor: dr. sc. Sandi Orlić

Reviewers: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica  
doc. dr. sc. Zrinka Ljubešić  
dr. sc. Mirjana Najdek Dragić

PhD Thesis accepted: 8 May 2015

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	6
2.1. Molekularne metode u istraživanju mikrobne raznolikosti.....	7
2.2. Prokariotski koncept vrste.....	11
2.3. Bakterije i arheje u morskom okolišu .....	12
2.4. Raznolikost bakterija u Jadranskom moru .....	18
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	20
4. MATERIJALI I METODE .....	22
4.1. Uzorkovanje .....	23
4.2. Određivanje abiotičkih čimbenika.....	25
4.3. 454 pirosekvenciranje .....	26
4.4. Analiza nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA .....	28
4.5. CARD-FISH.....	28
4.6. Statistička obrada podataka .....	31
5. REZULTATI.....	33
5.1. 454 pirosekvenciranje u opisu bakterijskih zajednica .....	34
5.2. Usporedba strukture zajednice određene 454 pirosekvenciranjem i analizom CARD-FISH.....	37
5.3. Južni Jadran .....	39
5.3.1. Hidrografija.....	39
5.3.2. Karakteristike vodenih slojeva.....	39
5.3.3. Sezonska varijacija bakterijske raznolikosti.....	41

5.3.4. Sezonska varijacija brojnosti i raznolikosti bakterija i arheja .....	43
5.4. Sjeverni Jadran .....	48
5.4.1. Hidrografija.....	48
5.4.2. Sezonska raznolikost bakterija.....	51
5.5. Estuarij rijeke Krke .....	57
5.5.1. Hidrografija.....	57
5.5.2. Karakteristike vodenih slojeva.....	58
5.5.3. Sezonska varijacija bakterijske raznolikosti.....	59
5.5.4. Sezonska varijacija brojnosti i raznolikost bakterija.....	61
6. RASPRAVA .....	68
7. ZAKLJUČCI .....	81
8. LITERATURA .....	84
9. PRILOZI .....	VII
10. ŽIVOTOPIS .....	XXVII
10.1. Popis objavljenih znanstvenih radova.....	XXVIII
10.2. Popis sažetaka u zbornicima skupova.....	XXIX

# **1. UVOD**

---

Mikroorganizmi su raznolika skupina organizama manjih od ~100  $\mu\text{m}$  koje je moguće vidjeti isključivo mikroskopom. Obuhvaćaju predstavnike sve tri domene života: bakterije, arheje i eukariote (1). Bakterije i arheje najznačajnija su skupina morskog pikoplanktona (veličinska frakcija 0,2-2  $\mu\text{m}$ ) čija brojnost može biti i do sto puta veća od brojnosti pikoeukariota (protisti veličine 0,2-2  $\mu\text{m}$ ) (2). Oceani, zajedno s tлом te kopnenim i oceanskim potpovršinskim slojem, čine najveći rezervoar bakterija i arheja na Zemlji (3). Bakterije i arheje, pored velike brojnosti, čine važnu funkcionalnu komponentu morskih ekosustava sudjelujući u jedinstvenim i neophodnim biotransformacijama biogeokemijskih ciklusa (3). Morski protisti predstavljaju veličinski i filogenetski raznoliku skupinu koja uključuje autotrofne, miksotrofne i heterotrofne predstavnike. Osim dobro poznatih mikrofitoplanktonskih skupina (veličinska frakcija 20-200  $\mu\text{m}$ ) poput dijatomeja, kokolitoforida i dinoflagelata protisti sadrže i predstavnike pikoeukariota koji spadaju u istu veličinsku frakciju kao i bakterije i arheje. Predstavnici ove skupine pokazuju vrlo veliku raznolikost koja je posljedica, kao i kod ostalih protista, nekoliko endosimbiontskih evolucijskih događaja (2).

Istraživanja struktura životnih zajednica imaju za cilj opis vrste ili skupine organizama prisutne u određenom staništu te određivanje udjela koji ta skupina ili vrsta zauzima u zajednici. Opis zajednica temelj je istraživanja u ekologiji i komponenta koja doprinosi detaljnijem uvidu njihove uloge u ekosustavu (4). Bakterije i arheje u morskim ekosustavima uključuju različite funkcionalne skupine poput primarnih proizvođača, fotoheterotrofa, heterotrofa, fiksatora dušika, nitrifikatora i denitrifikatora (1, 3). Istraživanje funkcionalnih karakteristika pojedinih skupina bakterija i arheja nije uvijek jednostavno. Vrlo često zahtijeva uzgoj pojedine vrste u čistoj kulturi kako bi se mogla odrediti fenotipska odnosno funkcionalna svojstva, što je ponekad vrlo teško ostvariti. Naime, 99% prokariota nije moguće uzgojiti u čistoj kulturi, a od četrdeset poznatih prokariotskih koljena samo polovica ima uzgojive predstavnike (5, 6).

Prva istraživanja prokariota u 19. stoljeću fokusirala su se na uzgoj u čistoj kulturi. Naime, uzgoj prokariota u kulturi bio je neophodan korak identifikacije (4). Kasnijim istraživanjima postalo je jasno da je samo mali dio zajednice moguće uzgojiti na standardnim mikrobiološkim podlogama (7). Primjenom epifluorescentne mikroskopije koja je omogućila jednostavnu vizualizaciju i brojanje prokariota utvrđeno je da je manje od 1% prokariota

uzgojivo. Navedeni raskorak u broju uzgojivih predstavnika poznat je kao „velika anomalija podloge“ (engl. *Great Plate Anomaly*) (4, 8). Kako nije bilo moguće opisati raznolikost cjelokupne zajednice koristeći metode ovisne o uzgoju bilo je potrebno pronaći alternativni način identifikacije prokariota. Klasifikacija mikroorganizama na temelju evolucijskih odnosa izraženih u sličnosti molekula poput ribosomalne RNA (rRNA) omogućila je zaobilazanje problema identifikacije temeljene na uzgoju u kulturi (1, 9, 10). Naime, izolacijom DNA direktno iz organizama sakupljenih u okolišu, kloniranjem gena od interesa i sekvenciranjem omogućena je identifikacija do tada potpuno nepoznatih organizama (11). Ovakav pristup prvi je puta primijenjen koristeći gen za 16S rRNA zbog njegove univerzalne prisutnosti u svim organizmima te dovoljne konzerviranosti koja omogućuje usporedbu između različitih skupina prokariota (4). Gen za 16S rRNA ostao je zbog navedenih razloga najprimjenjeniji marker u identifikaciji strukture zajednica. Kasnijim razvojem metoda fluorescencijske *in situ* mikroskopije 16S rRNA molekula je zbog istih razloga odabrana kao ciljna molekula za vezivanje sonde obilježene fluorescentnim bojama (12). Posljednjih nekoliko godina razvoj metoda sekvenciranja nove generacije (NGS, engl. *Next Generation Sequencing*) omogućio je dobivanje velikog broja nukleotidnih sljedova i time detaljniji uvid u prokariotsku raznolikost (13, 14).

Tijekom posljednja dva desetljeća razumijevanje uloge bakterija i arheja kao medijatora biogeokemijskih ciklusa pomaklo se s paradigme tzv. „crne kutije“ (engl. „*Black Box*“) hranidbenog lanca k preciznijem razumijevanju ekofiziološke uloge bakterija i arheja u okolišu (15). Određivanje ekofiziološke odnosno funkcionalne uloge bakterija i arheja vrlo je često zahtjevno zbog već spomenutog problema nemogućnosti uzgoja većine mikroorganizama u kulturi. S druge strane, određivanje raznolikosti gena, odnosno pojedinih filogenetskih skupina, jednostavnije je, međutim opis genotipske varijabilnosti koja iz toga proizlazi može, ali i ne mora odražavati fenotipsku odnosno funkcionalnu raznolikost. Određivanjem strukture zajednice uz istovremeno praćenje ekoloških čimbenika moguće je pridružiti pojedinim filogenetskim skupinama određena fenotipska svojstva (16).

Jadransko more je poluzatvoreni bazen sjeveroistočnog Sredozemnog mora kojeg karakterizira kontinentska podina koja se proteže od najsjevernijeg dijela do transektu Split-Gargano. Odvojeno je od Jonskog mora Otrantskim vratima širine 70 km i Otrantskim pragom dubine 789 m. Najveća je dubina izmjerena u Južnojadranskoj kotlini (1 243 m) dok je veći dio Jadrana plići od 200 m (73,9%) (17). Raznolike ekosustave Jadrana karakteriziraju

različite hidrografske osobine što se odražava i u različitim trofičkim stupnjevima pojedinih područja. Najvažniji meteorološki čimbenici koji utječu na hidrografske osobine pojedinog područja su energija Sunčeve svjetlosti, vjetrovi i količina oborina (17). Najvažniji vjetrovi u području Jadrana su jugo i bura. Bura je vjetar u istočnom (prednjem) dijelu anticiklone ili u zapadnom (stražnjem) dijelu ciklone koji puše od hrvatske prema talijanskoj obali. Puše nejednoliko, a brzina vjetra može prelaziti 100 km/h. Snažna bura ne diže velike valove jer im vjetar presijeca vrhove i pretvara ih u morsku prašinu. Bura je najjači uzročnik brzog okomitog miješanja vodenog stupca (17). Jugo je južni ili jugoistočni vjetar koji u Jadranu puše na istočnoj (prednjoj) strani atlantskih ciklona ili na zapadnoj (stražnjoj) strani anticiklone. Za razliku od bure, jugo puše jednoliko stvarajući velike valove. Učestalije puše u hladnijem dijelu godine, a učestalost se također povećava od sjevernog prema južnom dijelu Jadrana (17). Izmjena vodenih masa u Jadranu uvjetovana je snažnim kontinentalnim utjecajem (utjecaj sjevernojadranskih rijeka) te povezanošću sa Sredozemnim morem kroz Otrantska vrata (18–20). Kružno, ciklonalno strujanje karakterizira cirkulaciju u Jadranskom moru (20).

Sjeverni i južni Jadran su bitno različiti pelagički ekosustavi. Sjeverni Jadran je plitak ekosustav prosječne dubine 35 m kojeg odlikuje snažan utjecaj rijeke Po te advekcija srednjojadranske vode uz istočnu obalu (21–23). Pretpostavlja se kako rijeka Po zajedno s ostalim sjevernotalijanskim rijekama doprinosi oko 20% ukupnog riječnog dotoka u Sredozemno more (24). Tijekom zime dominira ciklonalna cirkulacija koja donosi slaniju i oligotrofniju srednjejadransku vodu, dok u kasnom proljeću i ljeti dolazi do formiranja vrtloga dovodeći do smanjene izmjene vodenih masa s ostatkom Jadrana te zadržavanja eutrofnije vode u sjevernom Jadranu (22, 23). Ove dvije vodene mase koje se odlikuju različitim koncentracijama nutrijenata utječu na biološke procese u ovom području (25). Također, sjeverni je Jadran područje stvaranja sjevernojadranske vode visoke gustoće (NAdDW, engl. *North Adriatic Dense Water*) procesom hlađenja cjelokupnog vodenog stupca u zimskim mjesecima tijekom produljenih razdoblja puhanja bure (20, 26). S trofičkog stanovišta sjeverni Jadran je jedno od najproduktivnijih područja Sredozemnog mora na svim trofičkim razinama, od fitoplanktona do riba (27). Meteorološki uvjeti koji dovode do promjene protoka rijeke Po te alternacije u cirkulacijskom sustavu mogu snažno utjecati na trofičko stanje ovog dijela Jadrana.

Ekosustav južnog Jadrana odlikuje utjecaj 1200 m duboke Južnojadranske kotline te redovita izmjena vodenih masa s Jonskim morem. Cirkulaciju južnog Jadrana odlikuje ciklonalni Južnojadranski vrtlog. Istočnojadranska struja koja donosi vodu većeg saliniteta i temperature iz Jonskog mora i Levantinskog bazena te zapadnojadranska struja koja odnosi uz zapadnu obalu vodu manjeg saliniteta odlikuju ciklonalnu površinsku cirkulaciju južnog Jadrana (28). Levantinska intermedijarna voda (LIW, engl. *Levantine Intermediate Water*) te Jonska površinska voda ulaze u Jadran uz istočnu obalu južnog Jadrana. Opisan je znatan utjecaj LIW-a na biogeokemijske procese Jadrana čijoj su ingresiji pripisane fluktuacije niza fizikalnih, kemijskih i bioloških parametara (29, 30).

Utjecaj istočnojadranskih krških rijeka i lokalnih vjetrova poput bure na hidrografiju srednjeg Jadrana izražen je u površinskom sloju, ali nije toliko snažan kao utjecaj rijeke Po na sjeverni Jadran. Jedna od takvih rijeka je Krka sa svojim ~25 km dugim estuarijem koji se proširuje u dva prostranija područja: Prokljansko jezero i šibensku luku (31). Dio estuarija pripada Nacionalnom parku Krka koji je poznat prvenstveno zbog slikovitih slapova, sedrenih barijera biogenog porijekla, preko kojih riječna voda ulazi u estuarij. Uzvodno od slapova nalazi se Visovačko jezero (17). Dubina estuarija se postepeno povećava prema ulazu u estuarij (dubina 40 m), bez pragova. Estuarij rijeke Krke je visokostratificirani estuarij (engl. *Salt-Wedge Estuary*), sa oštrom haloklinom koja dijeli gornji slatkovodni sloj, od donjeg morskog. Dubina halokline ovisi o dotoku rijeke Krke te varira od 0,2 do 6,3 m, a debljina halokline od 0,1 do 3 m (32, 33). Povremeno, prilikom manjih dotoka riječne vode donji dio estuarija sadrži karakteristike djelomično miješanog tipa (34, 35). Haloklina je sloj povećane mikrobiološke aktivnosti, te je bogata partikulatnom organskom tvari (35–37). Koncentracije nutrijenata u različitim vodenim slojevima znatno se razlikuju, a osim toga, pokazuju bitne sezonske varijacije ovisne o protoku rijeke i biološkoj aktivnosti (38). Visokostratificirani estuariji najbolje su razvijeni u Sredozemlju gdje je raspon plime i oseke mali. Idealni su za istraživanje fizikalno-kemijskih i bioloških procesa koji se odvijaju na granici slatke i slane vode i koji su slabije poznati od procesa na granici između dna i vode ili između vode i zraka (17).



## **2. LITERATURNI PREGLED**

---

Istraživanje raznolikosti bakterija i arheja neminovno je vezano uz korištenje molekularnih metoda. Naime, već spomenuta nemogućnost uzgoja više od 99% bakterija i arheja u čistoj kulturi prepreka je korištenju metoda ovisnih o uzgoju u opisu cjelokupne raznolikosti zajednice. Razvoj i prilagodba molekularnih metoda sekvenciranja i *in situ* hibridizacije omogućila je opis velike raznolikosti bakterija i arheja prisutnih u morskom okolišu.

## 2.1. Molekularne metode u istraživanju mikrobne raznolikosti

Identifikacija mikrobnih zajednica vezana je uz korištenje gena za rRNA molekule ili uz nekodirajuću regiju ITS (engl. *Internal Transcribed Spacer*). Prilikom identifikacije bakterija i arheja najčešće se koristi gen za 16S rRNA dok je regija ITS više vezana za identifikaciju gljiva (4, 39). Određivanje strukture zajednice može se provesti posrednim metodama poput DGGE-a (engl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (40) ili T-RFLP-a (engl. *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (41), sekvenciranjem ciljnog gena ili fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom (FISH, engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*). Posredne metode baziraju se na umnožavanju ciljnog gena te detekciji produkata denaturacije u denaturirajućem gradijentu gela (DGGE) ili detekciji produkata restrikcije ciljnog gena kapilarnom elektroforezom (T-RFLP). Ovakve metode omogućuju posrednu usporedbu sastava zajednica, međutim ne dozvoljavaju identifikaciju pojedinih skupina unutar zajednice. Sve metode zahtijevaju primarni korak izolacije okolišne DNA ili, u slučaju FISH-a, fiksiranje i filtraciju uzorka koji sadrži mikrobne stanice kroz filtre željene veličine (42).

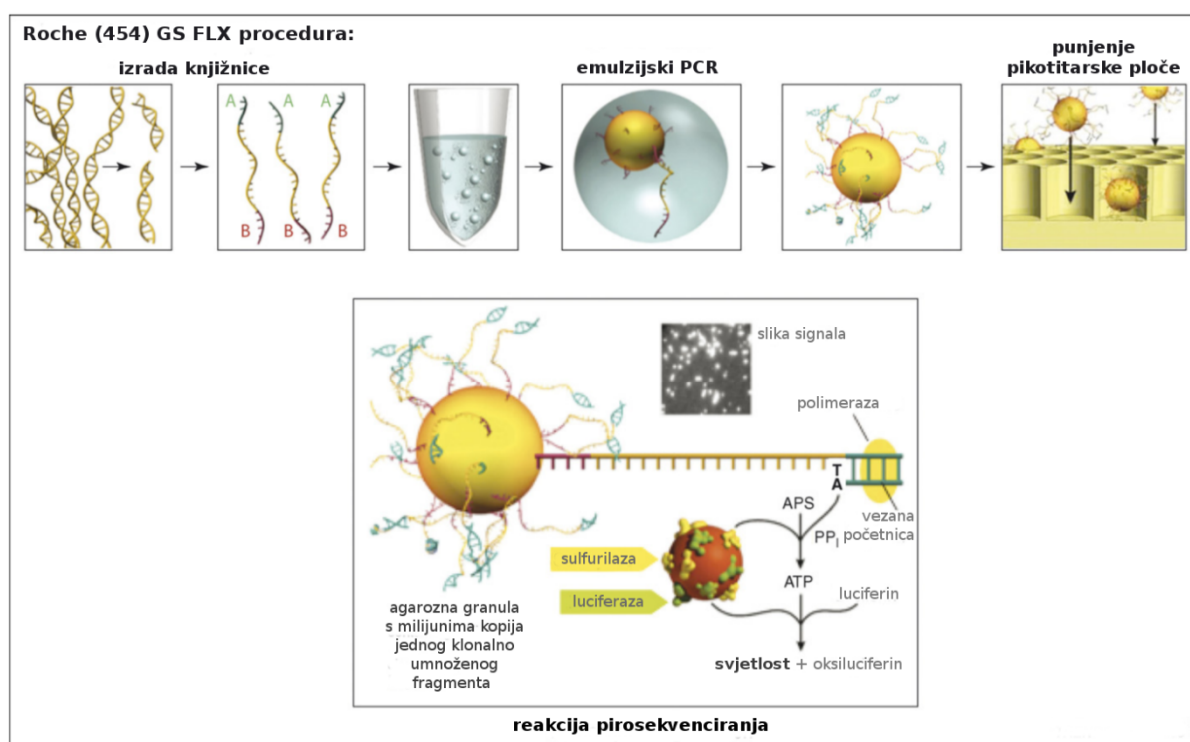
Najčešći način određivanja strukture zajednice bakterija i arheja temelji se na sekvenciranju gena za 16S rRNA. Ciljni se fragment DNA umnoži lančanom reakcijom polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) te se klonira kako bi se dobile knjižnice klonova (engl. *Clone Library*) određenog uzorka zajednice (43, 44). Pojedini se klonovi iz knjižnice zatim sekvenciraju metodom po Sangeru. Ciljni se gen može sekvencirati jednostrano što je najčešće dovoljno za identifikaciju pojedinih skupina ili obostrano kako bi se dobio nukleotidni slijed cjelokupnog gena, najčešće u svrhu popunjavanja baza nukleotidnih sljedova gena za rRNA molekule (44).

U posljednje se vrijeme knjižnice klonova zamjenjuju sekvenciranjem nove generacije (13, 45, 46). Naime, konstrukcija knjižnice klonova zahtjevan je laboratorijski posao koji uglavnom rezultira nukleotidnim sljedovima nekoliko stotina klonova dok sekvenciranje nove generacije omogućuje dobivanje nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća nukleotidnih sljedova uz mogućnost istovremenog sekvenciranja nekoliko desetaka uzoraka s istom greškom sekvenciranja kao i kod metode po Sangeru (47). Jedni nedostatak je nemogućnost sekvenciranja cjelokupnog gena za 16S rRNA zbog kraćih nukleotidnih sljedova koji se dobivaju u odnosu na metodu po Sangeru. Metode sekvenciranja nove generacije koje su našle najveću primjenu u morskoj mikrobnoj ekologiji su 454 pirosekvenciranje (13) i Illumina (48).

Metoda 454 pirosekvenciranja (Roche, Švicarska) prilikom sekvenciranja koristi DNA polimerazu, međutim fokus detekcije nije ugrađeni nukleotid već molekula pirofosfata koja se oslobađa u reakciji ugradnje nukleotida (Slika 1). Oslobođeni pirofosfat ulazi u niz reakcija koji završavaju oslobađanjem svjetla cijepanjem oksiluciferina luciferazom (49, 50). Prilikom identifikacije strukture zajednice neophodan je korak u kojem se pojedine molekule kalupa, prisutne u uzorku, odvajaju jedna od druge što se u sekvenciranju po Sangeru postiže izradom knjižnice klonova. Tehnologija 454 pirosekvenciranja klonalno umnožavanje postiže provođenjem emulzijskog PCR-a (50). 5' kraj molekule kalupa sadrži ugrađeni adapterski nukleotidni slijed kojim se veže za kratki komplementarni oligonukletidni slijed vezan za agaroznu granulu. Pojedine agarozne granule s molekulom kalupa izdvajaju se koristeći mješavinu ulja i vode. U nastalim vodenim micelama koje sadrže reaktante potrebne za provođenje PCR-a (emulzijski PCR) klonalno se umnože molekule kalupa. Svaka agarozna granula na kraju sadrži do 1 000 000 kopija vezanog kalupa. Emulzijski se PCR provodi kako bi se mogli proizvesti dovoljno snažni signali koje je moguće detektirati u sljedećem stupnju pirosekvenciranja. Produkti se emulzijskog PCR-a prenesu na pikotitarsku ploču u kojoj se provodi sekvencijska reakcija dodavanjem svakog od četiri nukleozid trifosfata, jednog iza drugog, te detekcija signala u slučaju ugradnje nukleotida. U slučaju homopolimernih sljedova duljina homopolimera je proporcionalna emitiranom svjetlu. Ovakvim se masovnim procesom sekvenciranja može u jednom postupku dobiti ~1 000 000 nukleotidnih sljedova prosječne duljine ~400 pb što je dovoljno za filogenetsku analizu (47).

454 pirosekvenciranje prvi je puta primijenjeno u opisu raznolike mikrobne zajednice dubokog oceana (13). Istovremeno sekvenciranje više uzoraka koje je provedeno u ovom

istraživanju omogućeno je fizičkim odvajanjem nukleotidnih sljedova svakog uzorka što je zahtjevno i ograničeno na maksimalno istovremeno sekvenciranje desetak uzoraka. Kako bi se omogućilo sekvenciranje nekoliko desetaka uzoraka istovremeno bez potrebe za fizičkim odvajanjem, ista grupa znanstvenika razvila je tzv. metodu barkodiranja kojom se između lijevog adaptora i lijeve genski specifične početnice dodaje barkod nukleotidni slijed duljine desetak nukleotida. Barkod nukleotidni slijed specifičan je za svaki uzorak te omogućuje da se bioinformatičkom obradom nakon sekvenciranja sortiraju nukleotidni sljedovi u zasebne datoteke specifične za svaki uzorak (51).



**Slika 1.** Procedura 454 pirosekvenciranja. Dizajniraju se genski specifične početnice koje na svojem 5' kraju imaju dodan adaptorski nukleotidni slijed A ili B ovisno o tome radi li se o lijevoj ili desnoj početnici. Adaptorski se slijed dodaje kako bi se PCR-om umnoženi fragmenti mogli vezati za agarozne granule. Najčešće se između adaptorskog slijeda A i genski specifične početnice dodaje barkod nukleotidni slijed specifičan za svaki uzorak koji omogućuje istovremeno sekvenciranje više uzoraka. Klonalno umnažanje molekule kalupa osigurava se emulzijskim PCR-om. Reakcija pirosekvenciranja odvija se u pikotitarskoj ploči gdje se detektira signal u vidu svjetla kao posljedica ugrađenog nukleotida i proizvedenog pirofosfata ( $PP_i$ ). Preuzeto i prilagođeno prema Mardis, 2008 (49).

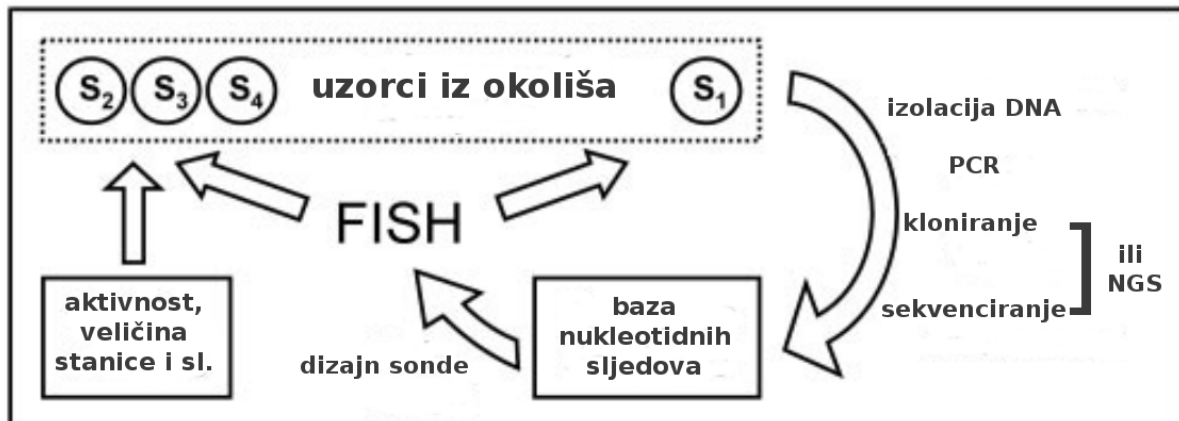
Kao što je već napomenuto sekvenciranjem nove generacije nije moguće dobiti cjelokupni nukleotidni slijed gena za 16S rRNA te je potrebno ograničiti se na određenu regiju gena. 16S rRNA molekula sadrži devet varijabilnih regija koje su se pokazale najprikladnije u taksonomskoj klasifikaciji (52). Najčešće se koriste V1-V2 te V6 regija (13,

14, 44, 53). Sekvenciranjem nove generacije omogućeno je dobivanje nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća nukleotidnih sljedova po uzorku što zahtjeva korištenje tzv. *pipeline* softverskih programa u analizi i taksonomskoj klasifikaciji. Najpoznatiji *pipeline* programi su QIIME (54), mothur (55) i SILVAngs (56). Svaki od navedenih programa koristi neku od baza 16S rRNA nukleotidnih sljedova prema kojoj klasificira sekvencirane nukleotidne sljedove. Najpoznatije baze 16S rRNA nukleotidnih sljedova su SILVA (56), RDP (engl. *Ribosomal Database Project*) (57) i Greengenes (58). SILVAngs i mothur *pipeline* programi koriste SILVA bazu podataka dok QIIME koristi RDP bazu podataka. Iste baze podataka koriste se i prilikom analize nukleotidnih sljedova sekvenciranih metodom po Sangeru (knjižnice klonova).

Metodama sekvenciranja, pogotovo sekvenciranja nove generacije, moguće je dobiti detaljan uvid u raznolikost zajednica bakterija i arheja, međutim nije moguće detektirati i kvantificirati pojedinačne stanice određene skupine. Naime, zbog pristranosti metode PCR-a prilikom umnažanja molekule kalupa, korištenja početnica koje ne zahvaćaju sve skupine jer su dizajnirane na nepotpunim bazama podataka, različitog broja rRNA operona u različitim skupina te različite efikasnosti ekstrakcije DNA različitih skupina, udio pojedine skupine u ukupnom broju nukleotidnih sljedova treba uzeti s oprezom (16, 59). Korištenjem FISH-a moguće je detektirati i vizualizirati pojedinačne stanice te većim dijelom zaobići navedene probleme. Izvedenica metode FISH-a koja je našla najširu primjenu na uzorcima iz morskog okoliša je fluorescencijska *in situ* hibridizacija kataliziranim taloženjem reportera (CARD-FISH, engl. *Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization*) (60). Zasniva se na korištenju oligonukleotidnih sonda specifičnih za određenu skupinu za koje je kovalentno vezana peroksidaza iz korijena hrena (HRP, engl. *Horseradish Peroxidase*). Uzorak mikroorganizama iz okoliša se fiksira nakon čega slijedi permeabilizacija stanične stijenke te inaktivacija endogenih peroksidaza kako se ne bi generirali lažni signali u procesu detekcije. Sonda specifična za svaku skupinu veže se za 16S rRNA molekulu te omogućuje detekciju pojedinačne stanice taloženjem tiramidne boje što je katalizirano kovalentno vezanom peroksidazom iz korijena hrena. Upravo taloženje tiramidne boje u kataliziranoj reakciji znatno pospješuje prag detekcije što je prikladno za vizualizaciju morskih bakterija i arheja koje u oligotrofnim uvjetima sadrže malo ribosoma (42).

Metodološki pristup koji se pokazao kao poprilično uspješan u određivanju strukture zajednice bakterija i arheja temelji se na istovremenom korištenju metoda sekvenciranja i

FISH-a (Slika 2) (16). Prilikom uzorkovanja, istovremeno, uzimaju se uzorci za ekstrakciju DNA i sekvenciranje (knjižnice klonova ili NGS) te za FISH. Nukleotidni sljedovi koji se dobiju i taksonomski klasificiraju služe za popunjavanje baza podataka, ali i za selekciju sonde koje će se koristiti u FISH-u. Navedenim pristupom, moguće je odrediti pripadnike zajednice te kvantificirati njihov udio u ukupnoj zajednici. Također, usporedbom s okolišnim čimbenicima moguće je donijeti zaključke o funkcionalnoj ulozi određene skupine.



**Slika 2.** Metodološki pristup u istraživanju strukture zajednice koji kombinira sekvenciranje i FISH. Uzima se uzorak iz okoliša kako bi se izolirala DNA te sekvencirao markerski gen (najčešće gena za 16S rRNA) čime se popunjavaju baze nukleotidnih sljedova. Proces kloniranja i sekvenciranja po Sangeru može se zamijeniti sekvenciranjem nove generacije (NGS). Na temelju baze nukleotidnih sljedova dizajniraju se sonde za detekcije određenih skupina FISH-om. Osim detekcije skupina, FISH omogućuje dobivanje informacija i o aktivnosti, veličini stanica i sl. Preuzeto i prilagođeno prema Perntahaleru i Amannu, 2005 (16).

## 2.2. Prokariotski koncept vrste

Za većinu eukariota, uključujući biljke, životinje, gljive i neke protiste, vrsta se definira kao populacija koja se međusobno može razmnožavati (4). Ovakva definicija vrste nije primjenjiva na prokariote. Naime, prokarioti se ne mogu križati, barem ne u klasičnom smislu, te ne posjeduju spolove. Rekombinacija DNA u prokariota zbiva se na različite načine uključujući i horizontalni transfer gena iz evolucijski nesrodnih bakterija, ali i arheja (61). Koncept vrste u prokariota zasniva se na empirijskim osnovama koje su se razvijale paralelno s analitičkom tehnologijom (5). Također, važno je napomenuti kako je kod opisa nove vrste prokariota potrebno uzgojiti i opisati novi soj. Kod određivanja pripadaju li dva bliska soja dvjema vrstama ili ne, pažnja je pridana usporedbi cjelokupnih genoma i genu za 16S rRNA. Usporedba genoma odvija se najčešće usporedbom tzv. DNA-DNA sličnosti. Genomska DNA dvaju sojeva se pomiješa, denaturira i ponovno asocira. Ponovna asocijacija DNA

molekula dvaju sojeva ovisi o sličnosti nukleotidnih sljedova dvaju genoma. Sličnost se izražava kao omjer relativnog vezanja (RBR, engl. *Relative Binding Ratio*) ili kao razlika srednjih točaka termalne denaturacije ( $\Delta T_m$ ). Vrijednost RBR-a jednaka ili veća od 70% te  $\Delta T_m$  jednak ili manji od 5°C granične su vrijednosti za određivanje prokariotske vrste (5). Što se tiče gena za 16S rRNA uočeno je kako vrijednost RBR-a od 70% odgovara identitetu od 97% u genu za 16S rRNA. Prema tome vrijednost identiteta od 97% se najčešće koristi u definiranju operativnih taksonomskih jedinica (OTU, engl. *Operational Taxonomic Unit*) (62). Često se krivo interpretira kako organizmi sa identitetom 97% ili više moraju pripadati istoj vrsti. Naime, ovom konceptu nedostaje teoretska osnova te su opisane skupine fenotipski različitih vrsta cijanobakterija čiji je identitet gena za 16S rRNA 97% ili veći (4). Kao alternativu ovom konceptu Cohan je predložio koncept „ekotipova“ definiran kao populacije stanica u istoj ekološkoj niši koje pokazuju genetičku koheziju unutar svake populacije i ekološku različitost među populacijama (63). Prema ovom konceptu dolazi do akumulacije neutralnih mutacija u genomima bliskih srodnika dok se ne dogodi periodički selekcijski događaj. To se događa kada je neki adaptivni mutant razvio bitno viši fitness od ostalih stanica u populaciji te počinje dominirati populacijom. Na ovakav se način osigurava genetička kohezija što se odražava u filogenetskim stablima kao skupina blisko srodnih nukleotidnih sljedova odvojena od ostalih skupina isto tako blisko srodnih sljedova (4). Iako korištenje gena za 16S rRNA u ekološkim istraživanjima ima svoje probleme za sada ostaje najrašireniji i najprikladniji način praćenja prokariota u njihovom okolišu.

### 2.3. Bakterije i arheje u morskom okolišu

U prošlosti se smatralo kako su bakterije i arheje organizmi sposobni stvarati kolonije na čvrstom supstratu, najčešće agaru. Pretpostavljalo se kako je moguće podešavanjem sastava podloga za uzgoj kultivirati sve bakterije i arheje prisutne u okolišu. Nakon što pokušaji uzgoja velike većine bakterija i arheja u kulturi nisu uspjeli pretpostavilo se kako je vrlo teško odrediti sastav podloga koji bi omogućio uzgoj svih bakterija i arheja iz heterogenog okoliša (4). Prepoznato je kako bogate podloge poput *marine broth*-a, koje se najčešće koriste u uzgoju morskih bakterija, diskriminiraju rast stanica koje su prilagođene oligotrofnim uvjetima (64). Sposobnost stvaranja kolonija treba se promatrati kao aktivan proces u kojem skupine prilagođene eutrofnim uvjetima imaju prednost. Naime, ovakve se skupine mogu smatrati tzv. „r-ekotipovima“, odnosno skupinama s relativno nestabilnim

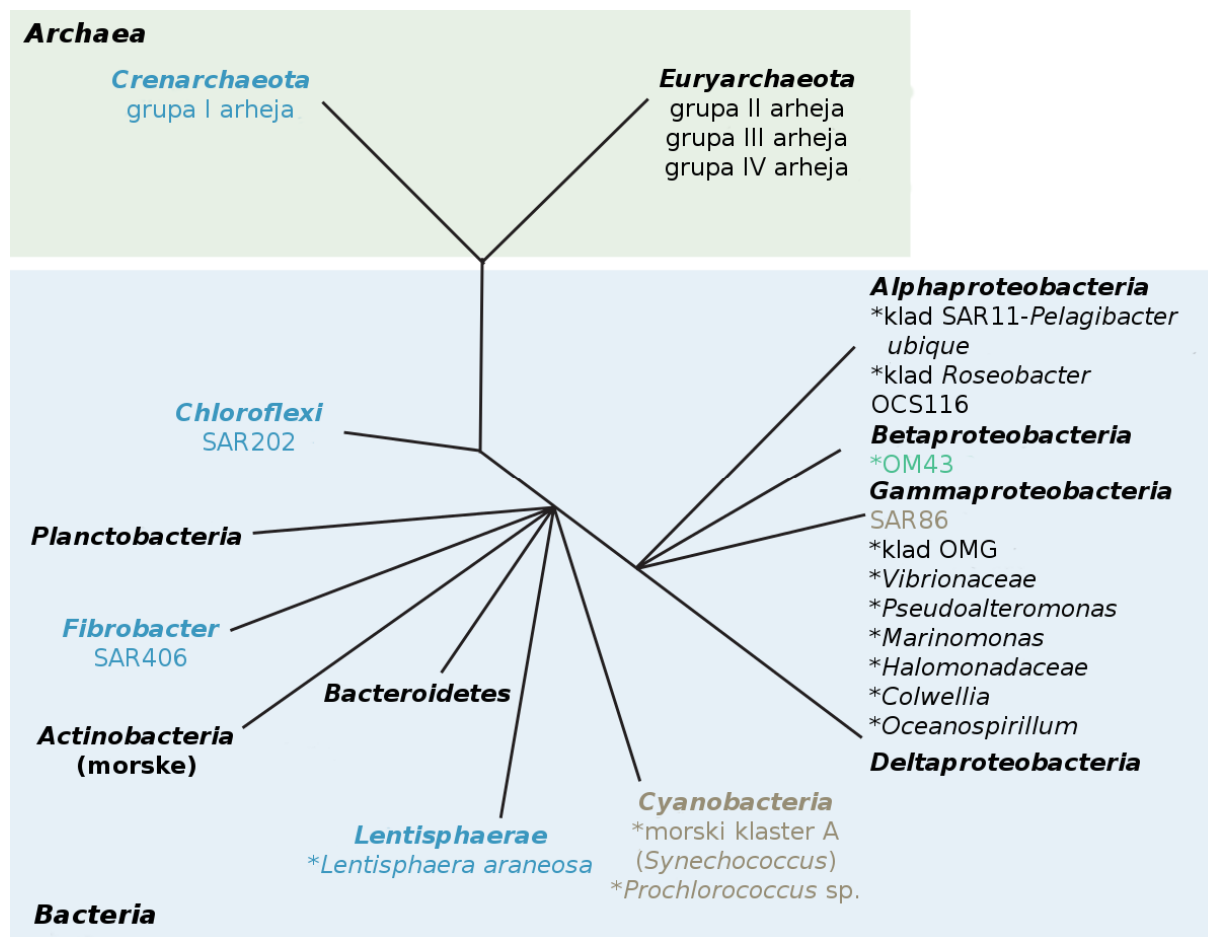
populacijama koje izražavaju snažne fluktuacije u brojnosti. Prilagođene su okolišu bogatom nutrijentima i općenito imaju velike stanice, kratko generacijsko vrijeme te u kulturi postižu veliku brojnost stanica (4). Bakterije i arheje prilagođene oligotrofnim uvjetima nije moguće uzgojiti na ovakav način. Button i sur. razvili su metodu „razrjeđenja do ekstinkcije“ (engl. *Dilution-to-Extinction*) prikladnu za uzgoj stanica prilagođenih oligotrofnim uvjetima (64). Ovakve skupine mogu se smatrati tzv. „K-ekotipovima“ čija je veličina populacije relativno stabilna u ekosustavu (4). Ovi su ekotipovi prilagođeni korištenju niskih koncentracija nutrijenata, pokazuju spori rast u kulturi, malu veličinu stanica te često ne mogu rasti u okolišu bogatom nutrijentima. Za bakterije i arheje prilagođene oligotrofnim uvjetima, život u obliku pojedinačnih stanica čini se optimalnim zbog velike kompeticije za siromašne resurse. Mogućnost stvaranja kolonija se, prema tome, ne čini kao adaptivna karakteristika ovih mikroorganizama (65).

Najveći dio pikoplanktonske zajednice na globalnoj razini čini klad SAR11 razreda *Alphaproteobacteria* (koljeno *Proteobacteria*; Slika 3). Predstavnici ove skupine bakterija mogu sačinjavati 50% ukupne pikoplanktonske zajednice u eufotičkoj i 25% u mezopelagičkoj zoni (53, 66–68). Radi se o skupini čije su stanice manje od 1  $\mu\text{m}$  te su dobro prilagođene oligotrofnim uvjetima koji vladaju u velikom dijelu oceana. Jedini predstavnik uzgojen u kulturi ove poprilično raznolike skupine je vrsta *Pelagibacter ubique* koja je uzgojena metodom „razrjeđenja do ekstinkcije“ i čiji je genom sekvenciran (69, 70). Genom ove vrste je najmanji genom (1,2 Mpb) jednog slobodno-živećeg organizma s najmanjim brojem otvorenih okvira čitanja. Analiza genoma pokazala je veliki broj gena za porodicu ABC prijenosnika (engl. *ATP-Binding Cassette*) koje karakterizira visoki afinitet za različite vrste organskih spojeva te gen za proteorodopsin. Proteorodopsin je protein koji djelovanjem svjetla omogućuje stanici sintezu ATP-a. Također, vrsta *Pelagibacter ubique* ne sadrži pseudogene, introne, transpozone, izvankromosomske elemente ili inteine što se odražava u maloj veličini genoma. S obzirom na strukturu genoma, veličinu stanice i veliku brojnost u oligotrofnim područjima klad SAR11 može se smatrati „K-ekotipom“ dobro prilagođenim uvjetima siromašnim otopljenim organskim ugljikom.

Predstavnici srodni rodu *Roseobacter* čine još jednu skupinu razreda *Alphaproteobacteria* koja je brojna u obalnim vodama i otvorenom moru (Slika 3) (71–73). Pronađeno je kako sezonska dinamika ove skupine u Sjevernom moru prati razvoj fitoplanktonske biomase (71). Smatra se kako pripadnici ove skupine imaju važnu ulogu u



transformaciji sumpornih spojeva poput fitoplanktonskog osmolita dimetilsulfoniopropionata (DMSP) te posljedično utječu na regulaciju klime otpuštanjem dimetilsulfida (73–75). Neki članovi ove skupine sadrže bakterioklorofil *a* te pripadaju aerobnim anoksigenim fototrofima. Za razliku od klada SAR11, predstavnici ove skupine vrlo se često pronalaze tijekom istraživanja koja uključuju uzgoj na bogatim podlogama (4).



**Slika 3.** Shematski prikaz filogenetskih odnosa najzastupljenijih pelagičkih skupina bakterija i arheja. Crno su označene skupine za koje se smatra da su sveprisutne u moru, žuto skupine koje su vezane za eufotičku zonu, plavo skupine koje su vezane za mezopelagijal te zeleno skupine vezane uz obalne vode. Preuzeto i prilagođeno prema Giovannoniju i Stinglu, 2005 (76).

Razred *Gammaproteobacteria* još je jedna skupina koljena *Proteobacteria* brojna u vodenom stupcu i morskim sedimentima (Slika 3). Sadrži predstavnike koje je moguće uzgojiti, ali i one koji do sada nisu uzgojeni u kulturi (4). Jedan od najpoznatijih lako uzgojivih predstavnika ovog razreda je rod *Vibrio*. Uključuje vrstu *Vibrio cholerae*, uzročnika kolere u ljudi, vrstu *Vibrio vulnificus*, povezanu s infekcijom rana, vrstu *Vibrio anguillarum*, patogena riba te mnoge nepatogene vrste. Poznata je karakteristika bioluminiscencije vrste

*Vibrio fischeri*, koja živi kao simbiot u svjetlosnim organima lignji i bioluminiscentnih riba (4). Ostali poznatiji rodovi razreda *Gammaproteobacteria* koji su lako uzgojivi su: *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Schewanella*, *Glaciecola*, *Ocanospirillum*, *Colwellia* i ostali (4). Osim predstavnika koje je lako uzgojiti razred *Gammaproteobacteria* sadrži raznoliku skupinu čiji su predstavnici rijetko uzgojeni u kulturi te o kojima saznanja uglavnom dolaze iz istraživanja koja koriste molekularne metode. Jedna od ovakvih skupina je klad SAR86 čija se brojnost u oceanima karakteristično povećava nakon završetka zimskog miješanja i uspostave termalne stratifikacije (77, 78). Genomskom analizom, dobivenom sekvenciranjem metagenoma i genomikom pojedinačne stanice (engl. *Single-Cell Genomics*), kod klada SAR86 utvrđeno je postojanje širokog spektra gena za razgradnju lipida i ugljikohidrata. Također, za akumulaciju ovakve organske tvari pronađen je veliki broj tonB-ovisnih receptora na vanjskoj membrani te gen za proteorodopsin koji je povezan s mogućnošću sinteze ATP-a djelovanjem svjetla (79–81). Druga skupina ovog razreda koja je česti stanovnik pelagičkih staništa je klad SAR92. Za razliku od klada SAR86, klad SAR92 sadrži nekoliko kultiviranih sojeva (82). Predstavnici ovog klada povezani su s odgovorom pikoplanktonske zajednice na fitoplanktonski cvat u vodama Sjevernog mora (83). Također, u nekih sojeva ove skupine pronađen je gen *dddD*, dio metaboličkog puta proizvodnje dimetilsulfida (84).

Razred *Betaproteobacteria* koljena *Proteobacteria* raznolika je skupina karakteristična za slatke vode (Slika 3) (85, 86). Vrlo često se nalazi u boćatim vodama estuarija rijeka (87–90) te u morskim ekosustavima smanjenog saliniteta poput Baltičkog mora (91–93). Koljeno *Actinobacteria* je skupina koja se često nalazi u morskim pelagičkim ekosustavima, međutim njezina brojnost nije toliko velika kao u slatkim vodama ili u tlu (4). Poput razreda *Betaproteobacteria* predstavnici ovog koljena brojniji su u boćatim vodama estuarija rijeka (87, 89, 90) te u morima smanjenog saliniteta poput Baltičkog (91–93). Koljeno *Actinobacteria* sadrži podosta kultiviranih predstavnika koji pokazuju sposobnost razgradnje različitih spojeva poput agara, celuloze, hitina, ugljikovodika i sl. (4).

Predstavnici koljena *Bacteroidetes* (prethodno poznati i kao skupina *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes*) važan su sastavni dio prokariotske pikoplanktonske zajednice mora (Slika 3). Radi se o vrlo raznolikoj skupini bakterija čiji su predstavnici pronađeni u raznim staništima od jezera, pelagičkih staništa oceana, sedimenata, hidrotermalnih izvora i morskog leda do probavnog trakta sisavaca (4). Iako u površinskim vodama oceana čine samo

2-4% pikoplanktonske zajednice (67) predstavnici ovog koljena imaju važnu ulogu u razgradnji kompleksne organske tvari (94). Dokazana im je uloga u razgradnji spojeva visoke molekularne mase poput proteina i hitina (95, 96). Tijekom fitoplanktonskih cvatova brojnost se ove skupine povećava (83, 97), što je potvrđeno i genomskim istraživanjima koji su utvrdila glikolitički i proteolitički potencijal kod predstavnika ove skupine (98). U fozmidima koje sadrže gene za 16S rRNA specifične za predstavnike ove skupine pronađen je i veliki udio tonB-ovisnih receptora kao i kod klada SAR86 (98).

Cijanobakterije su vjerojatno najbolje istražena skupina bakterija čiji su mnogi predstavnici uzgojeni u kulturi, njihovi genomi sekvencirani te čija je ekologija dobro istražena. Sve cijanobakterije sadrže klorofil *a* te mogu provoditi oksigenu fotosintezu (4). Dva su roda cijanobakterija karakteristična za morske ekosustave: rod *Prochlorococcus* i rod *Synechococcus* (Slika 3). Rod *Prochlorococcus* otkriven je metodom protočne citometrije kojom su stanice predstavnika ove skupine veličine 0,6  $\mu\text{m}$  odvojene od većih stanica roda *Synechococcus* (0,9  $\mu\text{m}$ ) (99). Stanice roda *Prochlorococcus* dugo su vremena uočavane epifluorescentnim mikroskopom, međutim zbog posjedovanja specifičnih pigmenata (divinilklorofila *a* i *b*) nisu davale dovoljno snažne autofluorescentne signale koji bi bili uočljivi i omogućili njihovu identifikaciju (4). Za razliku od roda *Prochlorococcus*, rod *Synechococcus* otkriven je desetak godina ranije zbog posjedovanja pigmenta fikoeritrina koji snažno autofluorescira žuto do narančasto pod plavim ili zelenim ekscitacijskim svjetlom (100, 101). Iako filogenetski srodni, smatra se kako predstavnici ova dva roda imaju različite ekološke strategije. Rod *Prochlorococcus* brojniji je u oligotrofnim vodama, za razliku od roda *Synechococcus* čija se brojnost povećava u vodama s većim koncentracijama nutrijenata. Rod *Synechococcus* ne prodire toliko duboko u vodu kao rod *Prochlorococcus*, međutim pokazuje širu geografsku distribuciju koja uključuje vode bogate nutrijentima te polarne vode (102–104). Rod *Prochlorococcus* sadrži dva ekotipa prilagođena visokom (HL, engl. *High-Light-Adapted*) i niskom intenzitetu svjetla (LL, engl. *Low-Light-Adapted*) koji pokazuju različitu distribuciju ovisnu o dubini (103, 105). Soj roda *Prochlorococcus* prilagođen visokom intenzitetu svjetla sadrži najmanji genom (1,7 Mpb) jednog oksigenog fotosintetskog organizma (104). Sojevi prilagođeni niskom intenzitetu svjetla sadrže veće genome koji su usporedivi s veličinom genoma roda *Synechococcus* (104, 106). Također, predstavnici ova dva roda pokazuju afinitet prema uzimanju nukleozida i aminokiselina iz okoliša te ih se može smatrati fotoheterotrofima (107). Uz rod *Synechococcus* i *Prochlorococcus* još je

nekoliko skupina cijanobakterija u morskom okolišu važno, prvenstveno zbog njihove uloge u fiksaciji atmosferskog dušika (4). Jedna od takvih skupina je rod *Trichodesmium* koji je uglavnom ograničen na tropska i suptropska područja. Iako rijedak, povremeno se njegova brojnost može znatno povećati te se smatra kako može bitno pridonijeti globalnoj zalih dušika u oceanima (108).

Tri skupine bakterija čija je rasprostranjenost ograničena na duboke vode oceana su: klad SAR202 koljena *Chloroflexi*, klad SAR406 koljena *Deferribacteres* i klad SAR324 razreda *Deltaproteobacteria*. Fiziologija i struktura genoma ovih organizama nedovoljno je istražena (Slika 3) (67, 76, 109, 110).

Krajem 1970-tih, u istraživanjima koja su proveli Woese i Fox, skupina koja je do tada svrstavana u bakterije, na temelju molekularne filogenije gena za rRNA, definirana je kao nova skupina organizama te je nazvana arhebakterijama (*Archaeobacteria*) (9). Mikroorganizmi ove skupine na kojima su provedena prva istraživanja te koje je bilo moguće uzgojiti u kulturi bili su metanogeni (obligatni anaerobi) te ekstremni termofili i halofili. Kasnije su arhebakterije preimenovane u arheje (*Archaea*) kako bi se jasnije odredilo da se ne radi samo o još jednom tipu bakterija. Na temelju ovakvih istraživanja sva su živa bića podijeljena u tri domene: *Archaea*, *Bacteria* i *Eukarya* koje su evolucijski podjednako udaljene jedne od druge (111). Pošto su prva istraživanja provedena na predstavnicima arheja iz ekstremnih staništa smatralo se kako su svi predstavnici ove domene ekstremofili. Korištenjem univerzalnih početnica za gene rRNA arheja utvrđeno je postojanje arheja i na većim dubinama oceana (112). Dva se koljena arheja pojavljuju u morskom okolišu: koljeno *Crenarchaeota* i *Euryarchaeota* (Slika 3). Koljeno *Euryarchaeota* karakteristično je za površinske vode (67, 113, 114) dok je koljeno *Crenarchaeota* brojnije u dubokim vodama (115–117). Čini se kako predstavnici koljena *Crenarchaeota* posjeduju autotrofne i heterotrofne sposobnosti (4). Smatra se kako barem dio predstavnika ovog koljena fiksira ugljikov dioksid kemoautotrofijom koristeći amonijak kao donor elektrona i izvor energije utječući time na globalni ciklus dušika (114, 118, 119). Fiziologija predstavnika koljena *Euryarchaeota* manje je poznata. Zanimljivo, predstavnici ovog koljena sadrže gen za proteorodopsin što se objašnjava horizontalnim transferom gena između dvije domene života (61).

## 2.4. Raznolikost bakterija u Jadranskom moru

Opis raznolikosti bakterija u Jadranskom moru uglavnom je bio vezan uz obalna područja te vrlo često nije uključivao opis sezonskih promjena. Također, metode koje su korištene nisu omogućavale detaljni opis raznolikosti. Provedeno je i nekoliko istraživanja s ciljem opisa raznolikosti cijanobakterija korištenjem protočne citometrije (120–123).

Raznolikost prokariotskog pikoplanktona južnog Jadrana slabo je istražena. Opisana je sezonska dinamika fitoplanktonskih zajednica (124), sezonska dinamika bakterijske proizvodnje i metaboličkog kapaciteta (125) te raznolikost bakterija u površinskim obalnim vodama južnog Jadrana koristeći metodu sekvenciranja nove generacije što je omogućilo detekciju brojnih, ali i rijetkih skupina (126). Sezonske promjene zajednica bakterija i arheja južnog Jadrana do sada nisu opisane. U obalnom području srednjeg Jadrana provedeno je tek jedno istraživanje sezonske raznolikosti pikoplanktonske zajednice primjenom protočne citometrije i analize CARD-FISH (127).

Sezonska dinamika bakterijskih zajednica sjevernog Jadrana bolje je istražena. Celussi i sur. su koristeći metodu DGGE-a opisali sezonske promjene u bakterijskoj zajednici površinskih voda sjevernog Jadrana (128) i Tršćanskog zaljeva (129). Također, Simonato i sur. su opisali bakterijsku raznolikost Venecijanske lagune u dva različita razdoblja u godini (130). Sezonska dinamika pikoplanktonske zajednice obalnih voda okolice Rovinja opisana je korištenjem protočne citometrije i metode DGGE povezane sa sekvenciranjem gena za 16S rRNA najizraženijih vrpci (131). Zajednica je opisana u pridnenom sloju i površinskim vodama. Klad SAR11 pokazao je veću prisutnost u pridnenom sloju što se povezuje s prodorom srednjejadranske oligotrofne vode u ovo područje, za razliku od razreda *Gammaproteobacteria* koji je detektiran jedino ljeti u površinskom sloju što se povezuje s dotokom vode bogate nutrijentima iz rijeke Po. Tinta i sur. su proveli opsežnu analizu sezonske promjene bakterijske zajednice Tršćanskog zaljeva tijekom dvogodišnjeg razdoblja koristeći metodu DGGE-a te sekvenciranje knjižnica klonova (132). Povezali su opis raznolikosti bakterijskih zajednica s okolišnim čimbenicima te utvrdili utjecaj fitoplanktonskih cvatova i nutrijenata porijeklom iz slatkih voda na strukturu zajednice. Istraživanje usporedbe bakterijskih zajednica morskih i jezerskih čestica provedeno je uz ostala istraživana područja i na transektu rijeke Po (Rovinj-ušće rijeke Po) (133). U estuariju rijeke Krke istraživani su fitoplanktonska zajednica (36, 134), bakterijska brojnost, aktivnost i

biomasa (135, 136) te fizikalni i kemijski parametri (32–35, 38, 137, 138), međutim struktura i dinamika zajednice bakterija ili arheja nije opisana. Koristeći protočnu citometriju određena je količina čestica u estuariju čime je utvrđena dominacija čestica organskog porijekla manjih od 2  $\mu\text{m}$  (139). Također, koristeći protočnu citometriju opisana je akumulacija pikoplanktona duž halokline te povećanje pikoplanktonske biomase ljeti (140). Opisana je i veća koncentracija klorofila *a* u sloju iznad halokline koji potječe od slatkovodnog fitoplanktona. Tonjenjem stanica slatkovodnog fitoplanktona dolazi do njegove akumulacije uz gornju granicu halokline i propadanja zbog povećanja saliniteta što uzrokuje porast koncentracije feofitina (produkata razgradnje klorofila *a*) i partikulatnog organskog ugljika (17, 36).

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

---

Bakterije i arheje su genetički raznoliki mikroorganizmi koji sadrže skupine s različitom ekološkom funkcijom (1). Upravo zbog velike funkcionalne raznolikosti važni su medijatori globalnih ciklusa elemenata. Ekološka istraživanja koja za cilj imaju opis strukture zajednice organizama omogućuju identifikaciju novih, do sada nepoznatih skupina ili doprinose razumijevanju distribucije i dinamike poznatih skupina. Također, opis strukture zajednice osnova je razumijevanja uloge koje pojedine skupine obavljaju u ekosustavu (4).

Prepoznavanje bakterija i arheja te određivanje strukture njihovih zajednica usko je vezano uz korištenje molekularnih metoda zasnovanih na genu za 16S rRNA koje omogućuju prepoznavanje svih do sada poznatih skupina. Također, razvoj metoda sekvenciranja nove generacije omogućuje detaljan opis strukture zajednice te prepoznavanje rijetkih skupina (14). Kombiniranjem metoda sekvenciranja s kvantitativnom analizom CARD-FISH moguće je ostvariti detaljan opis strukture zajednice te odrediti prostorne i vremenske promjene zajednice.

Sezonska dinamika bakterija u Jadranskom moru istraživana je uglavnom u obalnim vodama sjevernog Jadrana (131, 132) ili posrednim metodama koje ne omogućuju prepoznavanje svih poznatih skupina (128). Cilj rada bio je istražiti sezonske promjene strukture zajednice bakterija u tri različita područja Jadranskog mora: južnom Jadranu, sjevernom Jadranu i estuariju rijeke Krke, koristeći metode 454 pirosekvenciranja gena za 16S rRNA i analizu CARD-FISH, koje omogućuju detaljan opis raznolikosti. Hipoteze koje su postavljene bile su specifične za svako istraživano područje:

1. zajednica bakterija i arheja u južnom Jadranu pokazuje promjenu raznolikosti ovisnu o promjeni hidrografskih uvjeta kao i sezonsku varijabilnost
2. rijeka Po zajedno sa sezonskim hidrografskim promjenama ima utjecaj na strukturu i dinamiku bakterijskih zajednica sjevernog Jadrana
3. protok rijeke Krke i gradijent saliniteta povezani s ostalim čimbenicima okoliša koji ih prate glavni su čimbenici koji određuje strukturu bakterijske zajednice u estuariju rijeke Krke.

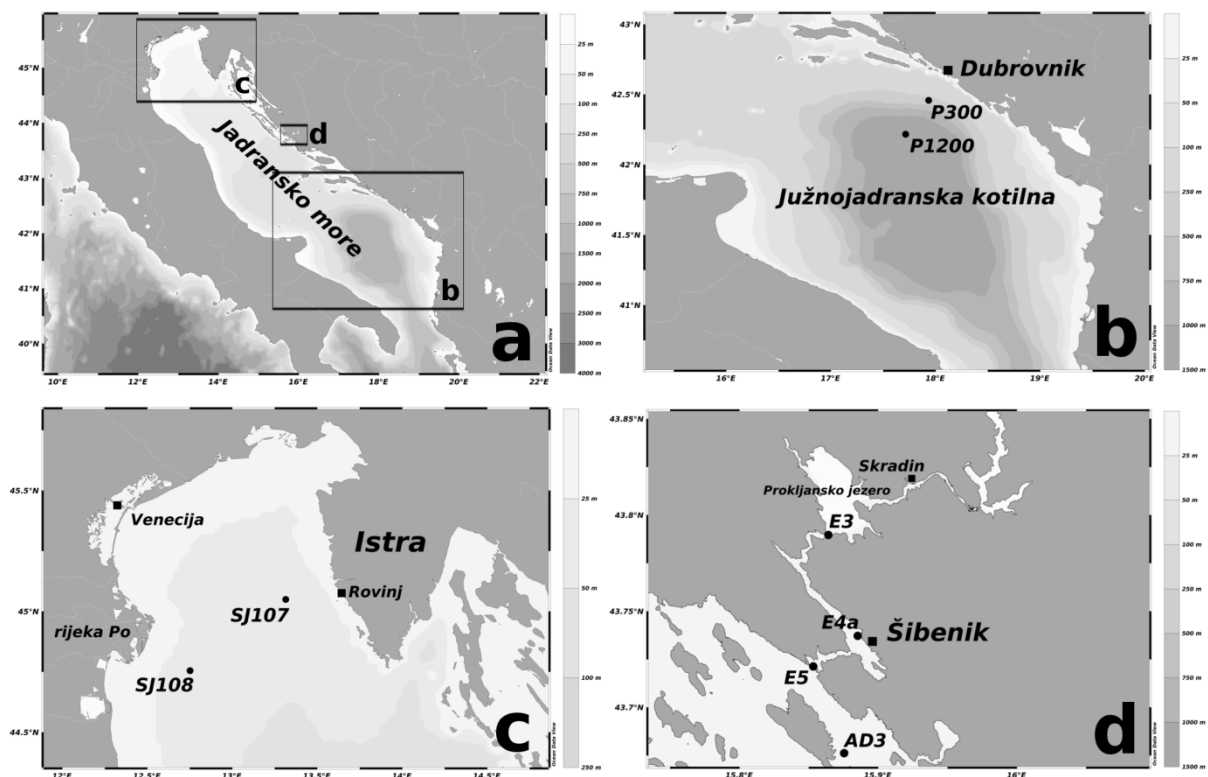


## **4. MATERIJALI I METODE**

---

#### 4.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je provedeno na tri različita područja Jadranskog mora: južnom Jadranu, sjevernom Jadranu i estuariju rijeke Krke (Slika 4). Uzorkovanje za određivanje prokariotske pikoplanktonske zajednice i abiotičkih čimbenika južnog Jadrana provedeno je istraživačkim brodom Naše more na postaji P300 (42°27'32"S, 17°56'02"E), smještenoj na rubu Južnojadranske kotline i uglavnom pod snažnim utjecajem LIW-a, i P1200 (42°13'01"S, 17°42'50"E), unutar Južnojadranske kotline, 3. listopada 2011. te 18. veljače, 29. ožujka, i 10. rujna 2012. Dodatna uzorkovanja za određivanje abiotičkih čimbenika provedena su 12. siječnja i 30. svibnja 2012. Uzorkovanje za određivanje prokariotske pikoplanktonske zajednice i abiotičkih čimbenika sjevernog Jadrana provedeno je istraživačkim brodom Vila Velebita na postajama SJ108 (44°45'40"S, 12°45'00"E) i SJ107 (45°02'90"S, 13°19'00"E). Uzorkovano je 19. svibnja, 18. kolovoza, 14. rujna, 17. listopada, 17. studenog 2011. i 18. siječnja 2012. Dodatna uzorkovanja za određivanje abiotičkih čimbenika provedena su 13. lipnja i 12. srpnja 2011. Uzorkovanje u estuariju rijeke Krke za određivanje prokariotske pikoplanktonske zajednice i abiotičkih čimbenika provedeno je istraživačkim brodom Hidra



**Slika 4.** Istraživana područja Jadranskog mora (a): južni Jadran (b), sjeverni Jadran (c) i estuarij rijeke Krke (d). Na svakom području naznačene su postaje na kojima su vršena uzorkovanja.

na postaji AD3 (43°40'35"S, 15°52'30"I), izvan utjecaja rijeke i postajama E5 (43°43'15.72"S, 15°51'11.28"I), E4a (43°44'13.73"S, 15°53'05.11"I) i E3 (43°47'22.40"S, 15°51'49.02"I), smještenim u samom estuariju, 25. veljače i 8. srpnja 2013. Dubine uzorkovanja za određivanje abiotičkih čimbenika kao i prokariotske pikoplanktonske zajednice na svim istraživanim područjima naznačene su na grafičkim prikazima rezultata. Također, broj uzorka za određivanje prokariotske pikoplanktonske zajednice na svakom istraživanom području primjenom 454 pirosekvenciranja i analize CARD-FISH prikazan je u Tablica 1. Detaljni podaci o uzorkovanjima za određivanje prokariotske pikoplanktonske zajednice primjenom 454 pirosekvenciranja (Prilog, Tablica I) i analize CARD-FISH (Prilog, Tablica III) dani su u priložima.

**Tablica 1.** Broj uzoraka za određivanje prokariotske pikoplanktonske zajednice primjenom 454 pirosekvenciranja i analize CARD-FISH svakog istraživanog područja.

	ukupno (sva istraživana područja)	južni Jadran	sjeverni Jadran	estuarij rijeke Krke
<b>br. uzoraka uzetih za CARD-FISH</b>	120	64	28	28
<b>br. uzoraka uzetih za 454 pirosekvenciranje</b>	96	60	8	28
<b>ukupan br. uzoraka (CARD-FISH+454 pirosekvenciranje)</b>	216	124	36	56

## 4.2. Određivanje abiotičkih čimbenika

Temperatura i salinitet mjereni su sa SBE25 CTD (engl. *Conductivity, Temperature, Depth*) sondom (SEA-Bird Electronics Inc., SAD). Dnevni prosječni protok rijeke Po mjereno je na lokalitetu Pontelagoscuro, Italija. Podaci su dobiveni od Upravnog odjela za prostorno uređenje, gradnju i zaštitu okoliša (tal. *Assessorato Programmazione, Pianificazione e Ambiente*) regije Emilia-Romagna, Italija. Određivanje nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ), ortofosfata ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) i ortosilikata ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ) provedeno je prema Stricklandu i Parsonsu (141). Određivanje amonijaka ( $\text{NH}_4^+$ ) provedeno je prema Ivančić i Degobbisu (142), nakon fiksiranja uzoraka otopinom fenola i etanola. Otopljeni anorganski dušik (DIN, engl. *Dissolved Inorganic Nitrogen*) izražen je kao suma koncentracije nitrata, nitrita i amonijaka. Koncentracija partikulatnog organskog ugljika (POC, engl. *Particulate Organic Carbon*; veličinska frakcija  $>0,7 \mu\text{m}$ ) i otopljenog organskog ugljika (DOC, engl. *Dissolved Organic Carbon*; veličinska frakcija  $<0,7 \mu\text{m}$ ) određena je metodom katalitičke oksidacije pri visokoj temperaturi (HTCO, engl., *High-Temperature Catalytic Oxidation*) (143) koristeći analizator ukupnog organskog ugljika (TOC, engl., *Total Organic Carbon*) TOC-VCPH-5000 (Shimadzu, Japan) koji je povezan s jedinicom za izgaranje krutih uzoraka SSM-5000A (Shimadzu, Japan) prema prethodno objavljenim protokolima (144, 145). Koncentracija klorofila *a* (Chl *a*, engl. *Chlorophyll a*) uzorka iz sjevernog i južnog Jadrana određena je fluorimetrijskom metodom prema Stricklandu i Parsonsu (141) nakon ekstrakcije u 90% acetonu. Uzorak morske vode filtriran je kroz GF/C filtar (Whatman, UK) u slučaju uzorka iz sjevernog Jadrana, dok je u slučaju uzorka iz južnog Jadrana korišten GF/F filtar (Whatman, UK). Koncentracija klorofila *a* uzorka iz estuarija rijeke Krke određena je koristeći visokodjelotvornu tekućinsku kromatografiju (HPLC, engl. *High-Performance Liquid Chromatography*) prema Barlowu i sur. (17).

### 4.3. 454 pirosekvenciranje

1 l morske vode filtrirana je kroz Nucleopore polikarbonatni filtar (Whatman, UK) veličine pore 0,2  $\mu\text{m}$  koristeći peristaltičku crpku. Filtri su pohranjeni u tubice u koje je dodano 1 ml saharoznog pufera (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0,75 M saharoza) i spremljeni u tekući dušik ili na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ekstrakcija DNA provedena je prema Massani i sur. (18). Fragment gena za 16S rRNA (regija V1-V2) sekvenciran je u servisu za sekvenciranje MRDNA (Shallowater, Teksas, SAD) koristeći metodu bTEFAP (engl. *Bacterial 16S rRNA-Based Tag-Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing*) (148) povezanu s GS FLX Titanium 454 pirosekvenciranjem (Roche, Švicarska). Korištene početnice za umnažanje fragmenta bile su 27Fmod (5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3') i 519Rmodbio (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3'). Za razliku od fragmenata gena za 16S rRNA uzoraka iz južnog i sjevernog Jadrana koji su umnoženi i sekvencirani metodom bTEFAP, fragment gena za 16S rRNA uzoraka iz estuarija rijeke Krke (28 uzoraka) umnožen je PCR-om koristeći posebno dizajnirane početnice koje su na 5' kraju genski specifičnih sljedova (27Fmod i 519Rmodbio) sadržavale vezane barkod sljedove specifične za svaki uzorak, na koje su se nastavljali adapterski sljedovi potrebni za vezivanje na agarozne granule (Slika 5). PCR smjesa volumena 25  $\mu\text{l}$  sadržavala je: 1X Green GoTaq Flexi pufer za PCR, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM smjesu NTP-a, 0,15 mg goveđeg serumskog albumina (BSA, engl. *Bovine Serum Albumine*), 0,2  $\mu\text{M}$  svake početnice i 0,625 U Taq polimeraze (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega, SAD). Program umnažanja započinjao je preddenaturacijom 5 min na  $95^{\circ}\text{C}$ , nastavljao se s 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 40 s na  $94^{\circ}\text{C}$ , sparivanja početnica 40 s na  $53^{\circ}\text{C}$  i produljenja lanca 1 min na  $70^{\circ}\text{C}$ , te je završavao konačnim produljenjem lanca 10 min na  $70^{\circ}\text{C}$ . Poznata je sklonost PCR-a k neravnomjernom umnažanju određenog nukleotidnog slijeda u slučajevima kada kalup predstavlja populacija različitih molekula DNA. Kako bi se smanjila sklonost PCR-a k neravnomjernom umnažanju određenog nukleotidnog slijeda svaki je uzorak umnožen u četiri zasebne reakcije. Umnoženi produkti su skupljeni, pročišćeni koristeći Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, SAD) i poslani na GS FLX Titanium i GS FLX+ 454 pirosekvenciranje u servis za sekvenciranje Eurofins (Ebersberg, Njemačka).

27FmA01 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGAGTCGGTAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA02 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCTCGACAAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA03 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACGCACTCAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA04 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACTGTAGAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA05 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA06 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGGAGAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA07 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTGTCTCTAAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA08 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCGCGTGTCAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA10 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTATGCGAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA11 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATACGTCTAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA13 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATAGTAGTAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA14 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAGAGATACAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA15 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATACGACGTAAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA16 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACAGTACTAAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA17 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTCTAGACAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA18 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTACGTAGCAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA19 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTACTACTCAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA20 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGACTACAGAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA21 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTAGACTAGAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA22 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACGAGTATGAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA23 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACTCTCGTAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA24 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGAGACAGAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA25 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCGTCGCTCAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA26 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACATACGGTAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA27 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCGAGTATAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA28 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACTACTTATGTAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA29 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACTGTACAGTAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

27FmA30 5' -CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACTAATACTAGRTTTTGATCMTGGCTCAG-3'

519RmbB 5' -CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGTNTTACNGCGCKGCTG-3'

- adapterski nukleotidni slijed A
- adapterski nukleotidni slijed B
- nukleotidni slijed ključ (engl. *Key Sequence*)
- barkod nukleotidni slijed (10 pb) specifičan za svaki uzorak
- genski specifična lijeva početnica
- genski specifična desna početnica

**Slika 5.** Početnice korištene u PCR-u za umnažanje V1-V2 fragmenta gena za 16S rRNA iz uzoraka estuarija rijeke Krke. Za svaki od 28 uzoraka korištena je zasebna lijeva početnica koja sadrži specifični barkod nukleotidni slijed i univerzalna desna početnica bez barkod nukleotidnog slijeda. Barkod nukleotidni slijedovi označeni brojevima 9 i 12 namjerno su izostavljeni. Nukleotidni slijed ključ (engl. *Key Sequence*) koristi se za prepoznavanje nukleotidnog slijeda i kalibraciju signala.

#### 4.4. Analiza nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA

SFF datoteke (engl. *Standard Flowgram Format*) ekstrahirane su pomoću `sff_extract` skripte (dostupno na [http://bioinf.comav.upv.es/sff\\_extract/index.html](http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/index.html)) koristeći `sff_extract -c` naredbu koja omogućuje provjeru kvalitete nukleotidnih sljedova prilikom ekstrakcije. Datoteke FASTA sortirane su na temelju ugrađenih barkod sljedova u zasebne datoteke koristeći softver `mothur` (55). Nukleotidni sljedovi koji se nisu u potpunosti podudarali s nukleotidnim slijedom barkoda ili genski specifične lijeve početnice odstranjeni su u koraku sortiranja. Dobivene FASTA datoteke koje su sadržavale sve sekvencirane nukleotidne sljedove specifične za pojedini uzorak procesirane su prema Ionescu i sur. (149) `SILVAngs` softverom (<https://www.arb-silva.de/ngs>) (150). Ukratko, nukleotidni sljedovi sravnjeni su sa SILVA bazom nukleotidnih sljedova (SILVA small-subunit [SSU] rRNA SEED) koristeći softver `SINA` (engl. *SILVA Incremental Aligner*) (151). Sljedovi s lošom kvalitetom sravnjenja (`SINA`: identitet sravnjenja manji od 50 i rezultat sravnjenja manji od 40) odstranjeni su kao potencijalne kontaminacije ili artefakti. Dodatno, odstranjeni su svi nukleotidni sljedovi kraći od 200 pb, s više od 2% višeznačnih nukleotida ili s više od 2% homopolimera. Identificirani su identični nukleotidni sljedovi (proces dereplikacije) i grupirani u OTU-e na 97% identiteta slijeda koristeći program `cd-hit-est` (verzija 3.1.2; <http://www.bioinformatics.org/cd-hit>) (152) u *accurate* načinu rada ignorirajući nesravnjene dijelove. Reprezentativni nukleotidni slijed svakog OTU-a klasificiran je usporedbom s bazom SILVA SSU Ref (verzija 115; <http://www.arb-silva.de>) koristeći `BLASTn` softver (verzija 2.2.22+ ili 2.2.28+; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (153) uz standardne postavke.

#### 4.5. CARD-FISH

Uzorci morske vode fiksirani su formaldehidom u konačnoj koncentraciji 1-2% (v/v) 24 h na 4°C. Određeni volumen fiksiranog uzorka (60-120 ml; ovisno o brojnosti prokariotskog pikoplanktona) filtriran je kroz Isopore polikarbonatne filtre (promjer 47 mm; GTTP Millipore, SAD) veličine pora 0,2 µm koji su potom pohranjeni na -20°C. Analiza CARD-FISH provedena je prema Pernthaler i sur. (42) uz neznatne promjene. Filtri su uklopljeni u 0,2% agarozu niskog tališta, osušeni na zraku, dehidrirani 96% etanolom (1 min na sobnoj temperaturi) i ponovno osušeni na zraku. Permeabilizacija bakterijske stanične stijenke provedena je inkubacijom filtara u otopini lizozima (10 mg ml<sup>-1</sup>; Fluka, Njemačka)

1 h na 37°C. Inaktivacija endogenih peroksidaza provedena je inkubiranjem filtara u metanolu s dodatkom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,15%) 30 min na sobnoj temperaturi. Filtri su isprani u vodi čistoće MQ (1 min, sobna temperatura), dehidrirani u 96% etanolu (1 min, sobna temperatura), osušeni na zraku i izrezani u trokutaste dijelove. Svaki izrezani dio hibridiziran je s određenom hibridizacijskom DNA sondom kovalentno vezanom za peroksidazu iz korijena hrena. Hibridizacija je provedena u 400 µl hibridizacijskog pufera (0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7,5], 10% dekstranov sulfat [w/v; Sigma-Aldrich, SAD], 0,01% natrijev dodecil sulfat [SDS, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*], 1% reagens za blokiranje [Roche, Švicarska]) u koji je dodan formamid određene koncentracije specifičan za svaku sondu (X [v/v]; Fluka, Njemačka; Tablica 2) i 1,3 µl otopine sonde (8,4 pmol µl<sup>-1</sup> sonde kovalentno vezane za peroksidazu iz korijena hrena u TE puferu; Biomers, Njemačka) 2 h na 46°C. Osim sa specifičnim sondama za pojedine filogenetske skupine hibridizacija je provedena i sa sondom NON338 (komplementarna sonde EUB338) kako bi se utvrdila potencijalna nespecifična hibridizacija. Nevezane ili nespecifično vezane sonde isprane su inkubacijom filtara u 50 ml pufera za ispiranje (X mM NaCl [specifičan za svaku sondu; Tablica 2]), 5 mM EDTA [pH 8,0], 20 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,01% SDS [w/v]) 15 min na 48°C. Filtri su isprani u 1x fosfatnom puferu (PBS, engl. *Phosphate-Buffered Saline*; pH 7,6) 15 min na sobnoj temperaturi. Amplifikacija tiramidnog signala provedena je inkubiranjem filtara u amplifikacijskom puferu s tiramidnim supstratom. U 1000 dijelova amplifikacijskog pufera (0,8x PBS, 0,08% reagens za blokiranje, 1,6 M NaCl, 8% dekstranov sulfat) u koji je dodan svježe pripremljen 0,0015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 1x PBS-u dodan je 1 dio otopine tiramidne boje Alexa488 (1 mg ml<sup>-1</sup> u dimetilformamidu s 20 mg ml<sup>-1</sup> *p*-jodofenilborne kiseline [IPBA, engl. *iodophenylboronic acid*]; Invitrogen, SAD). Amplifikacija signala provedena je 45 min na 46°C. Filtri su isprani u 1x PBS-u (10 min, sobna temperatura), kratko isprani u MQ vodi, dehidrirani u 96% etanolu (1 min, sobna temperatura) i osušeni na zraku. Po nekoliko filtara položeno je na jedno predmetno stakalce i uklopljeno u reagens koji sprječava slabljenje signala (3 dijela Citifluor-a [Citifluor, UK], 1 dio VECTASHIELD Mounting Medium-a H-1000 [Vector Laboratories, SAD] uz dodatak boje DAPI [4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid] u konačnoj koncentraciji od 1 µg ml<sup>-1</sup>). Signali na filtrima brojani su na epifluorescentnom mikroskopu Nikon Eclipse 50i koji je opremljen prikladnim filtrima za DAPI i Alexa488 do minimalno 1000 DAPI signala (Prilog, Tablica III).



Tablica 2. Sonde i uvjeti primijenjeni u analizi CARD-FISH.

sonda	ciljna skupina	nukleotidni slijed (5'→3')	formamid (%) <sup>a</sup>	NaCl-a u puferu za ispiranje (mM) <sup>b</sup>	referenca
ARCH915	<i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	35	80	(154)
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	80	(155)
EUB338-II	dodatak sonde EUB338	GCAGCCACCCGTAGGTGT	35	80	(156)
EUB338-III	dodatak sonde EUB338	GCTGCCACCCGTAGGTGT	35	80	(156)
NON338	kontrola	ACTCCTACGGGAGGCAGC	35	80	(157)
HGC69a	<i>Actinobacteria</i>	TATAGTTACCACCGCCGT	25	159	(158)
CF319a	<i>Bacteroidetes</i>	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35	80	(159)
SAR202-312R	SAR202 clade	TGTCTCAGTCCCCCTCTG	40	56	(109)
CYA664	<i>Cyanobacteria</i>	GGAATTCCTCTGCCCC	35	80	(160)
PRO405	<i>Prochlorococcus</i>	AGAGGCCTTCGTCCCTCA	40	56	(161)
SYN405	<i>Synechococcus</i>	AGAGGCCTTCATCCCTCA	40	56	(161)
SAR406-97	SAR406 clade	CACCCGTTCCGCAGTTTA	40	56	(162)
ALF968	<i>Alphaproteobacteria</i>	GGTAAGTCTCTGCGCGTT	35	80	(163)
ROS537	<i>Roseobacter</i>	CAACGCTAACCCCTCC	35	80	(71)
SAR11-152R <sup>c</sup>		ATTAGCACAAAGTTTCCYCGTGT			(66)
SAR11-441R(ori) <sup>c</sup>		TACAGTCATTTTCTCCCCGAC			(66)
SAR11-441R(mod) <sup>c</sup>	SAR11 clade	TACCGTCATTTTCTCCCCGAC	25	159	(66)
SAR11-487(mod) <sup>c</sup>		CGGACCTTCTTATTCGGG			(67)
SAR11-542R <sup>c</sup>		TCCGAACTACGCTAGGTC			(66)
SAR11-732R <sup>c</sup>		GTCAGTAATGATCCAGAAAGYTG			(66)
BET42a <sup>d</sup>	<i>Betaproteobacteria</i>	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35	80	(164)
SAR324-1412	SAR324 clade	GCCCTGTCAACTCCCAT	35	80	(67)
GAM42a <sup>e</sup>	<i>Gammaproteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	35	80	(164)
SAR86-1245	SAR86 clade	TTAGCGTCCGTCTGTAT	35	80	(165)

<sup>a</sup>koncentracija formamida (v/v) u hibridizacijskom puferu<sup>b</sup>koncentracija NaCl-a (mM) u puferu za ispiranje<sup>c</sup>smjesa 6 sonde za detekciju klada SAR11; uključuje neobilježenu pomoćnu sondu SAR11-487-h3 (5'-CGGCTGCTGGCAGCAAGTTAGC-3')<sup>d</sup>uključuje neobilježenu kompetitorsku sondu Gam42a (5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3') (164)<sup>e</sup>uključuje neobilježenu kompetitorsku sondu Bet42a (5'-GCCTTCCCACCTTCGTTT-3') (164)

#### 4.6. Statistička obrada podataka

Broj OTU-a, Chao1 i ACE (engl. *Abundance-Based Coverage Estimator*) procjenitelji te Shannon-ov indeks raznolikosti izračunati su nakon postupka normalizacije zbog neravnomjerne raspodjele broja nukleotidnih sljedova u uzorcima (Prilog, Tablica II). Najmanji broj nukleotidnih sljedova u skupu podataka za svako istraživano područje slučajno je uzorkovan iz svakog uzorka. *Turnover* zajednica izračunat je nakon postupka normalizacije jednostavnim određivanjem udjela OTU-a koji se pojavljuju u dvije uzastopne sezone. Sezonske razlike u bogatstvu OTU-a, Chao1 i ACE procjenitelja kao i Shannon-ovog indeksa raznolikosti testirane su metodom jednosmjerne ANOVA-e (engl. *One-Way Analysis of Variance*). Normalna distribucija i homogenost varijance testirani su Lilliefors-ovim i Levene-ovim testom. U slučaju značajnih sezonskih razlika (ANOVA) značajnost razlike između pojedinih prosječnih vrijednosti analizirana je Tukey-ovim HSD (engl. *Honestly Significant Difference*) testom. Dvosmjerna ANOVA (engl. *Two-Way Analysis of Variance*) korištena je kako bi se utvrdile sezonske i prostorne razlike u udjelu nukleotidnih sljedova pojedine taksonomske skupine i brojnosti stanica filogenetskih skupina detektiranih analizom CARD-FISH. Prilikom usporedbe prostornih razlika uzeti su u obzir samo uzroci dobiveni s istih dubina na različitim postajama (južni Jadran <200 m). Jednosmjerna i dvosmjerna ANOVA provedene su koristeći softver Systat 12 (Systat Software Inc., SAD). U svim analizama OTU-ovi koji su klasificirani kao kloroplastna DNA nisu uzeti u obzir.

Kako bi se utvrdio utjecaj *singletona*, nukleotidnih sljedova bez srodnika i udruživanja sljedova u različite taksonomske kategorije, na procjenitelje bakterijske raznolikosti, konstruirani su i međusobno uspoređeni različiti setovi podataka. Iz ukupnog seta podataka izlučeni su: set podataka bez *singletona* (OTU-singl.), set podataka koji sadrži isključivo taksonomski klasificirane OTU-e (OTUklas., ne sadrži sljedove bez srodnika) te setovi podataka OTU-a grupiranih na različitim taksonomskim razinama, od koljena do roda. Nadalje, kako bi se usporedila metoda 454 pirosekvenciranja i analiza CARD-FISH udio pojedine taksonomske skupine detektirane analizom CARD-FISH (Tablica 2) izlučen je iz seta podataka dobivenog 454 pirosekvenciranjem te je uspoređen s udjelom istih taksonomskih skupina detektiranih analizom CARD-FISH (udio je izražen kao postotak signala EUB338I-III). OTU-ovi klasificirani kao kloroplastna DNA nisu uzeti u obzir. Matrice udaljenosti izračunate su na temelju relativnih udjela koristeći Bray-Curtis-ov

indeks (166) te su uspoređene koristeći Pearson-ov koeficijent korelacije. Značajnost usporedbe utvrđena je Mantel-ovim testom (1000 permutacija) iza kojeg je slijedila Bonferroni-jeva korekcija. Analiza NMDS (engl. *Non-Metric Multidimensional Scaling*) uzoraka iz estuarija rijeke Krke provedena je na taksonomskoj razini OTU-a na temelju matrica udaljenosti izračunatih iz relativnih udjela pojedinog OTU-a koristeći Bray-Curtis-ov indeks. Sve analize izvršene su u R programskom okruženju (<http://www.r-project.org/>) koristeći programski paket vegan (<http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>) kao i vlastite naredbe.

Nukleotidni sljedovi gena za 16S rRNA iz južnog Jadrana pohranjeni su u bazi nukleotidnih sljedova ENA (engl. *European Nucleotide Archive*) pod pristupnim brojevima od ERS536204 do ERS536263.

## **5. REZULTATI**

---

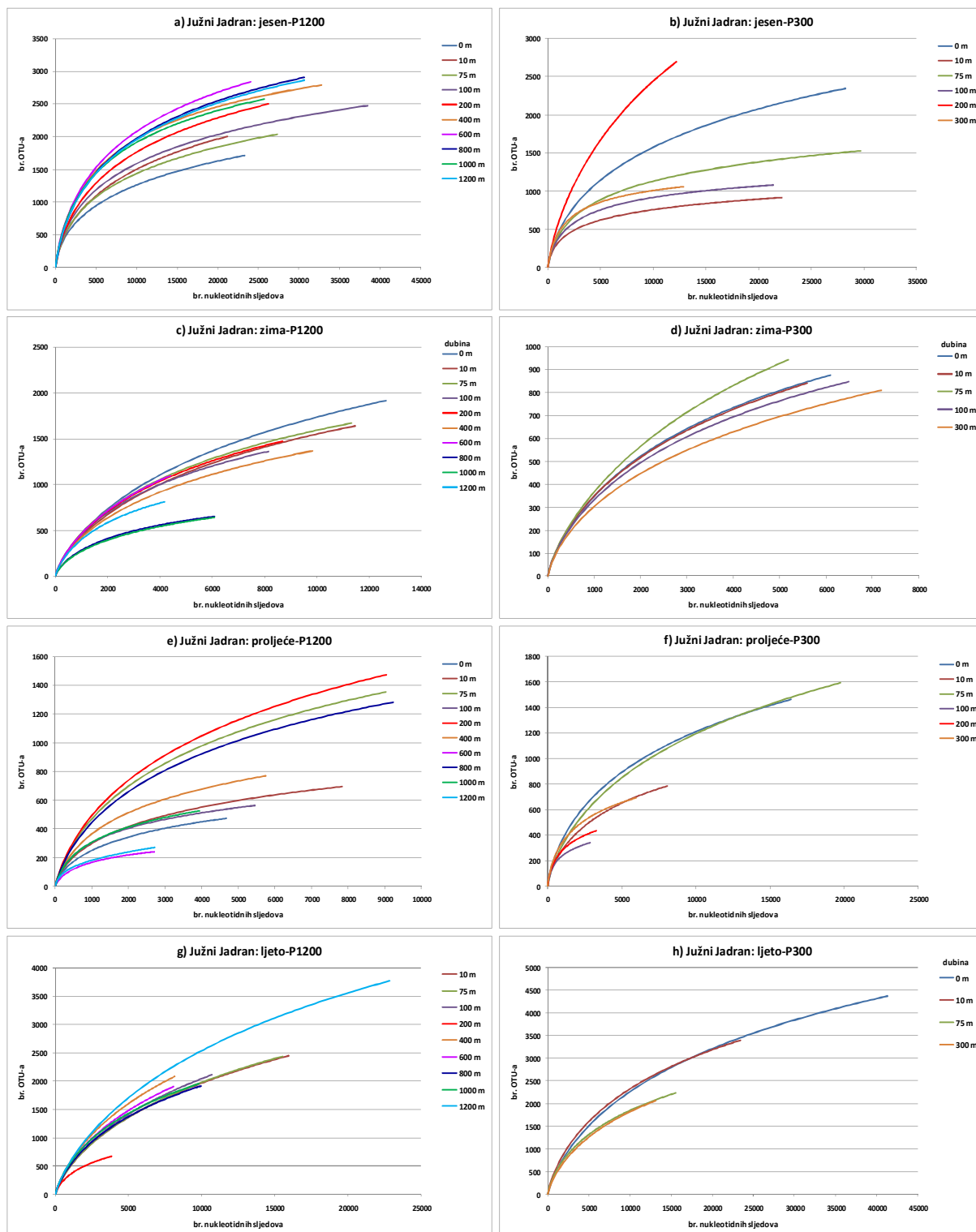
### 5.1. 454 pirosekvenciranje u opisu bakterijskih zajednica

454 pirosekvenciranje 96 uzoraka rezultiralo je dobivanjem 1 324 294 nukleotidnih sljedova (u prosjeku  $13\,795 \pm 8\,134$  nukleotidnih sljedova po uzorku). Raspon broja nukleotidnih sljedova po uzorku kretao se od 2 895 do 41 363, a prosječna duljina nukleotidnog slijeda bila je  $429 \pm 34$  pb. U prosjeku,  $38 \pm 44$  nukleotidnih sljedova uklonjeno je u postupku kontrole kvalitete tijekom analize. Velika je većina nukleotidnih sljedova uspješno taksonomski klasificirana (u prosjeku  $13\,405 \pm 7\,955$  nukleotidnih sljedova po uzorku) koristeći SILVAngs softver. Svaki je uzorak u prosjeku sadržavao  $1\,503 \pm 796$  OTU-a (97% identiteta slijeda), od kojih je u prosjeku 36% bilo *singleton*-a (OTU koji se pojavljuje sa samo jednim nukleotidnim slijedom u cijelom skupu podataka; Tablica 3; Prilog, Tablica I). Broj dobivenih nukleotidnih sljedova nije bio dovoljan kako bi se opisala cjelokupna bakterijska raznolikost što je uočljivo iz krivulja razrjeđenja, koje nisu dosegle zasićenje ni kod uzoraka s najvećim brojem nukleotidnih sljedova (Slika 6 i 7).

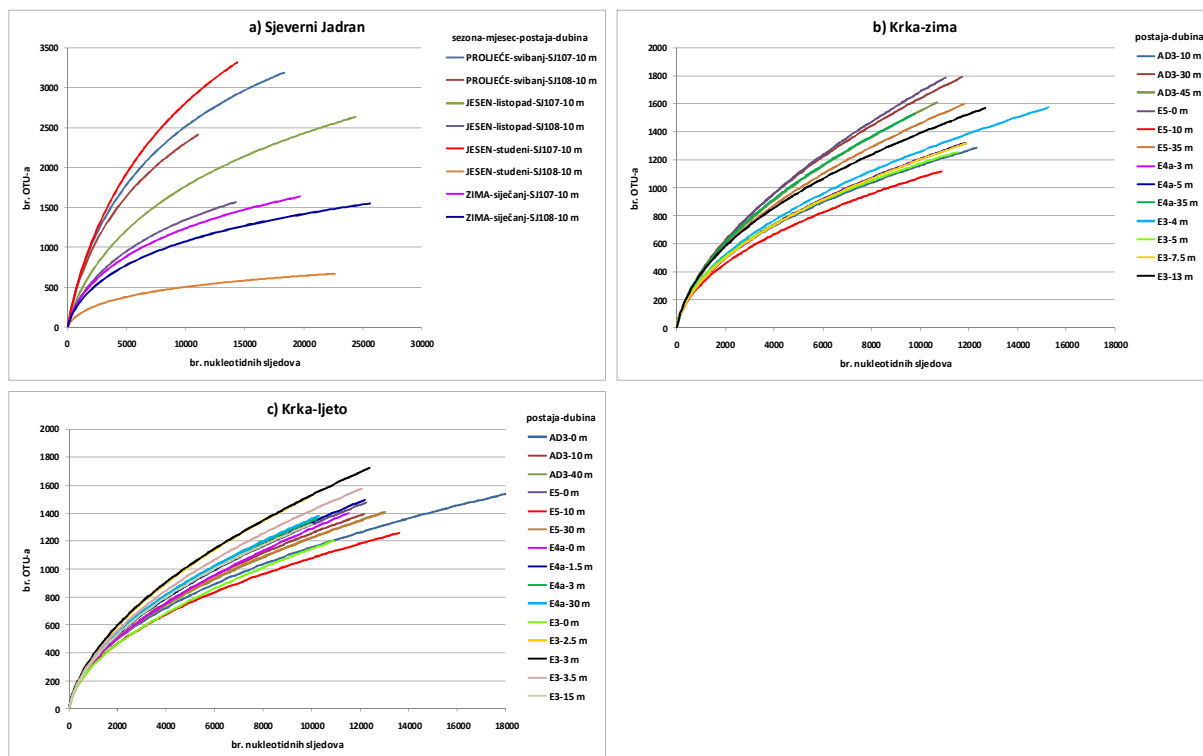
**Tablica 3.** Podaci o 454 pirosekvenciranju i analizi nukleotidnih sljedova.

karakteristika sekvenciranja i analize	prosječno $\pm$ SD	raspon
<b>duljina nukleotidnih sljedova</b>	430 $\pm$ 34	351-471
<b>br. nukleotidnih sljedova</b>	13801 $\pm$ 8051	2895-41363
<b>br. taksonomski klasificiranih nukleotidnih sljedova</b>	13412 $\pm$ 7873	2663-40498
<b>br. nukleotidnih sljedova bez srodnika</b>	351 $\pm$ 385	31-3292
<b>br. nukleotidnih sljedova uklonjenih u postupku kontrole kvalitete</b>	38 $\pm$ 44	2-243
<b>br. OTU-a (97% identiteta nukleotidnog slijeda)</b>	1503 $\pm$ 796	234-4209
<b>br. <i>singleton</i>-a<sup>a</sup></b>	547 $\pm$ 312 (36%)	51-1561 (15-51%)

<sup>a</sup>vrijednosti u zagradama predstavljaju udio *singleton*-a u ukupnom broju OTU-a



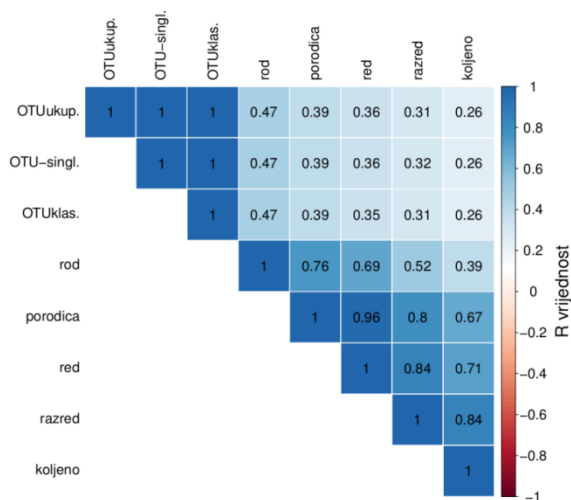
**Slika 6.** Krivulje razrjeđenja bakterijskih zajednica južnog Jadrana na različitim dubinama, na postajama P1200 (a, c, e, g) i P300 (b, d, f, h), u jesen 2011. (a, b) te zimi (c, d), u proljeće (e, f) i ljeti (g, h) 2012.



**Slika 7.** Krivulje razrjeđenja bakterijskih zajednica sjevernog Jadrana (a) i estuarija rijeke Krke (b, c). Uzorkovanje sjevernog Jadrana provedeno je tijekom više sezona i mjeseci 2011. na postaji SJ107 i SJ108. Estuarij rijeke Krke uzorkovan je zimi (b) i ljeti (c) 2013. na više postaja i dubina.

## 5.2. Usporedba strukture zajednice određene 454 pirosekvenciranjem i analizom CARD-FISH

Kako bi se utvrdila sličnost između određivanja strukture zajednice primjenom 454 pirosekvenciranja i analize CARD-FISH te utjecaj uklanjanja *singleton*-a i nukleotidnih sljedova koji nisu taksonomski klasificirani, te grupiranja OTU-a na više taksonomske razine, konstruirani su različiti setovi podataka koji su uspoređeni s Pearson-ovim korelacijskim koeficijentom (Slika 8 i 9). Usporedbom setova podataka sa i bez *singleton*-a te seta podataka samo s klasificiranim OTU-ovima nije uočena promjena korelacijskog koeficijenta ( $R=1$ ,  $p<0,005$ ) što upućuje na zaključak da uklanjanje *singleton*-a i neuspješno klasificiranih OTU-a nema utjecaja na promjenu strukture podataka o bakterijskoj zajednici. Usporedbom setova podataka na razini OTU-a i setova podataka u kojima su OTU-ovi grupirani u više taksonomske razine (rod-koljeno) uočen je pad korelacijskih koeficijenata što upućuje na zaključak da grupiranje OTU-a u više taksonomske razine i naknadna analiza podataka ima utjecaja na određivanje raznolikosti zajednice.

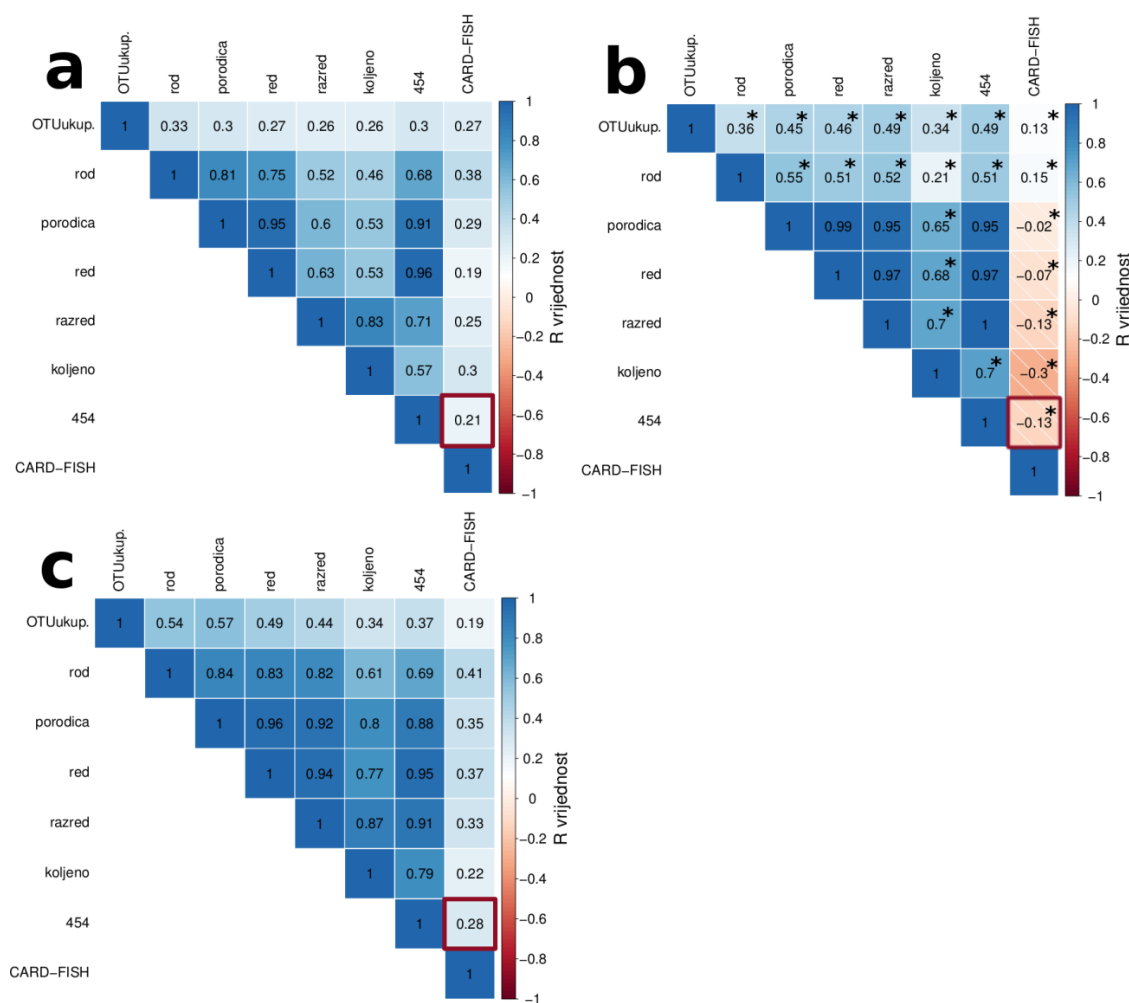


**Slika 8.** Usporedba različitih setova podataka dobivenih 454 pirosekvenciranjem Pearson-ovim korelacijskim koeficijentom. Izvršena je usporedba setova podataka sa (OTUukup.) i bez *singleton*-a (OTU-singl), samo s taksonomski klasificiranim nukleotidnim sljedovima (bez nukleotidnih sljedova klasificiranih kao „bez srodnika“) te s OTU-ovima grupiranim na različitim taksonomskim razinama od roda do koljena. Značajnost korelacije određena je Mantel-ovim testom (1000 permutacija). Sve razlike između setova podataka bile su statistički značajne ( $p<0,05$ ).

Kako bi se usporedili podaci dobiveni 454 pirosekvenciranjem i analizom CARD-FISH uspoređen je set podataka dobiven analizom CARD-FISH, koji je sadržavao udjele pojedinih testiranih taksonomskih skupina izražene kao udio signala dobivenih korištenjem



sondi EUB338I-III, te set podataka dobiven 454 pirosekvenciranjem (iz svih podataka izlučeni su udjeli istih taksonomskih skupina koje su detektirane analizom CARD-FISH). Ovako dobiveni setovi podataka uspoređeni su sa setovima podataka u kojima su OTU-ovi grupirani u više taksonomske razine. Zbog različitog seta sonda koje su korištene u svakom istraživanom području izvršena je zasebna usporedba za svako istraživano područje. U južnom Jadranu ( $R=0,21$ ,  $p<0,05$ ) i estuariju rijeke Krke ( $R=0,28$ ,  $p<0,05$ ) uočena je blaga pozitivna korelacija između seta podataka dobivenog 454 pirosekvenciranjem i seta podataka dobivenog analizom CARD-FISH, za razliku od sjevernog Jadrana gdje je uočena vrlo blaga negativna korelacija ( $R=-0,13$ ,  $p>0,05$ ), koja međutim nije bila statistički značajna.



**Slika 9.** Usporedba setova podataka o raznolikosti bakterija dobivenih 454 pirosekvenciranjem i analizom CARD-FISH za južni (a) i sjeverni (b) Jadran te estuarij rijeke Krke (c). Taksonomske skupine koje su detektirane u analizi CARD-FISH izlučene su iz podataka 454 pirosekvenciranja te međusobno uspoređene Pearson-ovim korelacijskim koeficijentom (označeno crvenim kvadratima). Dodatno, ovako dobiveni setovi podataka uspoređeni su s OTU-ovima grupiranim na različitim taksonomskim razinama. Značajnost korelacije ( $p<0,05$ ) određena je Mantel-ovim testom (1000 permutacija). \*usporedbe nisu statistički značajne.

### 5.3. Južni Jadran

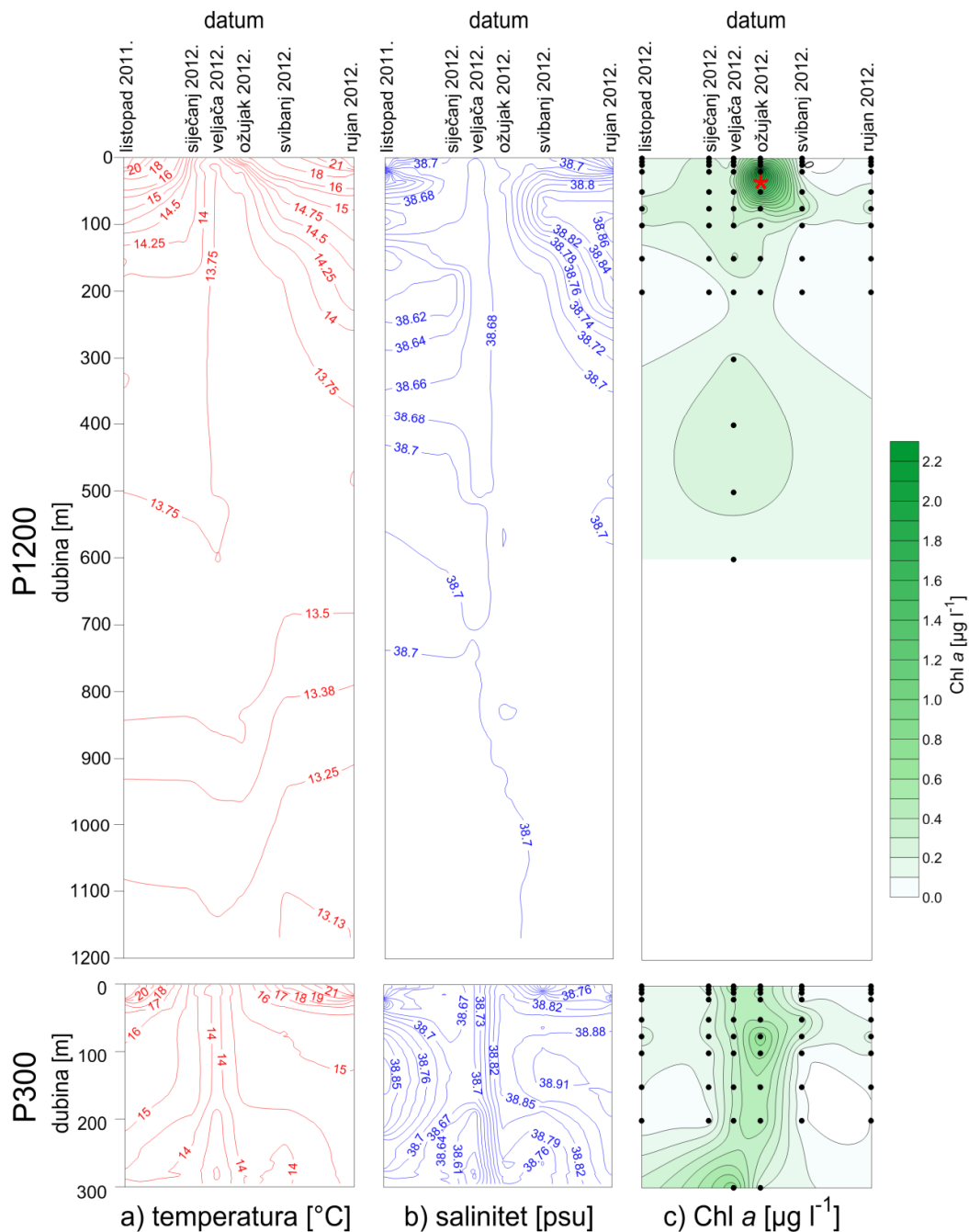
#### 5.3.1. Hidrografija

Temperaturna stratifikacija vodenog stupca bila je postojana tijekom cijele godine, na obje postaje (P1200 i P300), osim zimi 2012. kada je uočeno zimsko miješanje vodenog stupca do 600 m dubine (Slika 10a). Tijekom proljeća 2012. stratifikacija je ponovno uspostavljena u tankom sloju ispod površine. Intenzitet zimskog miješanja bilo je moguće uočiti iz ravnomjerne raspodjele temperature ( $13,75^{\circ}\text{C}$ ) od 10 m do minimalno 500 m kao i iz raspodjele saliniteta od površine do 500-600 m na postaji P1200. Na postaji P300 u istom razdoblju temperatura i salinitet bili su ravnomjerno raspoređeni od površine do 200 m dubine (Slika 10a i 10b). U jesen, prije zimskog miješanja vodenog stupca, samo je postaja na sjevernom rubu Južnojadranske kotline bila pod utjecajem slanijeg LIW-a. Nakon miješanja, tijekom proljeća i ljeta uočeno je pojačavanje utjecaja LIW-a na obje postaje. Koncentracija klorofila *a* varirala je od  $<0,01 \mu\text{g l}^{-1}$  do  $4,87 \mu\text{g l}^{-1}$ . Prije i nakon zimskog miješanja, klorofil *a* detektiran je isključivo u eufotičkoj zoni s koncentracijskim maksimumom u području DCM-a (engl. *Deep Chlorophyll Maximum*), na dubini 50-100 m, dok je za vrijeme zimskog miješanja vodenog stupca detektiran do dubine od 600 m (Slika 10c). Najveća koncentracija klorofila *a* detektirana je u proljeće 2012., na postaji P1200, na 35 m ( $4,87 \mu\text{g l}^{-1}$ ). U isto vrijeme na postaji P300 koncentracijski maksimum na 75 m dubine iznosio je  $0,88 \mu\text{g l}^{-1}$ .

#### 5.3.2. Karakteristike vodenih slojeva

Na obje postaje uočena su tri različita vodena sloja koja su se razlikovala u temperaturi (T), salinitetu (S) i koncentraciji klorofila *a* (Chl *a*). U jesen, eufotička zona (dubina  $<100$  m; T  $17,93 \pm 3,26^{\circ}\text{C}$ ; S  $38,71 \pm 0,11$ ; koncentracija Chl *a*  $>0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ ) se razlikovala od dubokog sloja (dubina  $>100$  m; T  $13,86 \pm 0,63^{\circ}\text{C}$ ; S  $38,71 \pm 0,07$ ; koncentracija Chl *a*  $<0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Zimi, zbog dubokog miješanja vodenog sloja, bilo je moguće odvojiti miješani (dubina  $<600$  m; T  $13,68 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$ ; S  $38,67 \pm 0,04$ ; koncentracija Chl *a*  $>0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ ) od dubokog sloja (dubina  $>600$  m; T  $13,48 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ ; S  $38,71 \pm 0,01$ ; koncentracija Chl *a*  $<0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Kod proljetnog vodenog stupca, zbog ponovne uspostave stratifikacije, bilo je moguće odvojiti eufotičku zonu (dubina  $<200$  m; T  $14,30 \pm 0,56^{\circ}\text{C}$ ; S  $38,77 \pm 0,08$ ; koncentracija Chl *a*  $>0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ ) i duboki sloj (dubina  $>200$  m; T  $13,61 \pm 0,24^{\circ}\text{C}$ ; S  $38,70 \pm 0,03$ ; koncentracija Chl *a*  $<0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Kod ljetnog vodenog stupca, karakteriziranog snažnom stratifikacijom, bilo je također moguće odvojiti eufotičku zonu

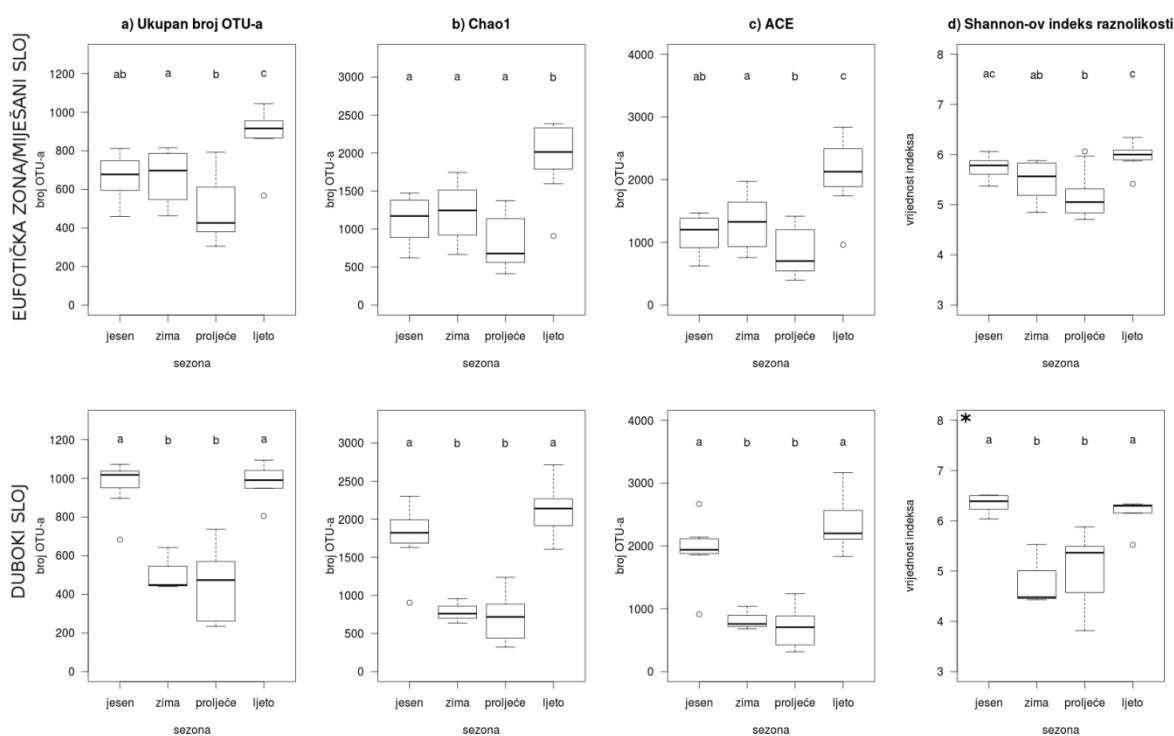
(dubina <200 m; T  $16,07 \pm 2,69^{\circ}\text{C}$ ; S  $38,85 \pm 0,07$ ; koncentracija Chl *a* >0,01  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) od dubokog sloja (dubina, >200 m; T,  $13,63 \pm 0,44^{\circ}\text{C}$ ; S,  $38,72 \pm 0,06$ ; koncentracija Chl *a* <0,01  $\mu\text{g l}^{-1}$ ).



**Slika 10.** Sezonske promjene u temperaturi (a), salinitetu (b) i koncentraciji klorofila *a* (c) na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu. Dubine uzorkovanja označene su točkama; \*ekstremna vrijednost koncentracije klorofila *a* ( $4,87 \mu\text{g l}^{-1}$ ) u proljeće 2012. na 35 m na postaji P1200.

### 5.3.3. Sezonska varijacija bakterijske raznolikosti

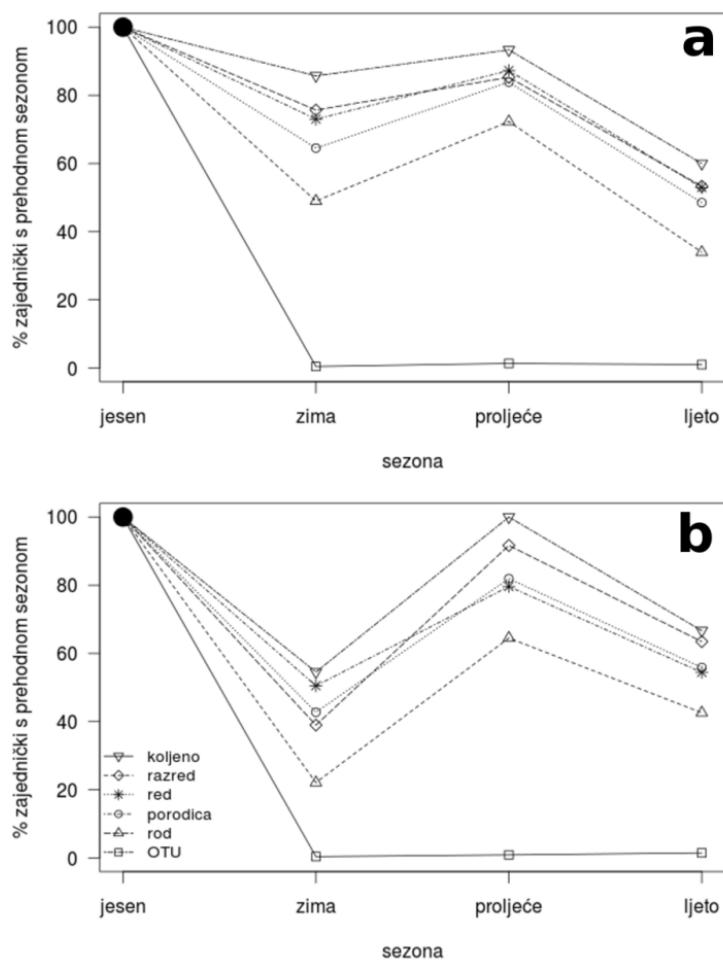
Bogatstvo OTU-a, Chao1, ACE i Shannon-ov indeks raznolikosti značajno su se razlikovali tijekom sezona (ANOVA,  $p < 0,05$ ; Slika 11). U eufotičkoj zoni, bogatstvo OTU-a blago se povećalo od jeseni (Chao1=1 121) do zime (Chao1=1 228), dosežući minimalne vrijednosti u proljeće (Chao1=792) i maksimalne u ljeto (Chao1=2 108). Sličan obrazac promjene uočen je i u dubokom sloju. Jesenske i ljetne vrijednosti Chao1 bile su bitno veće od zimskih i proljetnih (Slika 11).



**Slika 11.** Sezonska promjena ukupnog broja OTU-a bakterija (a), procjenitelja Chao1 (b) i ACE (c) te Shannon-ovog indeksa raznolikosti (d) u eufotičkoj zoni/miješanom sloju i dubokom sloju južnog Jadrana. Sezonske razlike testirane su metodom ANOVA. Različita kombinacije slova označavaju značajne razlike ( $p < 0,05$ , Tukey-ev HSD test); \*-varijanca nije bila homogena.

Kako bi se utvrdilo koliki dio zajednice ostaje nepromijenjen u eufotičkoj zoni/miješanom sloju i dubokom sloju, iz sezone u sezonu, izračunat je *turnover* zajednica za različite taksonomske kategorije, od koljena do OTU-a (Slika 12). Najveći *turnover* uočen je zimi i ljeti. Udio zajedničkih OTU-a bilo koje dvije uzastopne sezone, u eufotičkoj zoni/miješanom sloju ili dubokom sloju, iznosio je manje od 1,5%, dok je na višim taksonomskim kategorijama udio zajedničkih taksona bio mnogo viši (11-100%). Sličan je obrazac uočen u eufotičkoj zoni/miješanom sloju i dubokom sloju. Jedina uočena razlika bila

je manji broj zajedničkih taksona viših taksonomskih kategorija (rod-koljeno) između jeseni i zime u dubokom sloju u odnosu na eufotičku zonu/miješani sloj. Također, kako bi se odredila dinamika zajednice između dva sloja izračunat je i udio zajedničkih OTU-a između dva sloja za svaku sezonu. Dobivene vrijednosti bile su manje od 2% što odražava visoku varijabilnosti bakterijskih zajednica na razini OTU-a. Nešto veći udio (4,14%) zajedničkih OTU-a između dva sloja uočen je u proljeće odražavajući posljedice dubokog zimskog miješanja vodenog stupca.



**Slika 12.** Turnover bakterijskih zajednica između uzastopnih sezona različitih taksonomskih kategorija u eufotičkoj zoni/miješanom sloju (a) i dubokom sloju (b). Udio zajedničke nepromijenjene bakterijske zajednice izračunat je nakon normalizacije skupa podataka i udruživanja nukleotidnih sljedova uzoraka koji pripadaju pojedinom sloju. Taksonomska kategorija OTU predstavlja sve OTU-e koji su uspješno taksonomski klasificirani (OTU-i bez srodnika nisu uzeti u obzir).

### 5.3.4. Sezonska varijacija brojnosti i raznolikosti bakterija i arheja

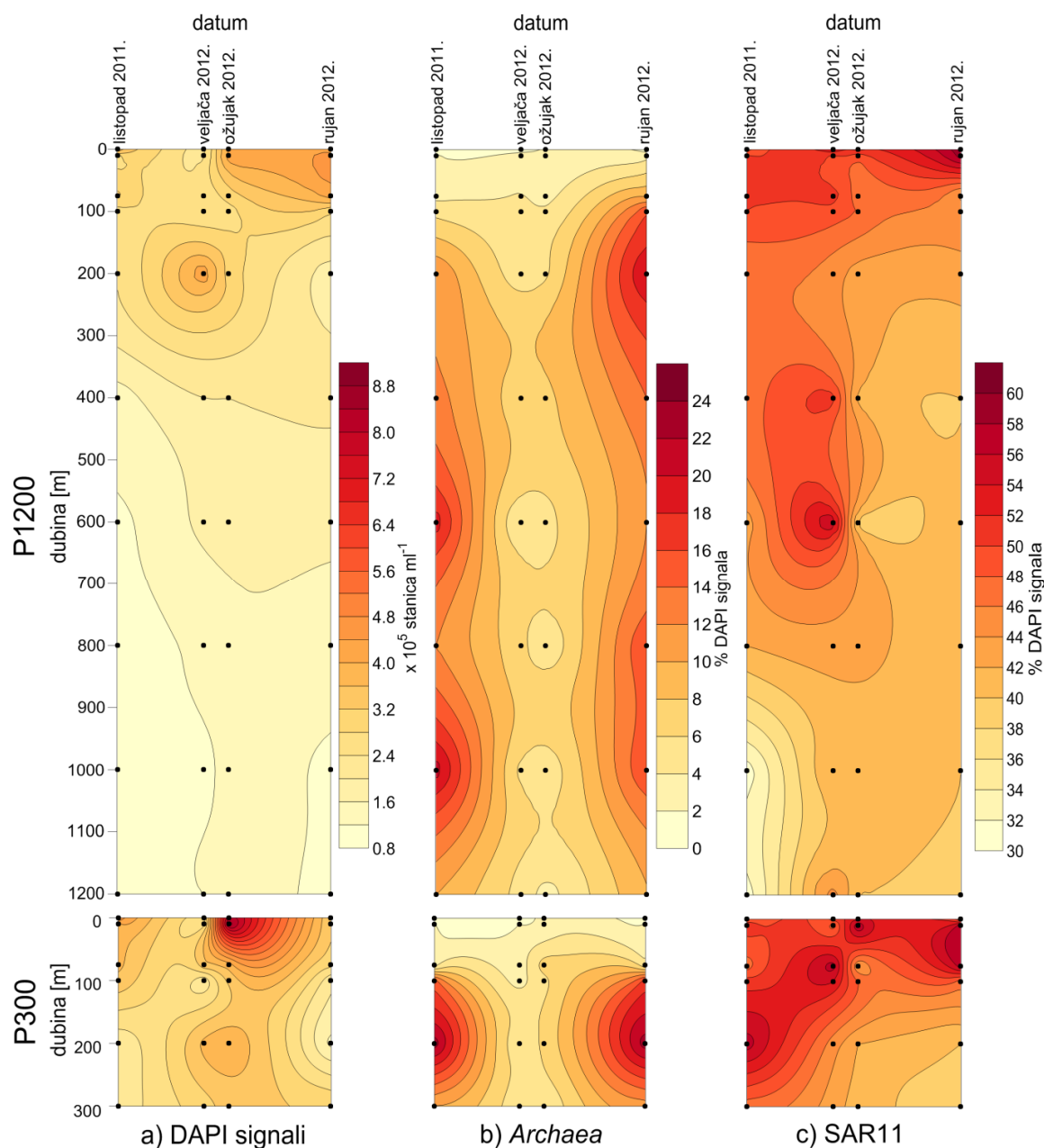
Sezonske varijacije u zajednici prokariotskog pikoplanktona određene su klasificiranjem referentnog nukleotidnog slijeda svakog OTU-a (koristeći SILVAngs softver) i primjenjujući analizu CARD-FISH sa sondama za najznačajnije taksonomske skupine. Za najzastupljenije skupine (klad SAR11, razred *Gammaproteobacteria*, klad SAR86, koljeno *Bacteroidetes* i *Cyanobacteria*), detektirane 454 pirosekvenciranjem i analizom CARD-FISH, pronađene su značajne sezonske, ali ne i prostorne razlike (dvosmjerna ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Brojnost prokariotskog pikoplanktona varirala je od  $0,94 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$  do  $8,6 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$  (Slika 13a). U jesen, broj stanica bio je veći u eufotičkoj zoni ( $3,6 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) u odnosu na duboki sloj ( $1,5 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ). Broj stanica prokariotskog pikoplanktona bio je najmanji zimi, tijekom dubokog zimskog miješanja vodenog stupca kada je zabilježen nešto veći broj u miješanom sloju ( $2,7 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) u odnosu na duboki sloj ( $1,1 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ). U proljeće, kada je detektirana visoka koncentracija klorofila *a* u eufotičkoj zoni, broj stanica dosegno je maksimum. Broj stanica bio je veći u eufotičkoj zoni ( $4,5 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) u odnosu na duboki sloj ( $2,0 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ). Ljeto je također bilo karakterizirano većim brojem stanica u eufotičkoj zoni ( $3,1 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) u odnosu na duboki sloj ( $1,8 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ; Slika 13a).

Bakterije su u odnosu na arheje dominirale zajednicama prokariotskog pikoplanktona kroz cijeli vodeni stupac i tijekom svih sezona. Također, veće su vrijednosti brojnosti bakterija pronađene u eufotičkoj zoni/miješanom sloju u odnosu na duboki sloj (Prilog, Slika Va). U prosjeku, bakterije su sačinjavale 60% zajednice prokariotskog pikoplanktona s najvećim zabilježenim vrijednostima u proljeće i ljeto (74%). Brojnost bakterija bila je sličnija u dva istraživana sloja, eufotičkoj zoni i miješanom sloju, tijekom zime. Arheje su bile manje zastupljena skupina u odnosu na bakterije s većom brojnošću zabilježenom u dubokom sloju, posebice u jesen (15%) i ljeti (13%; Slika 13b).

Predstavnici klada SAR11 razreda *Alphaproteobacteria* dominirali su zajednicama tijekom svih sezona (Slika 13c i 14). U eufotičkoj zoni i miješanom sloju sačinjavali su polovicu prokariotske pikoplanktonske zajednice u jesen (50%), zimi (50%), u proljeće (48%) i ljeti (50%). U dubokom sloju brojnost klada SAR11 bila je nešto manje izražena (Slika 13c). Snažna dominacija klada SAR11 odrazila se i na veliki udio nukleotidnih sljedova srodnih

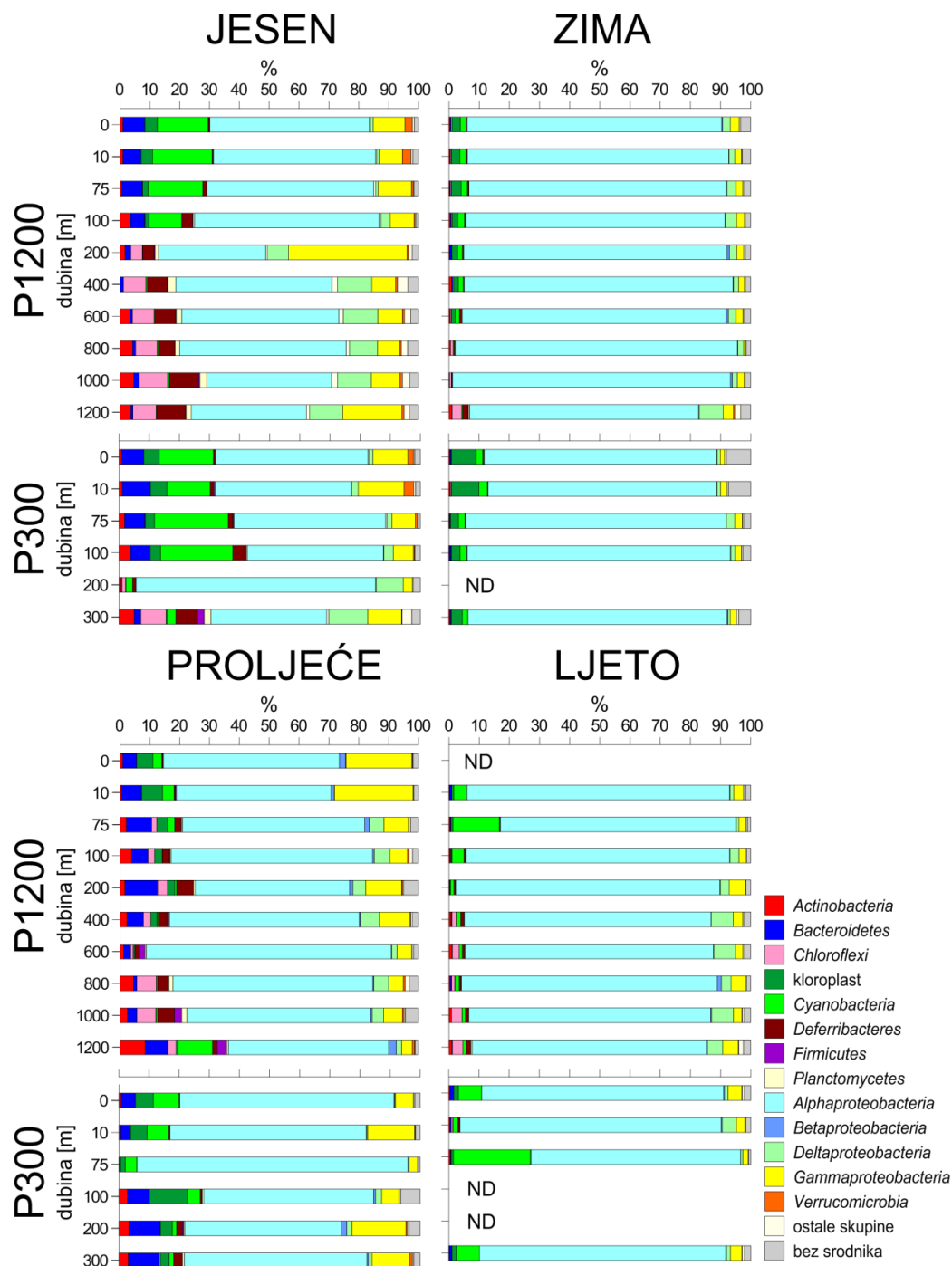
kladu SAR11 u ukupnom broju nukleotidnih sljedova dobivenih 454 pirosekvenciranjem (Prilog, Slika I).



**Slika 13.** Vertikalna i sezonska raspodjela brojnosti stanica prokariotskog pikoplanktona (DAPI signali) (a), arheja (b) i predstavnika klada SAR11 (c) na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu. Udio arheja i predstavnika klada SAR11 prikazan je kao postotak DAPI signala. Dubine uzorkovanja označene su točkama.

Prokariotske pikoplanktonske zajednice eufotičke zone karakterizirao je veliki udio cijanobakterija (Slika 14 i 15a). Cijanobakterije su činile 18% eufotičkih zajednica u jesen, 5,5% u proljeće i 9,1% ljeti, dok je u dubokom sloju njihov udio bio <1%. Zimi, udio cijanobakterija u miješanom sloju bio je <1% za razliku od dubokog sloja gdje signali

karakteristični za cijanobakterije nisu uočeni (Slika 15a). Iz raspodjele nukleotidnih sljedova karakterističnih za dva najzastupljenija morska roda cijanobakterija, rod *Prochlorococcus* i *Synechococcus*, pokušalo se odrediti njihovu sezonsku varijabilnost. U jesen, udio nukleotidnih sljedova karakterističnih za predstavnike roda *Synechococcus* bio je veći iznad



**Slika 14.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih bakterijskih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu.. ND, nije determinirano.

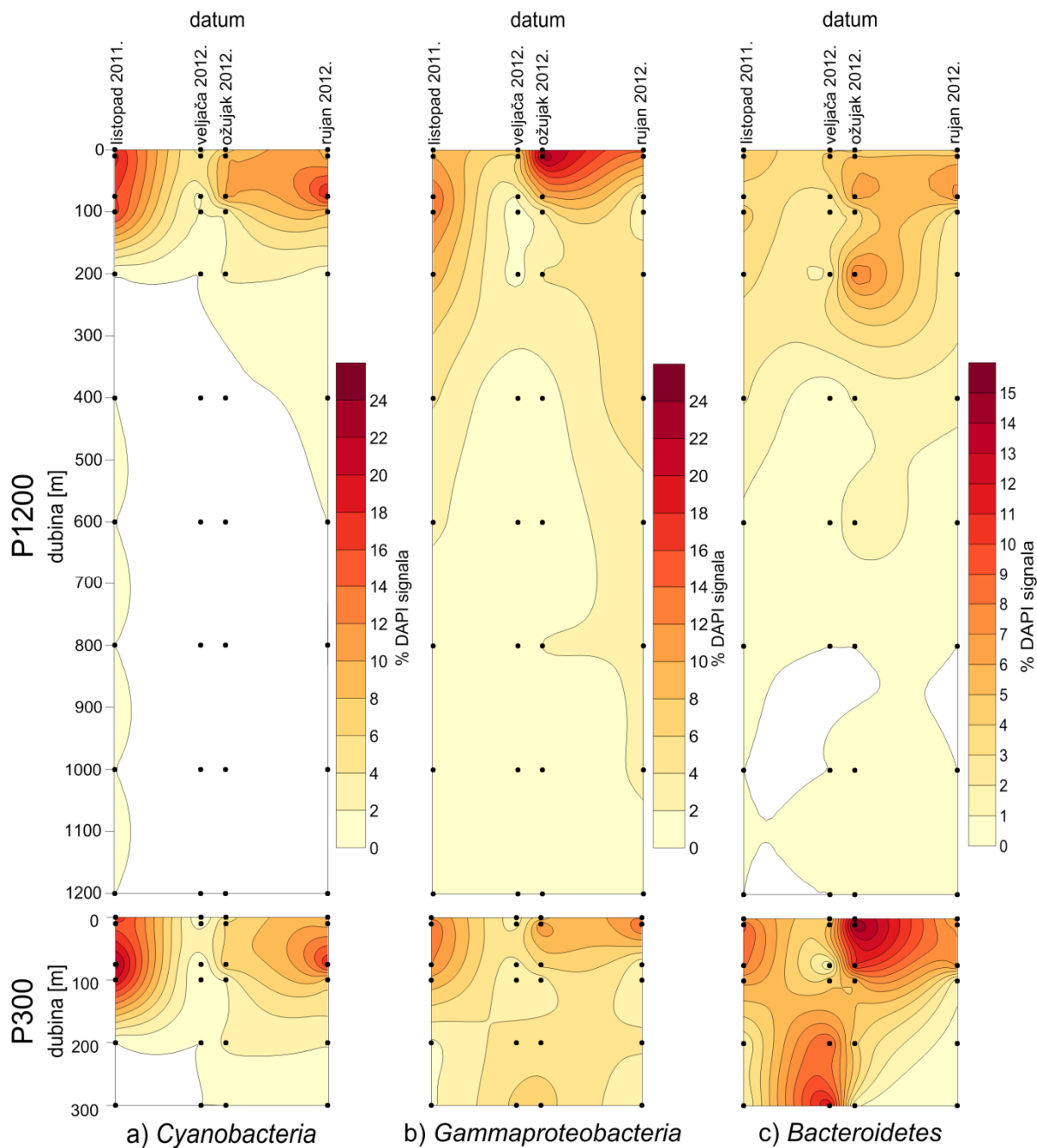


75 m dubine, za razliku od nukleotidnih sljedova karakterističnih za rod *Prochlorococcus* čiji je udio proporcionalno rastao s povećanjem dubine (Prilog, Slika II). Zimi su detektirani gotovo isključivo nukleotidni sljedovi karakteristični za rod *Prochlorococcus*. U proljeće je uočen podjednak udio sljedova karakterističnih za oba roda dok su ljeti nukleotidni sljedovi karakteristični za rod *Prochlorococcus* dominirali slojem DCM-a (75 m; Prilog, Slika II).

Analizom CARD-FISH pokazalo se da je razred *Gammaproteobacteria* bio pretežno prisutan u eufotičkoj zoni tijekom jeseni (12%), proljeća (9,5%) i ljeta (7,4%), za razliku od dubokog sloja gdje je sačinjavao <3% zajednice (Slika 14 i 15b). Tijekom zimskog miješanja vodenog stupca predstavnici ovog razreda činili su <3% zajednice miješanog sloja, a u dubokom sloju signali koji bi potvrđivali njihovu prisutnost nisu uočeni. Najznačajnija detektirana skupina ovog razreda bio je klad SAR86 čiji su predstavnici bili karakteristični za eufotičku zonu/miješani sloj (Prilog, Slika III). Najveća brojnost im je zabilježena u jesen i ljeti (4%) u eufotičkoj zoni, dok su u dubokom sloju, u prosjeku, činili <1% zajednice (Prilog, Slika Vc).

Raspodjela brojnosti koljena *Bacteroidetes* bila je slična onoj razreda *Gammaproteobacteria* s većim udjelom u eufotičkoj zoni/miješanom sloju i najvećim vrijednostima udjela u zajednici zabilježenim u jesen (6%) i proljeće (7,5%; Slika 14 i 15c). Nukleotidni sljedovi karakteristični za red *Flavobacteriales* bili su najzastupljeniji, među kojima su najznačajnije detektirane skupine bile morska skupina NS2b, NS4 i NS5 (Prilog, Slika IV).

Predstavnici klada SAR324 razreda *Deltaproteobacteria* bili su brojni u dubokom sloju s najvećim zabilježenim udjelom u zajednici tijekom ljeta (8,0%). Tijekom stratifikacije vodenog stupca činili su <2% prokariotskog pikoplanktona u eufotičkoj zoni (Prilog, Slika VIa). Klad SAR202 (koljeno *Chloroflexi*) bio je karakterističan za duboki sloj te zimski miješani sloj, za razliku od eufotičke zone gdje je činio <2% prokariotskog pikoplanktona (Prilog, Slika VIb). Najveća brojnost predstavnika ovog klada zabilježena je u dubokom sloju u jesen (8,7%) i zimi (9,3%). Članovi klada SAR406 (koljeno *Deferribacteres*), slično kao i članovi klada SAR324 i SAR202, bili su brojniji u dubokom sloju, posebice ljeti kada su činili 12% prokariotskog pikoplanktona dubokog sloja (Prilog, Slika VIc).

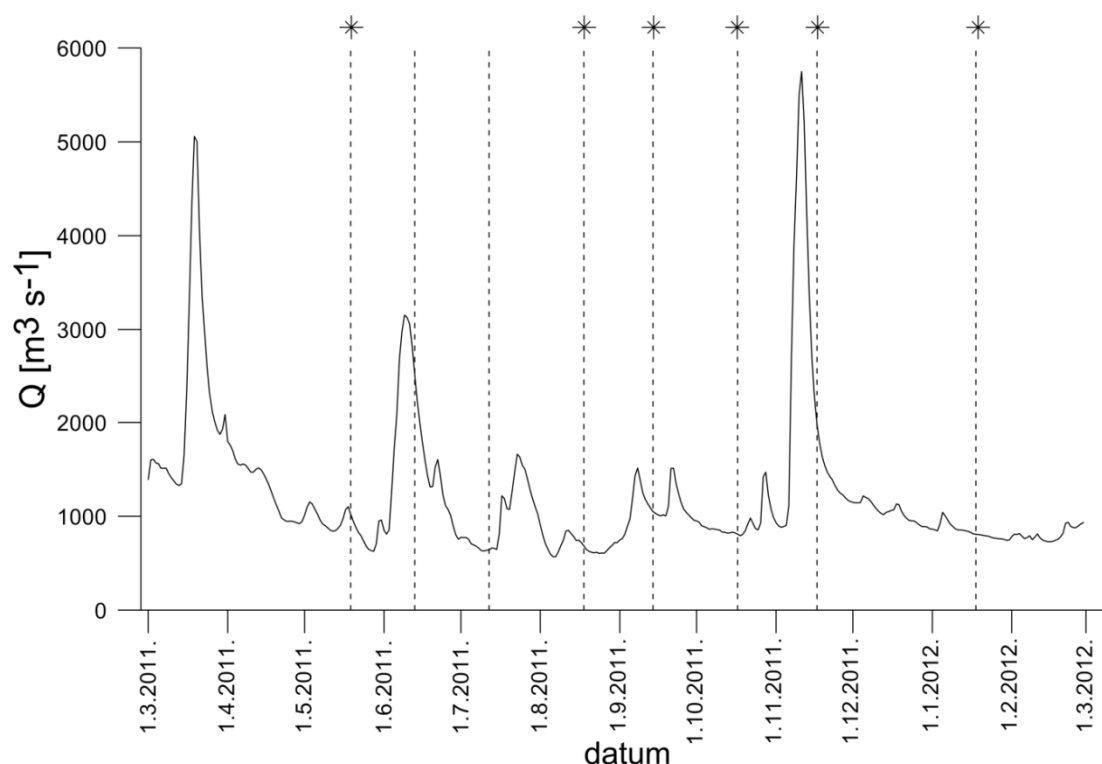


**Slika 15.** Vertikalna i sezonska raspodjela predstavnika koljena *Cyanobacteria*, razreda *Gammaproteobacteria* i koljena *Bacteroidetes* na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu. Udio pojedine skupine prikazan je kao postotak DAPI signala. Dubine uzorkovanja označene su točkama.

## 5.4. Sjeverni Jadran

### 5.4.1. Hidrografija

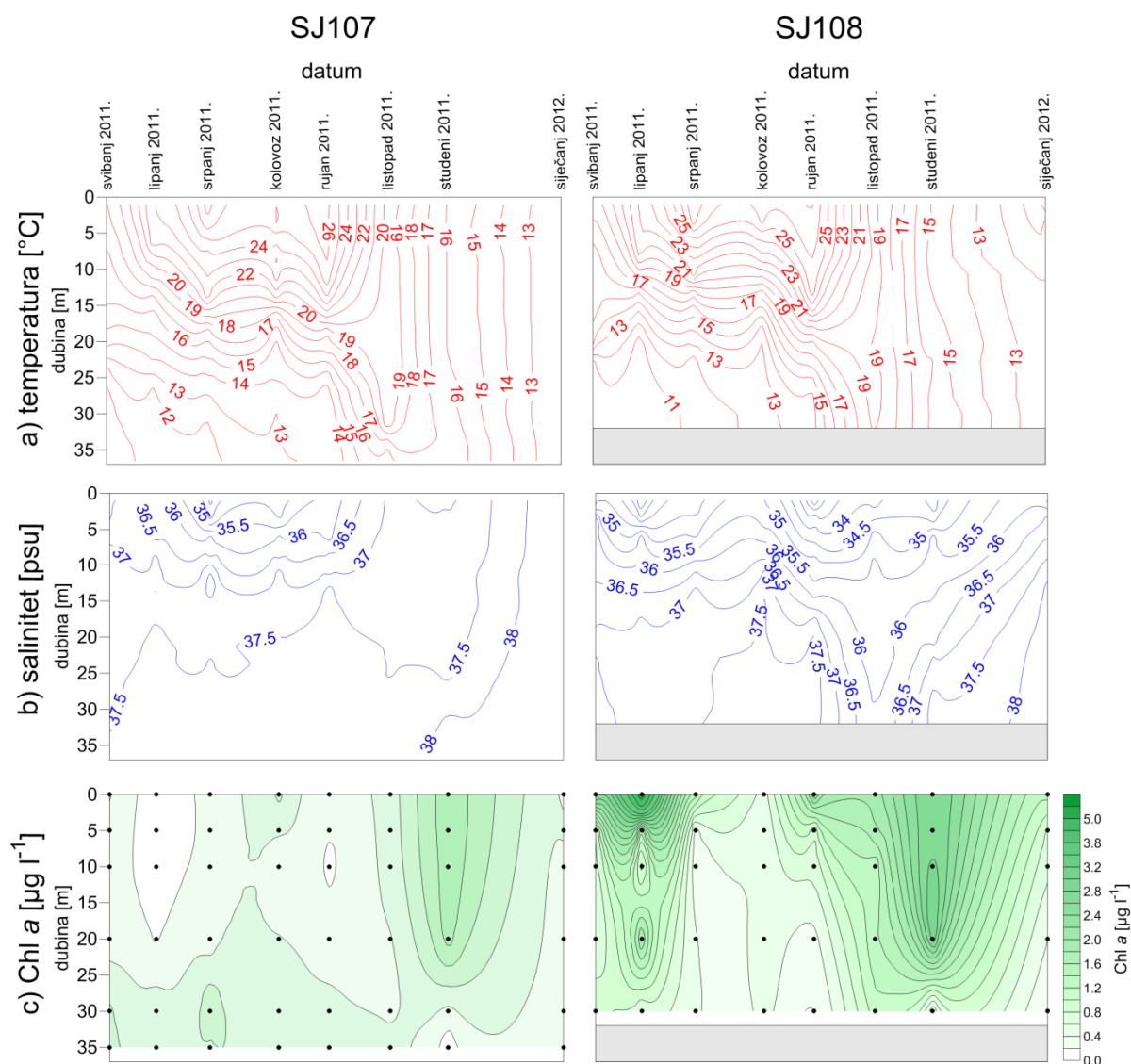
Protok rijeke Po je tijekom istraživanog razdoblja imao tri maksimuma, jedan u ožujku ( $\sim 5000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ), drugi u lipnju ( $\sim 3000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ), te najveći u studenom 2011. ( $\sim 5500 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) (Slika 16). Krajem lipnja protok se smanjio na tipične ljetne razine ( $\sim 800\text{-}1000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ), uz četiri blago snažnija protoka ( $\sim 1500 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ). Nakon studenog 2011., kada su zabilježene najveće vrijednosti, protok se vratio na razine slične ljetnima ( $\sim 800\text{-}1000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ).



**Slika 16.** Protok rijeke Po ( $Q$ ) tijekom istraživanog razdoblja. Isprekidanim crtama označeni su datumi uzorkovanja. Uzorkovanja za određivanje strukture bakterijskih zajednica provedena su na datume dodatno označene zvjezdicama.

Temperaturna stratifikacija u sjevernom Jadranu bila je postojana od svibnja do listopada 2011. na obje postaje: SJ107 i SJ108 (Slika 17a). Površinska se temperatura tijekom razdoblja stratifikacije kretala od  $18,1^\circ\text{C}$  do  $30,5^\circ\text{C}$ , dok je u pridnenom sloju raspon iznosio od  $10,3^\circ\text{C}$  do  $13,6^\circ\text{C}$ . U listopadu je došlo do hlađenja vodenog stupca te je na postaji SJ108 gotov cijeli stupac imao ravnomjernu temperaturu ( $18,9\text{-}19,9^\circ\text{C}$ ). Na postaji SJ107 veći dio vodenog stupca (do  $\sim 30$  m dubine;  $19,5\text{-}19,8^\circ\text{C}$ ) bio je homogen dok je pridneni sloj imao nešto nižu temperaturu ( $15,3\text{-}19,5^\circ\text{C}$ ). Nakon listopada 2011. vodeni je stupac na obje postaje

bio temperaturno homogen. Tijekom ovog razdoblja temperatura se u površinskom sloju kretala od 6,4°C do 19,6°C, dok je u pridnenom sloju raspon iznosio od 12,0°C do 19,7°C.



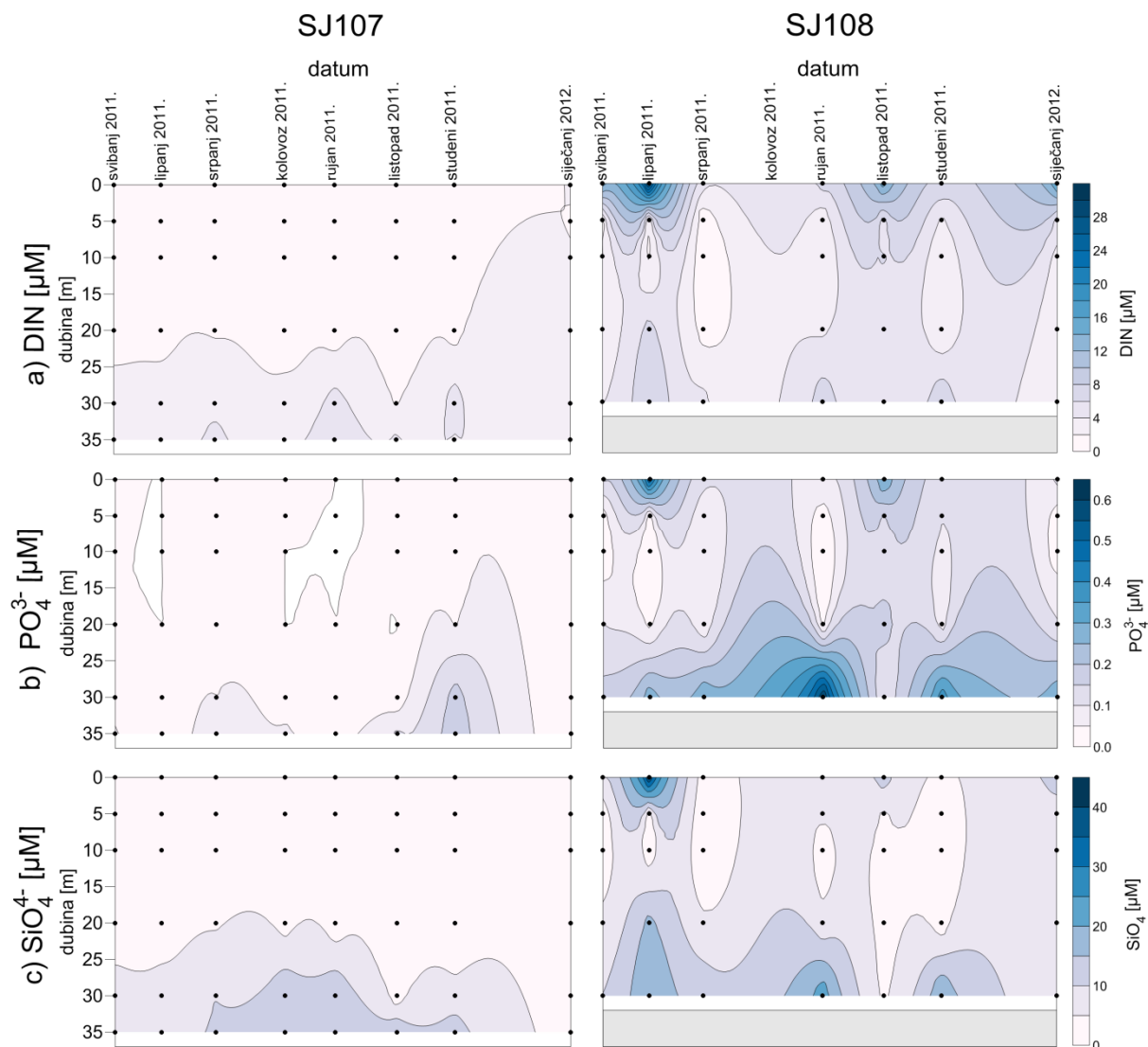
**Slika 17.** Sezonske promjene u temperaturi (a), salinitetu (b) i koncentraciji klorofila *a* (c) na postaji SJ107 i SJ108 u sjevernom Jadranu. Dubine uzorkovanja označene su točkama.

Promjena saliniteta bila je pod snažnim utjecajem rijeke Po (Slika 17b). Postaja SJ108 bila je pod stalnim utjecajem riječne vode (površinski salinitet 18,05-35,34). U pridnenom sloju utjecaj riječne vode bio je slabiji te je raspon saliniteta iznosio od 36,00 do 38,29. U periodu od svibnja do lipnja te od listopada do studenog 2011. zabilježene su smanjene vrijednosti saliniteta kroz cijeli vodeni stupac povezane s povećanim protokom rijeke Po. Na postaji SJ107 utjecaj rijeke Po bio je veći tijekom razdoblja od svibnja do studenog 2011. (površinski salinitet 33,62-37,10). Tijekom istog razdoblja raspon saliniteta u pridnenom sloju

iznosio je od 37,51 do 38,48 odražavajući slabiji utjecaj rijeke Po. U siječnju 2012. salinitet je kroz cijeli vodeni stupac bio gotovo izjednačen (38,47-38,48).

Koncentracija klorofila *a* varirala je od 0,07  $\mu\text{g l}^{-1}$  do 5,73  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Slika 17c). Na postaji SJ107 uočeno je povećanje koncentracije u studenome 2011., nakon miješanja stupca. Povećane vrijednosti koncentracije klorofila *a* uočene su do 20 m dubine dok je raspon koncentracije od površine do 20 m dubine iznosio od 1,05  $\mu\text{g l}^{-1}$  do 1,10  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Na postaji SJ108 uočene su dva povećanja koncentracije: jedan u lipnju 2011., te drugi, uzrokovan miješanjem stupca, u listopadu i studenom 2011. Povećanje u lipnju bilo je najizraženije u površinskom sloju gdje je zabilježena i najveća vrijednost koncentracije od 5,73  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Uočeni jesenski maksimum (listopad-studen) bio je najizraženiji u studenom do dubine od 20 m kada je raspon koncentracije iznosio od 2,66  $\mu\text{g l}^{-1}$  do 2,97  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

Raspodjela koncentracija DIN-a razlikovala se na postaji SJ107 i SJ108 (Slika 18a). Na postaji SJ107 blago povećane koncentracije DIN-a bile su vezane uz pridneni sloj (>25 m dubine; <2,04  $\mu\text{M}$ ) osim u siječnju 2012. kada su nešto veće koncentracije zabilježene kroz cijeli vodeni stupac. Na postaji SJ108 raspodjela je ovisila o dotoku rijeke Po. Povećane vrijednosti zabilježene su u lipnju 2011. (maksimalna zabilježena vrijednost od 29,57  $\mu\text{M}$ ), tijekom jednog od povećanih protoka rijeke Po, te u listopadu 2011., u periodu miješanja stupca. Koncentracije ortofosfata bile su niske, uglavnom vezane uz pridneni sloj (Slika 18b). Na postaji SJ108 veće su vrijednosti zabilježene tijekom povećanih dotoka rijeke Po (lipanj 2011.) dok je maksimalna vrijednost zabilježena u pridnenom sloju u rujnu 2011. (30 m dubine, 0,61  $\mu\text{M}$ ). Raspodjela ortosilikata bila je slična raspodjeli ortofosfata s većim vrijednostima zabilježenim u pridnenom sloju postaje SJ107 i SJ108 te dodatno na postaji SJ108 tijekom povećanih protoka rijeke Po (Slika 18c). Maksimalna vrijednost zabilježena je u površinskom sloju u lipnju 2011. te je iznosila 41,42  $\mu\text{M}$ .

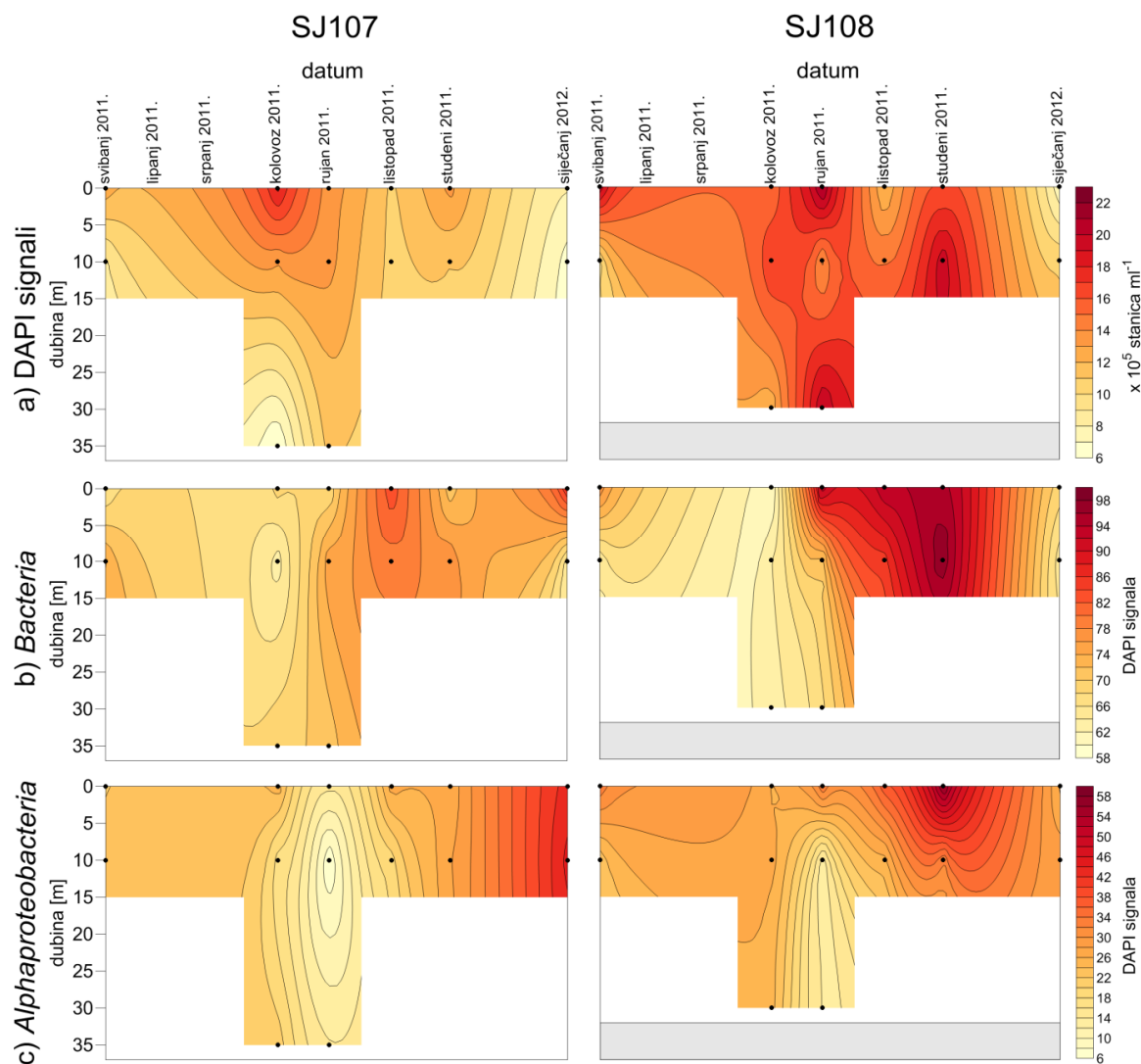


**Slika 18.** Sezonske promjene koncentracije DIN-a (engl. *Dissolved Inorganic Nitrogen*) (a), ortofosfata (b) i ortosilikata (c) na postaji SJ107 i SJ108 u sjevernom Jadranu. Dubine uzorkovanja označene su točkama.

#### 5.4.2. Sezonska raznolikost bakterija

Raznolikost bakterija u sjevernom Jadranu određena je klasificiranjem svakog reprezentativnog nukleotidnog slijeda što je bila osnova za selekciju sondi u analizi CARD-FISH kojom je određena brojnost najzastupljenijih skupina. Osim toga, određivanjem broja OTU-a u svakom uzorku podvrgnutom 454 pirosekvenciranju omogućen je detaljan uvid u bogatstvo OTU-a. Uzorci za 454 pirosekvenciranje uzeti su u svibnju, listopadu i studenom 2011. te siječnju 2012. na postaji SJ107 i SJ108 na 10 m dubine. U proljeće (svibanj 2011.) uočeno je ujednačenije bogatstvo OTU-a na obje postaje (Prilog, Tablica II). Na postaji SJ108 zabilježena je nešto veća vrijednost ( $\text{Chao1}=3\ 566$ ) u odnosu na postaju SJ107

(Chao1=3 109). Od listopada 2011. do siječnja 2012. bogatstvo OTU-a bilo je veće na postaji SJ107 (Chao1=1 777-4 331) u odnosu na postaju SJ108 (Chao1=788-1 914). Vrijednost Chao1 procjenitelja od samo 788 OTU-a, zabilježenu u studenom 2011. na postaji SJ108, treba uzeti s oprezom zbog vrlo velikog udjela cijanobakterijskih nukleotidnih sljedova (>90%) u ovom uzorku. Najveća vrijednost bogatstva OTU-a zabilježena je u studenom 2011. na postaji SJ107 te je iznosila 4 331 OTU.



**Slika 19.** Vertikalna i sezonska raspodjela brojnosti stanica prokariotskog pikoplanktona (DAPI signali) (a), bakterija (b) i razreda *Alphaproteobacteria* (c) na postaji SJ107 i SJ108 u sjevernom Jadranu. Udio bakterija i razreda *Alphaproteobacteria* prikazan je kao postotak DAPI signala. Dubine uzorkovanja označene su točkama.

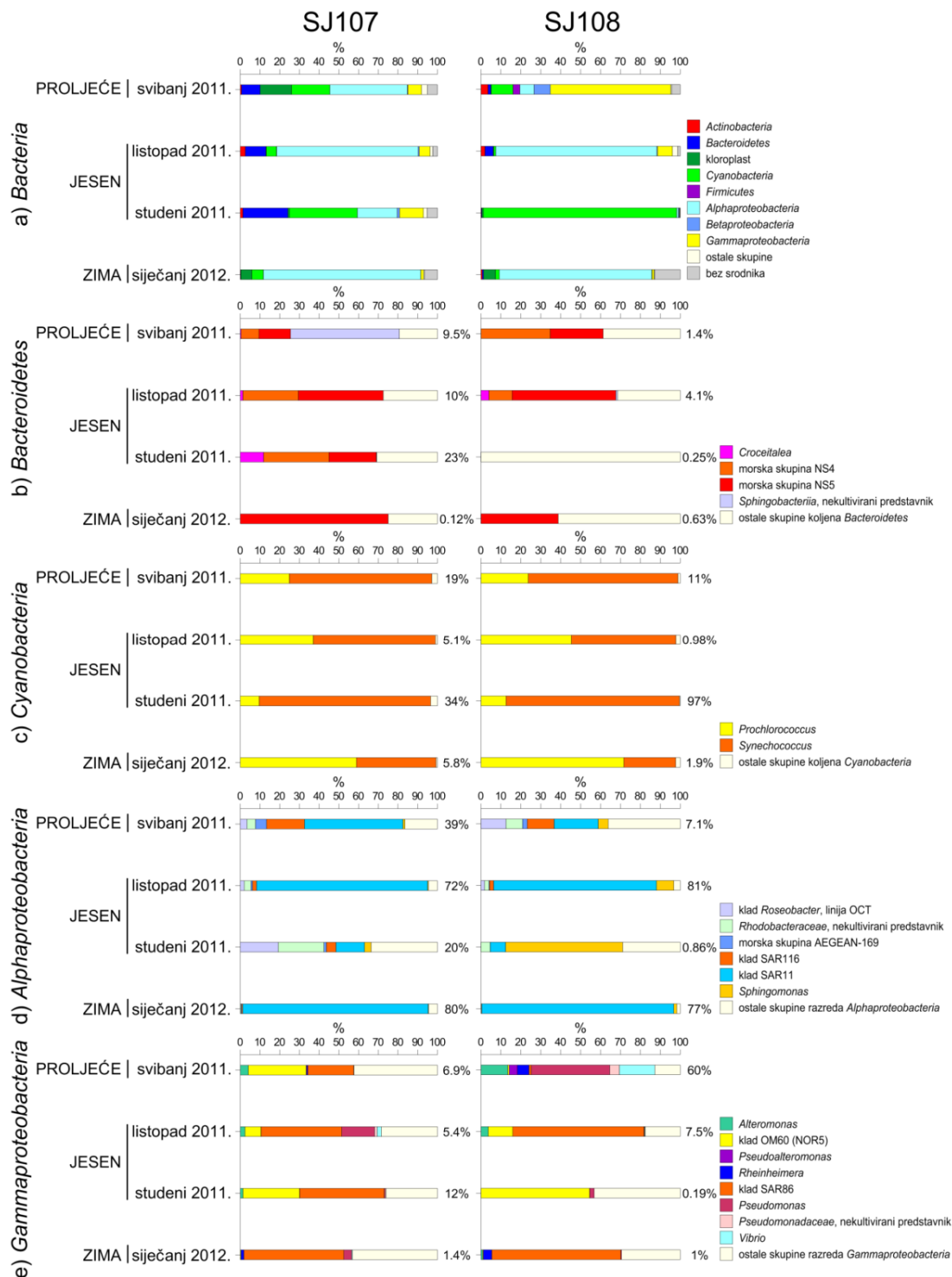
Brojnost prokariotskog pikoplanktona varirala je od  $6,0 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$  do  $21 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$  (Slika 19a). Veće su vrijednosti zabilježene u površinskom sloju (0-10 m) tijekom ljeta (SJ107  $13 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ , SJ108  $16 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) u odnosu na zimski površinski

sloj (0-10 m; SJ107  $10 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ , SJ108  $13 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ). U studenom 2011., nakon miješanja stupca, uočeno je povećanje brojnosti stanica na obje postaje u odnosu na listopad 2011. i siječanj 2012.

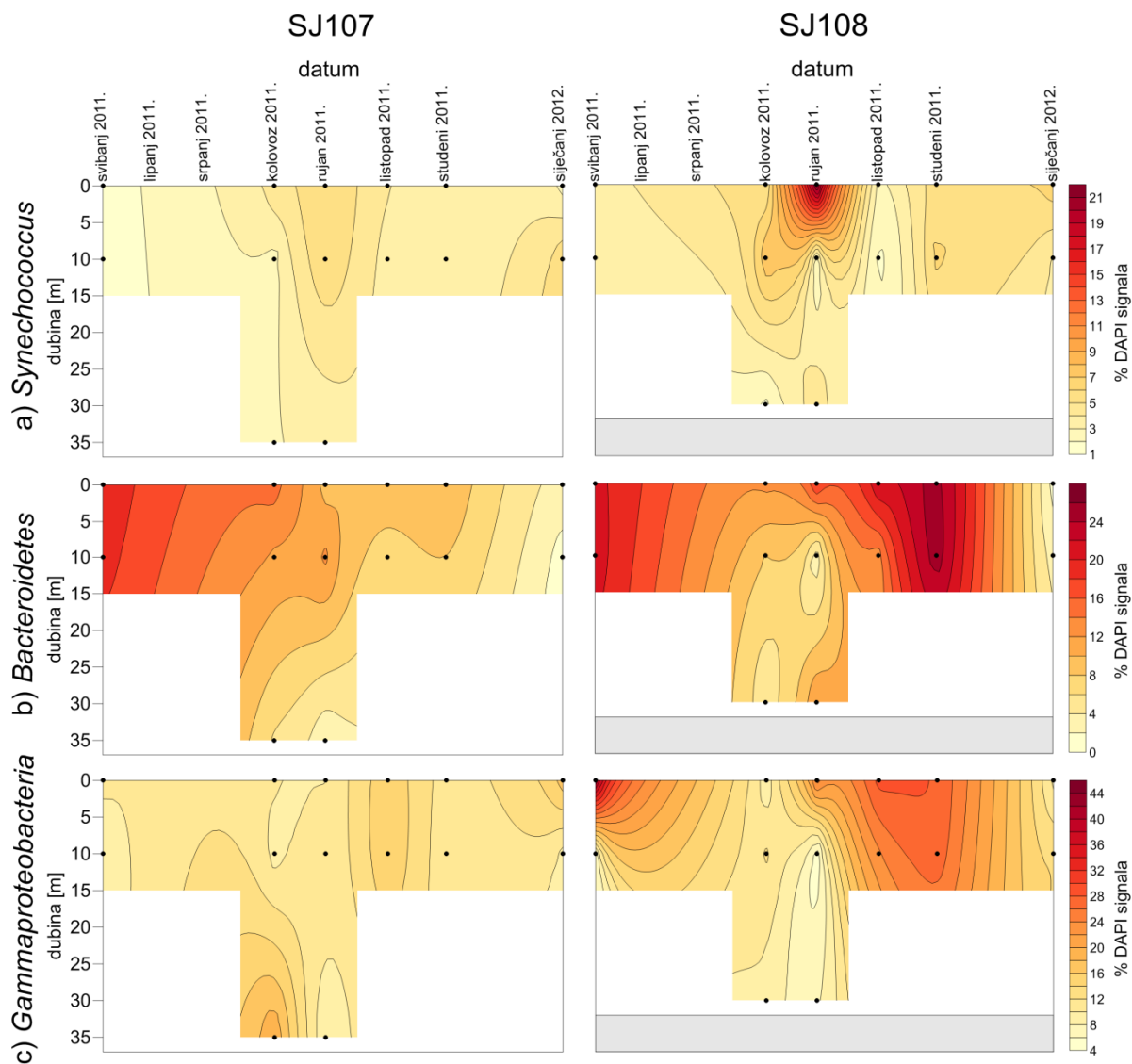
Prokariotsku zajednicu činile su uglavnom bakterije (60-98%; Slika 19b). Uočeno je povećanje udjela bakterija u zajednici nakon miješanja stupca, u listopadu 2011., na obje postaje. Maksimalni udio bakterija u zajednici zabilježen je u području jesenskog maksimuma klorofila *a* (98%) na 10 m dubine postaje SJ108, u studenom 2011. Općenito predstavnici razreda *Alphaproteobacteria* činili su važan dio prokariotske pikoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana (Slika 19c i 20a). Udio razreda *Alphaproteobacteria* određen je koristeći općenitu sondu ALF968. Predstavnici ovog razreda, detektirani ovakvom općenitom sondom, pokazali su veliku varijabilnost brojnosti (6,4-57%). Podatke dobivene ovom sondom treba uzeti s oprezom jer je poznato da sonda ALF968 ne zahvaća sve poznate predstavnike razreda *Alphaproteobacteria* (130, 167). Na postaji SJ107 najveći udio zabilježen je u siječnju 2012. dok je na postaji SJ107 najveći udio uočen u studenom 2011., tijekom maksimuma klorofila *a*. Na temelju udjela nukleotidnih sljedova klad SAR11 je određen kao važna skupina razreda *Alphaproteobacteria*. Najveći udio nukleotidnih sljedova specifičnih za SAR11 zabilježen je u listopadu 2011. i siječnju 2012. Obje su postaje sadržavale velik udio SAR11 specifičnih sljedova u ovim mjesecima. U svibnju 2011. na postaji SJ107, uz klad SAR11, nukleotidni sljedovi specifični za klad SAR116 činili su bitan udio ukupnih nukleotidnih sljedova. Također, u studenom 2011. na postaji SJ107, tijekom povećanja koncentracije klorofila *a*, najveći udio unutar nukleotidnih sljedova razreda *Alphaproteobacteria* činila je porodica *Rhodobacteraceae* (važna skupina bio je klad *Roseobacter*, linija OCT; Slika 20d).

Nukleotidni sljedovi specifičnih za cijanobakterije najvećim su dijelom klasificirani kao rod *Synechococcus* (Slika 20a i 20c). Udio predstavnika ovog roda varirao je od 0,96% do 21% (Slika 21a). Maksimalne vrijednosti na obje postaje uočene su u površinskom sloju u rujnu 2011. (SJ107 5,4%, SJ108 21%). Predstavnici roda *Prochlorococcus* bili su manje brojni te su činili manje od 1,6% zajednice tijekom cijelog istraživanog razdoblja. U studenom 2011. na postaji SJ108 udio nukleotidnih sljedova specifičnih za cijanobakterije bio je >90% (najveći dio srodan rodu *Synechococcus*), što je neuobičajeno. Također, koristeći probu SYN405 (specifičnu za rod *Synechococcus*) ovaj udio u zajednici nije potvrđen. Neuobičajeno veliki udio cijanobakterijskih sljedova moguća je posljedica pristranog umnožavanja PCR-om ili problema s konstrukcijom knjižnice prije 454 pirosekvenciranja.





**Slika 20.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih bakterijskih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA domene *Bacteria* (a), koljena *Bacteroidetes* (b), koljena *Cyanobacteria* (c), razreda *Alphaproteobacteria* (d) i razreda *Gammaproteobacteria* (e) na postaji SJ107 i SJ108 sjevernog Jadrana. Udio nukleotidnih sljedova pojedine niže taksonomske skupine (b-e) u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine“.



**Slika 21.** Vertikalna i sezonska raspodjela predstavnika roda *Synechococcus* (a), koljena *Bacteroidetes* (b) i razreda *Gammaproteobacteria* (c) na postaji SJ107 i SJ108 sjevernog Jadrana. Udio pojedine skupine prikazan je kao postotak DAPI signala. Dubine uzorkovanja označene su točkama.

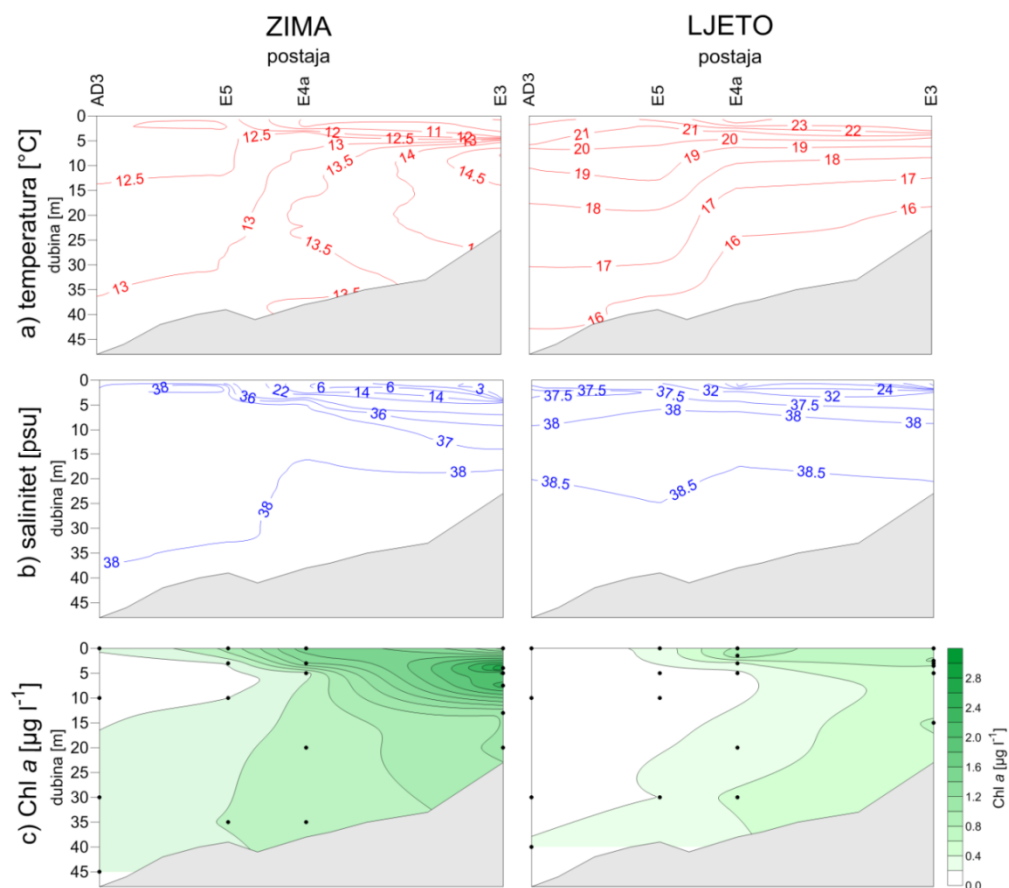
Dvije važne skupine, povezane s razgradnjom organske tvari, koje su činile bitan dio zajednice sjevernog Jadrana su koljeno *Bacteroidetes* i razred *Gammaproteobacteria*. Uočen je veći udio predstavnika koljena *Bacteroidetes* u svibnju 2011. na obje postaje (SJ107 19%, SJ108 21%) te u jesen (listopad-studenj 2011.) na postaji SJ108, tijekom povećane koncentracije klorofila *a* (maksimum udjela 25%; Slika 21b). Unutar koljena *Bacteroidetes* skupine s najvećim udjelom nukleotidnih sljedova bile su morske skupine NS4 i NS5 (Slika 20b). Sličnu raspodjelu imali su i predstavnici razreda *Gammaproteobacteria* (Slika 21c). Maksimum udjela zabilježen je u površinskom sloju, u svibnju 2011., na postaji SJ108 (42%). Također, isti mjesec na istoj postaji nukleotidni sljedovi srodni razredu *Gammaproteobacteria*

činili su većinu nukleotidnih sljedova (Slika 20a). Tijekom jesenskog povećanja koncentracije klorofila *a* udio ove skupine u zajednici se također povećao na obje postaje (SJ107 11-16%, SJ108 24-29%). Tijekom maksimuma u svibnju najveći dio nukleotidnih sljedova unutar razreda *Gammaproteobacteria* bio je srodan rodovima *Alteromonas*, *Pseudomonas* i *Vibrio* (Slika 20d). Za razliku od svibnja, u studenom su važne skupine unutar nukleotidnih sljedova razreda *Gammaproteobacteria* bili klad SAR86 i klad OM60 (NOR5) (Slika 20d).

## 5.5. Estuarij rijeke Krke

### 5.5.1. Hidrografija

Temperaturna stratifikacija bila je izražena ljeti, za razliku od zime kada je zabilježena samo unutar estuarija, na postajama pod utjecajem hladnije riječne vode (Slika 22a). Vertikalni gradijent saliniteta uočen je na svim postajama osim na vanjskoj postaji AD3 (Slika 22b). Izraženiji gradijent, s haloklinom na većim dubinama, bio je karakterističan za gornji dio estuarija (postaja E3) te se smanjivao u donjem dijelu. Zimi, gradijent saliniteta je u odnosu na ljetu bio izraženiji, pogotovo u gornjem dijelu estuarija, s haloklinom na većoj dubini, odražavajući povećani protok rijeke Krke. Koncentracija klorofila *a* varirala je od  $0,06 \mu\text{g l}^{-1}$  do  $2,90 \mu\text{g l}^{-1}$  s većim vrijednostima zabilježenim zimi u odnosu na ljetu (Slika 22c).



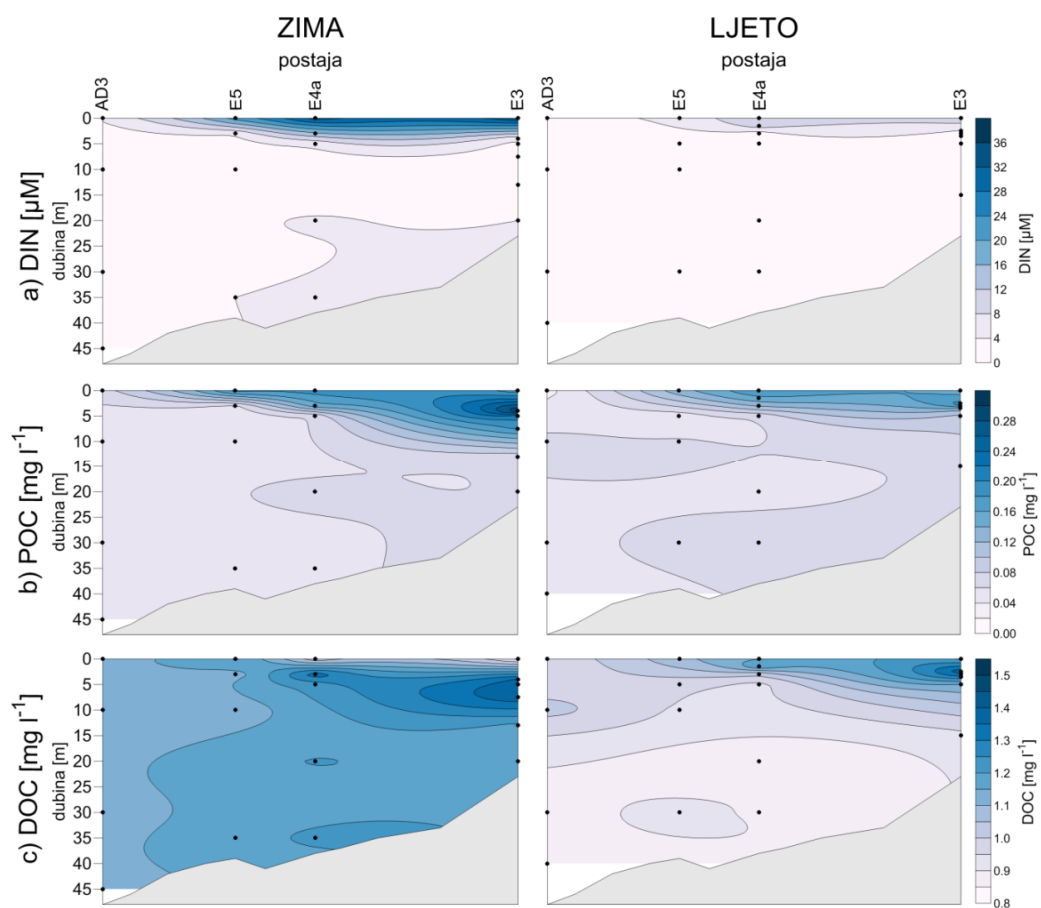
**Slika 22.** Sezonske promjene u temperaturi (a), salinitetu (b) i koncentraciji klorofila *a* (c) u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Dubine uzorkovanja označene su točkama.

Također, veće vrijednosti klorofila *a* bile su karakteristične za vodu manjeg saliniteta te za područje halokline. Maksimalna vrijednost koncentracije klorofila *a* ( $2,90 \mu\text{g l}^{-1}$ ) zabilježena je zimi, na 4 m dubine postaje E3, u području halokline. Raspodjela koncentracija DIN-a

pratila je raspodjelu saliniteta s povećanim vrijednostima u riječnoj vodi tijekom zime (Slika 23a). Također, raspodjela koncentracije otofosfata pratila je raspodjelu saliniteta s povećanim koncentracijama u riječnoj vodi (Prilog, Slika VIIa). Raspodjela ortosilikata pratila je raspodjelu saliniteta s većim koncentracijama u riječnoj vodi i s većim vrijednostima koncentracije zimi u odnosu na ljeto (Prilog, Slika VIIb). Koncentracije DOC-a i POC-a bile su veće tijekom zime s maksimumom koncentracije na postaji E3 u području halokline (Slika 23b i 23c).

### 5.5.2. Karakteristike vodenih slojeva

Zimi i ljeti bilo je moguće razlučiti tri različita vodena sloja unutar estuarija: sloj iznad halokline, sloj halokline i sloj ispod halokline. Haloklina je definirana kao interval u kojem je  $\Delta S/\Delta Z > 5 \text{ m}^{-1}$  (32, 168, 169). Zbog nepostojanja snažnog gradijenta saliniteta na postaji AD3 ova postaja nije uzeta u obzir prilikom opisa vodenih slojeva već je poslužila kao vanjska

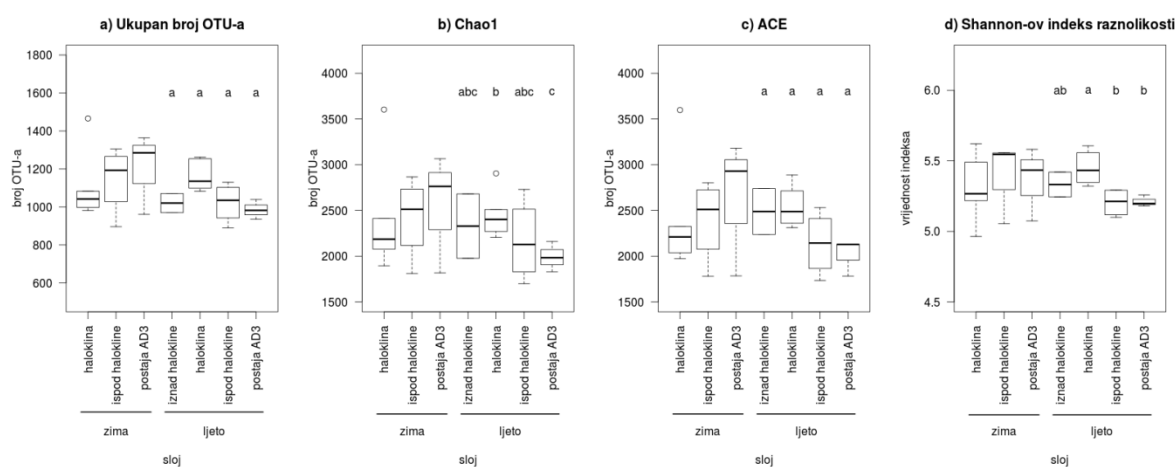


**Slika 23.** Sezonske promjene koncentracije otopljenog anorganskog dušika (DIN, engl. *Dissolved Inorganic Nitrogen*) (a), partikulatnog organskog ugljika (POC, engl. *Particulate Organic Carbon*) (b) i otopljenog organskog ugljika (DOC, *Dissolved Organic Carbon*) (c) u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Dubine uzorkovanja označene su točkama.

kontrolna postaja. Zimi, uočen je sloj iznad halokline ( $T 9,89 \pm 0,41^{\circ}\text{C}$ ;  $S 4,29 \pm 5,23$ ;  $\text{Chl } a 1,12 \pm 0,58 \mu\text{g l}^{-1}$ ), sloj halokline ( $T 13,33 \pm 1,52^{\circ}\text{C}$ ;  $S 29,79 \pm 10,01$ ;  $\text{Chl } a 1,56 \pm 1,00 \mu\text{g l}^{-1}$ ) i sloj ispod halokline ( $T 13,29 \pm 0,65^{\circ}\text{C}$ ;  $S 37,77 \pm 0,44$ ;  $\text{Chl } a 0,49 \pm 0,26 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Ljeti je, također, bilo moguće razlučiti tri različita sloja: sloj iznad halokline ( $T 23,51 \pm 0,98^{\circ}\text{C}$ ;  $S 19,82 \pm 7,52$ ;  $\text{Chl } a 0,74 \pm 0,12 \mu\text{g l}^{-1}$ ), sloj halokline ( $T 22,10 \pm 1,35^{\circ}\text{C}$ ;  $S 30,12 \pm 8,35$ ;  $\text{Chl } a 0,61 \pm 0,27 \mu\text{g l}^{-1}$ ) i sloj ispod halokline ( $T 17,36 \pm 1,51^{\circ}\text{C}$ ,  $S 38,35 \pm 0,31$ ;  $\text{Chl } a 0,30 \pm 0,20 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

### 5.5.3. Sezonska varijacija bakterijske raznolikosti

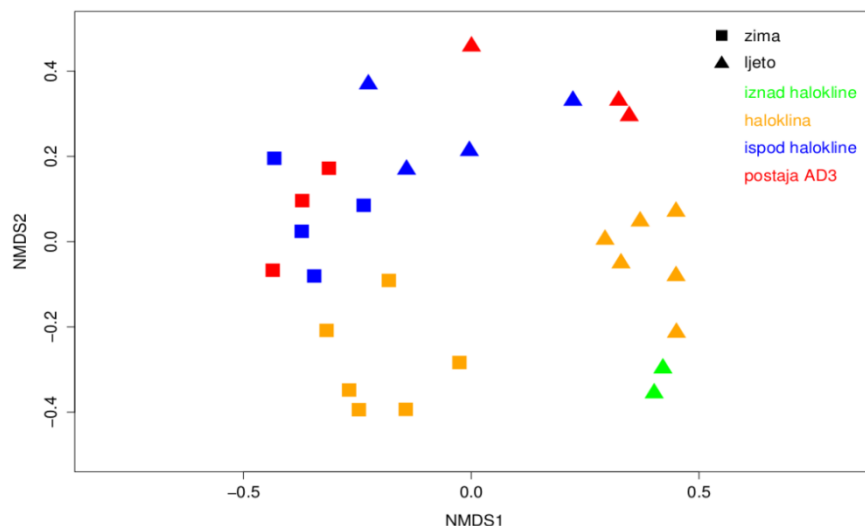
Kako bi se utvrdile razlike u raznolikosti između slojeva u svakoj sezoni izračunati su bogatstvo OTU-a, Chao1 i ACE procjenitelji te Shannon-ov indeks raznolikosti nakon postupka normalizacije zbog različitog broja nukleotidnih sljedova u svakom uzorku (Slika 24). Općenito, uočene su blage promjene deskriptora raznolikosti između slojeva i sezona. Ljeti su utvrđene značajne razlike između slojeva u bogatstvu OTU-a, procjeniteljima (Chao1 i ACE) te Shannon-ovom indeksu raznolikosti (jednosmjerna ANOVA,  $p < 0,05$ ), za razliku od zime kada uočene promjene nisu bile značajne niti za jedan deskriptor raznolikosti. Zimi je bogatstvo OTU-a bilo najmanje u sloju halokline (Chao1=2 152), dok su sloj ispod halokline (Chao1=2 317) i kontrolna postaja AD3 (Chao1=2 771) sadržavali veći broj OTU-a. Ljeti su slične smanjene vrijednosti bogatstva OTU-a uočene u sloju iznad halokline (Chao1=2 357), sloju ispod halokline (Chao1=2 122) te na kontrolnoj postaji AD3 (Chao1=2 058), za razliku



**Slika 24.** Sezonska promjena ukupnog broja OTU-a bakterija (a), procjenitelja Chao1 (b) i ACE (c) te Shannon-ovog indeksa raznolikosti (d) u različitim slojevima i sezonama estuarija rijeke Krke. Razlike između slojeva svake sezone testirane su metodom ANOVA ( $p < 0,05$ ). Jedino su uzorci ljeti pokazali značajnu razliku (različite kombinacije slova označavaju značajne razlike,  $p < 0,05$ , Tukey-ev HSD test).

od sloja halokline koji je sadržavao veći broj OTU-a (Chao1=2 576). Sloj halokline zimi sadržavao je manje bogatstvo OTU-a (Chao1=2 152) u odnosu na isti sloj ljeti (Chao1=2 576), dok je za ostale slojeve uočen pad bogatstva OTU-a od zime k ljetu (sloj ispod halokline i kontrolna postaja AD3). Shannon-ov indeks raznolikosti bio je poprilično ujednačen, i zimi i ljeti, uz nešto smanjene vrijednosti uočene ljeti u sloju ispod halokline i na kontrolnoj postaji AD3.

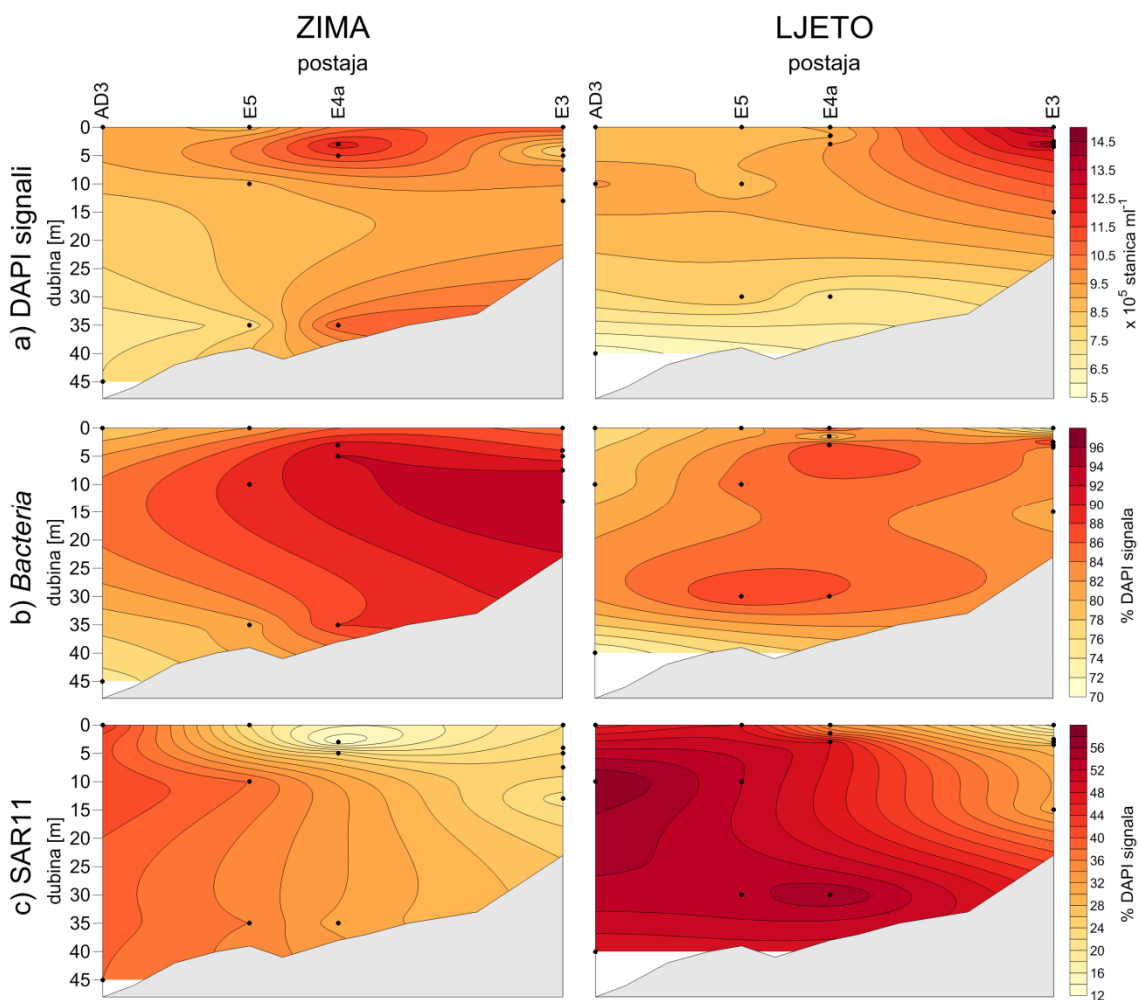
Kako bi se utvrdile razlike u strukturi zajednice provedena je NMDS analiza na razini OTU-a (Slika 25). Uzorci su se grupirali prema sezoni (zima-ljeto) i vodenom sloju iz kojeg potječu. Prva os NMDS-a odvaja ih na temelju sezone, dok ih druga os odvaja na temelju vodenog sloja iz kojeg potječu. Zimi je uočeno postojanje dviju različitih zajednica: zajednice halokline i zajednice dubokog sloja. Uzorci s kontrolne postaje AD3 grupirali su se zajedno s uzorcima uzorkovanim ispod halokline. Zimi, sloj iznad halokline (riječna voda) nije uzorkovan te ne možemo isključiti da i ovaj sloj sadrži zasebnu zajednicu. Ljeti su uočene tri različite zajednice: zajednica iznad halokline (riječna voda), zajednica halokline i zajednica ispod halokline. Također, uzorci s kontrolne postaje AD3 grupirali su se zajedno s uzorcima uzorkovanim ispod halokline. Ovakvo grupiranje uzoraka potvrđeno je i metodom ANOSIM ( $R=0,72$ ,  $p<0,001$ ; uzorci s kontrolne postaje pridruženi su uzorcima dobivenim ispod halokline).



**Slika 25.** NMDS prikaz uzoraka na temelju raspodjele OTU-a (Bray-Curtis-ov indeks; stress: 0,21). Prva os odvaja uzroke na temelju sezonalnosti, a druga os na temelju vodenog sloja. Uzorci se grupiraju u pet različitih grupa (ANOSIM,  $p<0,001$ ; uzorci iz kontrolne postaje AD3 pridodani su uzorcima dobivenim ispod halokline): dvije grupe zimi (haloklina, ispod halokline) i tri grupe ljeti (iznad halokline, haloklina i ispod halokline). Uzorci iz kontrolne postaje AD3 grupiraju se zajedno s uzorcima iz dubokog sloja.

### 5.5.4. Sezonska varijacija brojnosti i raznolikost bakterija

Brojnost prokariotskog pikoplanktona u estuariju rijeke Krke varirala je od  $7,5 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$  do  $12 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$  zimi, i od  $5,7 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$  do  $15 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$  ljeti (Slika 26a). Zimi je veći broj stanica zabilježen u sloju iznad halokline ( $11 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) u odnosu na sloj halokline ( $9,8 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ), sloj ispod halokline ( $9,1 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) i kontrolnu postaju AD3 ( $8,4 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ). Ljeti je veći broj stanica zabilježen u sloju iznad halokline ( $12 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) i sloju halokline ( $11 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) u odnosu na sloj ispod halokline ( $8,8 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ) i kontrolnu postaju ( $7,9 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ). Najveći broj stanica zabilježen je ljeti u sloju halokline na postaji E3 (3 m dubine;  $15 \times 10^5$  stanica  $\text{ml}^{-1}$ ).



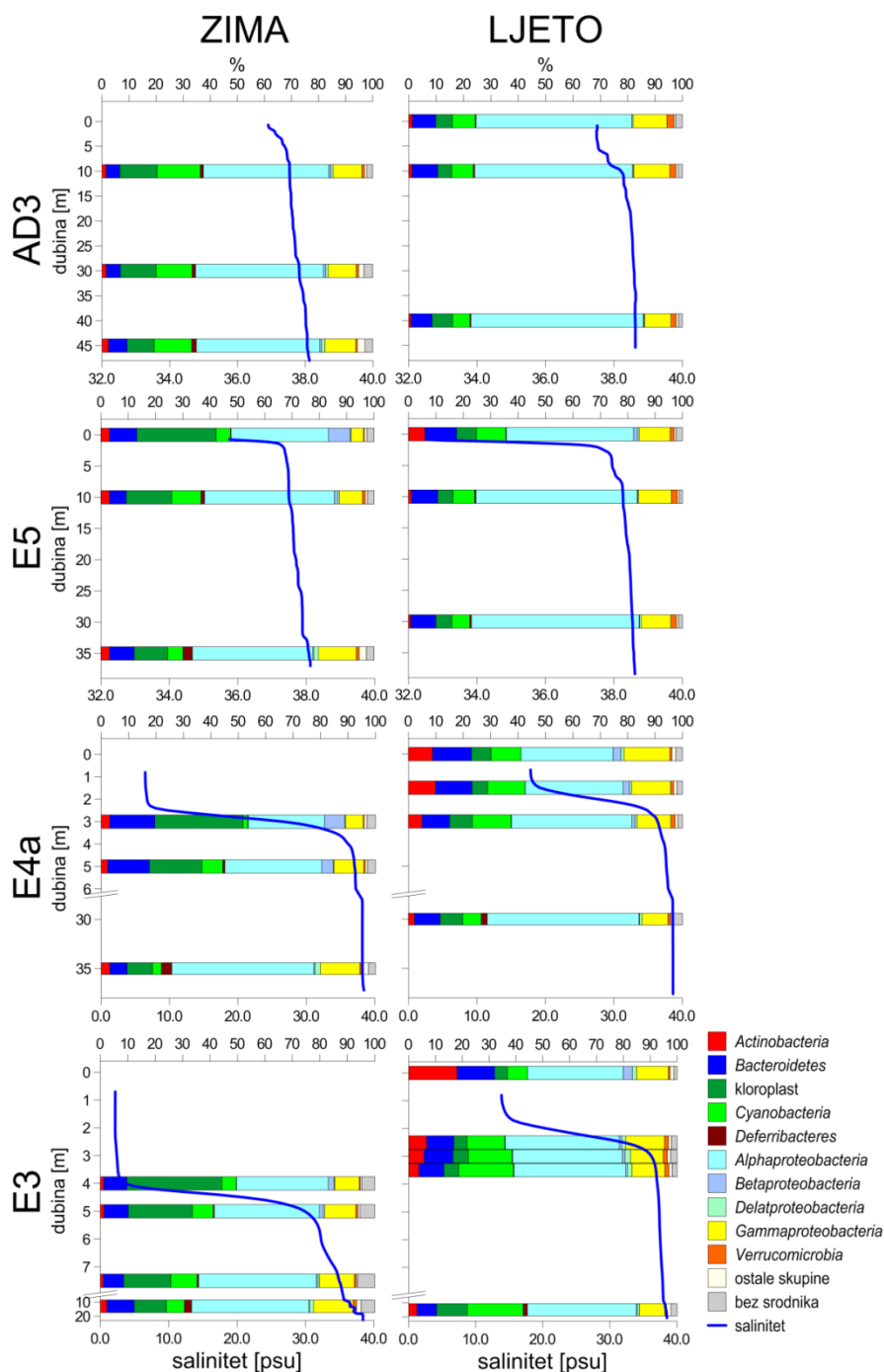
**Slika 26.** Vertikalna raspodjela brojnosti stanica prokariotskog pikoplanktona (DAPI signali) (a), bakterija (b) i predstavnika klada SAR11 (c) u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Udio bakterija i predstavnika klada SAR11 prikazana je kao postotak DAPI signala. Dubine uzorkovanja označene su točkama.



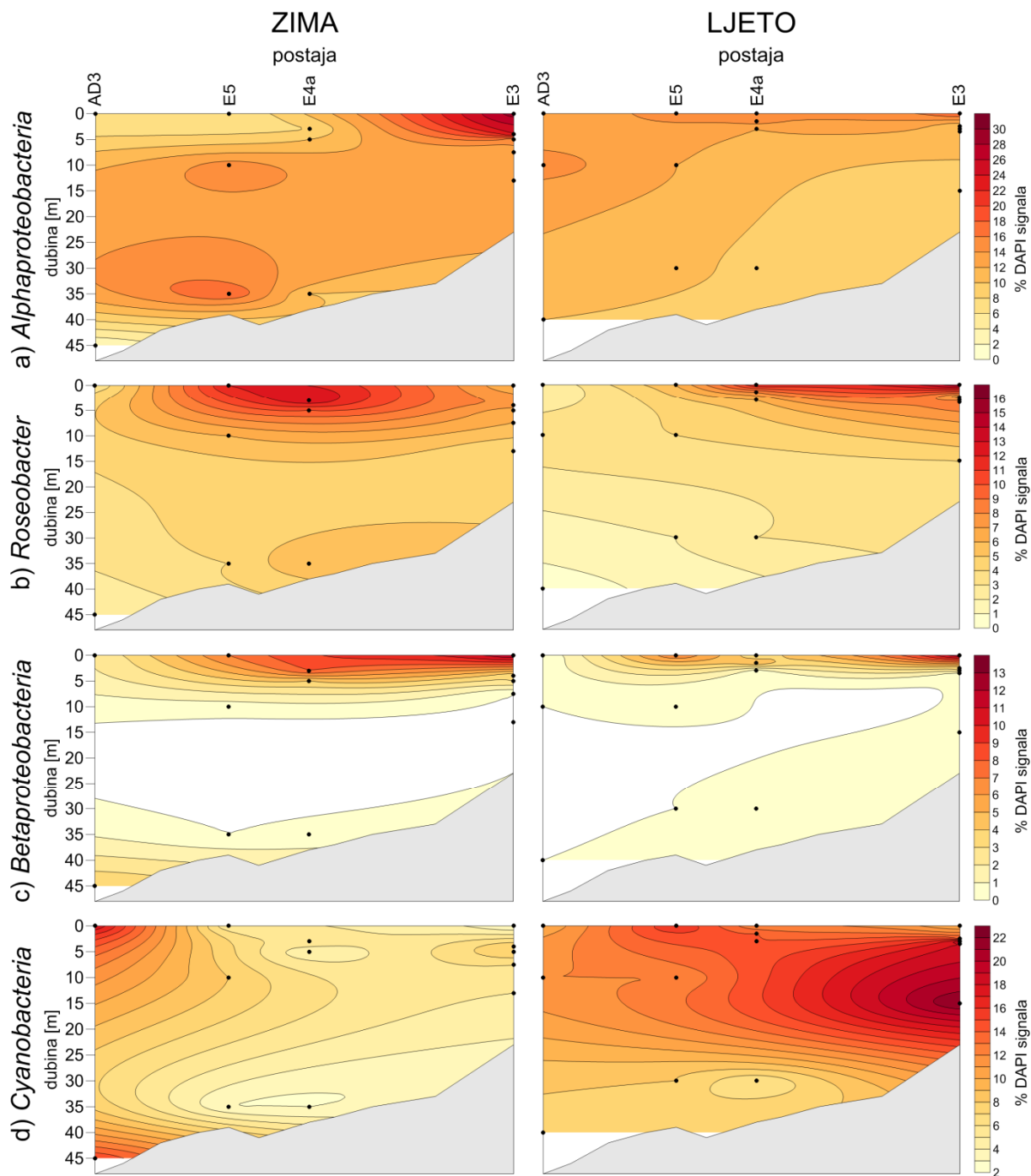
Bakterije su dominirale zajednicama prokariotskog pikoplanktona (Slika 26b). Koristeći mješavinu sonde EUBI-III, kojima je moguće detektirati većinu predstavnika bakterija, utvrđeno je raspon varijacije udjela bakterija od 72% do 94%. Zimi je udio bakterija bio veći u sloju iznad halokline (85%), sloju halokline (89%) i sloju ispod halokline (88%) u odnosu na kontrolnu postaju AD3 (77%). Ljeti je udio bakterija bio nešto manji s također manjim vrijednostima na kontrolnoj postaji (75%) u odnosu na sloj iznad halokline (80%), sloj halokline (84%) i sloj ispod halokline (85%).

Raznolikost bakterija u estuariju rijeke Krke opisana je taksonomskom klasifikacijom svakog reprezentativnog nukleotidnog slijeda (Slika 27) dok je udio najznačajnijih skupina u prokariotskoj pikoplanktonskoj zajednici određen analizom CARD-FISH. Općenito, predstavnici razreda *Alphaproteobacteria* bili su najbrojnija skupina zimi i ljeti. Činili su najveći udio nukleotidnih slijedova u većini uzoraka (Slika 27). Klada SAR11 bio je najbrojnija skupina, pogotovo ljeti i na vanjskoj kontrolnoj postaji (Slika 26c i Prilog, Slika VIII). Također, udio predstavnika klada SAR11 bio je manji u sloju halokline, sloju riječne vode (iznad halokline) i na unutarnjim postajama. Zimi je udio predstavnika klada SAR11 bio veći na kontrolnoj postaji AD3 (41%) i u sloju ispod halokline (32%) u odnosu na sloj halokline i sloj iznad halokline gdje je iznosio 22%. Slična distribucija uočena je i ljeti. Najveći udio zabilježen je na kontrolnoj postaji (50%) i u sloju ispod halokline (48%) dok je sloj halokline (35%) i sloj iznad halokline (25%) sadržavao manji udio predstavnika klada SAR11. Druga važna skupina unutar razreda *Alphaproteobacteria* bio je rod *Roseobacter* čiji je udio također bio veći u području riječne vode i zoni halokline (Slika 28b i Prilog, Slika VIII). Zimi je činio 6,0% zajednice u sloju iznad halokline i 9,0% u sloju halokline, za razliku od sloja ispod halokline (5,0%) i kontrolne postaje (3,0%) gdje mu je udio bio manji. Ljeti je udio roda *Roseobacter* bio veći u sloju iznad halokline (14%) i sloju halokline (7,2%) dok je u ostalim područjima njegov udio bio manji od 4,0%. Nukleotidni slijedovi karakteristični za razred *Alphaproteobacteria* klasificirani su uglavnom u klada SAR11 (Prilog, Slika VIII). Ostale skupine čiji su se nukleotidni slijedovi pojavljivali u većem udjelu bili su predstavnici porodice *Rhodobacteraceae* (rodovi *Rhodobacter* i *Roseibacterium*, linije NAC11-7 i OCT klada *Roseobacter* te ostali nekultivirani predstavnici porodice *Rhodobacteraceae*), s većim udjelom slijedova u zoni halokline i iznad halokline, i predstavnici klada SAR116, čiji je udio nukleotidnih slijedova bio nešto veći ljeti. Korištenjem općenite sonde za razred *Alphaproteobacteria* (ALF968) pokušala se odrediti dinamika ovog razreda, međutim

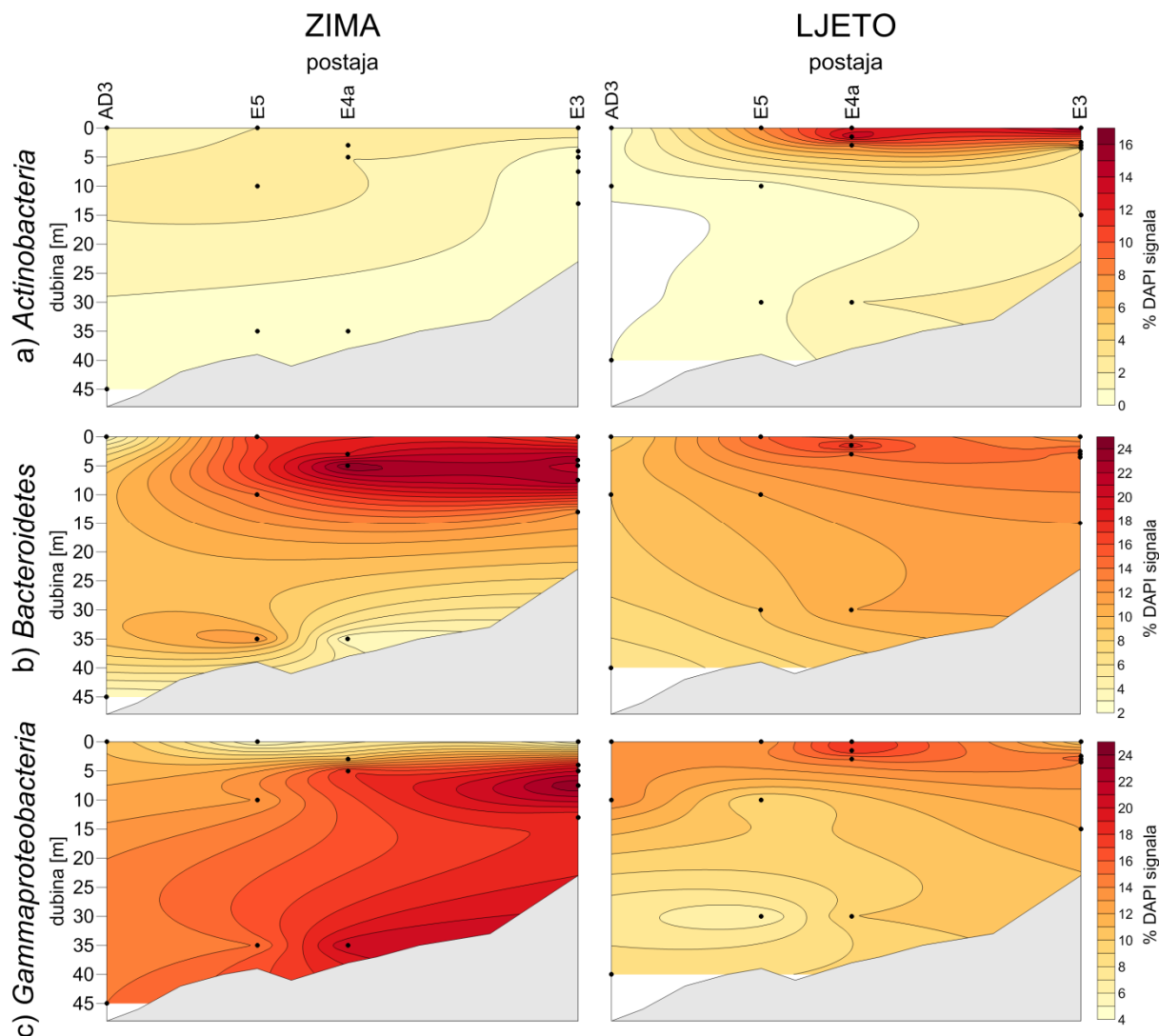
pokrivenost prokariotske pikoplanktonske zajednice koja je dobivena bila je bitno manja od udjela klada SAR11 (Slika 28a). Naime, raspon udjela predstavnika razreda *Alphaproteobacteria* iznosio je od 2% do 29%. Ovakvi podaci nepodudarnosti između općenite sonde ALF968 i sonde specifičnih za niže taksonomske skupine uočeni su i ranije (130, 167).



**Slika 27.** Taksonomska klasifikacija, udio najbrojnijih bakterijskih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA i vertikalna promjena saliniteta u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013.



**Slika 28.** Vertikalna raspodjela predstavnika razreda *Alphaproteobacteria* (a), roda *Roseobacter* (b), razreda *Betaproteobacteria* (c) i koljena *Cyanobacteria* (d) u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Udio pojedine skupine prikazan je kao postotak DAPI signala. Dubine uzorkovanja označene su točkama.



**Slika 29.** Vertikalna raspodjela predstavnika koljena *Actinobacteria* (a), koljena *Bacteroidetes* (b) i razreda *Gammaproteobacteria* (c) u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Udio pojedine skupine prikazan je kao postotak DAPI signala. Dubine uzorkovanja označene su točkama.

Predstavnici razreda *Betaproteobacteria*, karakteristični za slatke vode, pokazali su veći udio u zajednici u području pod utjecajem riječne vode (Slika 27 i 28c). Također, brojnost predstavnika ove skupine bila je veća zimi tijekom većeg protoka rijeke. Zimi je udio predstavnika ovog razreda bio najveći u sloju iznad halokline (12%) dok je u ostalim slojevima udio iznosio manje od 5,0%. Ljeti je udio razreda *Betaproteobacteria* bio najmanji u sloju ispod halokline i na kontrolnoj postaji gdje je iznosio manje od 1,0% dok je u sloju iznad halokline (7,5%) i sloju halokline (3,2%) bio nešto veći. Zimi, najveći dio nukleotidnih sljedova klasificiranih u razred *Betaproteobacteria* činio je rod *Chlorochromatium* i morska

skupina BAL58 (Prilog, Slika IX) dok su ljeti najveći dio zajednice razreda *Betaproteobacteria* činili sljedovi srodni morskoj skupini BAL58.

Udio predstavnika koljena *Cyanobacteria* pokazao je sezonsku varijaciju (Slika 27 i 28d). Naime, zimi je udio cijanobakterija bio najveći na kontrolnoj postaji AD3 (17%) dok je u drugim slojevima udio bio poprilično ujednačen i manji od 7,0%. Ljeti je udio cijanobakterija bio veći u sloju iznad halokline (11%), sloju halokline (16%) i sloju ispod halokline (12%), za razliku od kontrolne postaje gdje je bio manji (10%). Nukleotidni sljedovi karakteristični za cijanobakterije klasificirani su većinom u rod *Synechococcus* dok su sljedovi karakteristični za rod *Prochlorococcus* činili manji udio cijanobakterijskih sljedova (Prilog, Slika X).

Najveće sezonske razlike pokazali su predstavnici koljena *Actinobacteria* (Slika 27 i 29a), skupine poznate po svojoj većoj brojnosti u boćatim vodama estuarija rijeka. Zimi im je udio u sloju iznad halokline bio 3,0% dok im je u ostalim slojevima bio manji od 1,5%. Ljeti im je udio u sloju iznad halokline (14%) i sloju halokline (8,3%) bio veći u odnosu na zimu, dok je u ostalim slojevima iznosio također manje od 1,5%. Sezonalnost predstavnika koljena *Actinobacteria* uočena je i u raspodjeli nukleotidnih sljedova karakterističnih za ovu skupinu (Prilog, Slika XI). Nukleotidni sljedovi specifični za kandidata *Aquiluna* bili su karakteristični za sloj halokline i sloj iznad halokline u obje sezone dok su sljedovi specifični za morsku skupinu OCS155 činili veći udio sljedova ovog koljena u obje sezone u sloju ispod halokline i na kontrolnoj postaji AD3. Iz raspodjele nukleotidnih sljedova ljeti, tijekom povećanja brojnosti predstavnika koljena *Actinobacteria*, uočeno je kako je zajednica predstavnika ovog koljena uglavnom bila sastavljena od kandidata *Aquiluna*. Skupina DS001 ovog koljena pokazala je najveću sezonalnost u raspodjeli nukleotidnih sljedova s većim udjelom ljeti u odnosu na zimu.

Predstavnici koljena *Bacteroidetes* (Slika 27 i 29b) i razreda *Gammaproteobacteria* (Slika 27 i 29c) pokazali su sezonske razlike s većim udjelom u prokariotskoj pikoplanktonskoj zajednici zimi, na unutarnjim postajama gdje su zabilježene i veće vrijednosti klorofila *a*, u odnosu na ljeto i vanjsku, kontrolnu postaju. Najveći udio koljena *Bacteroidetes* zabilježen je zimi u sloju iznad halokline (16%) i sloju halokline (21%), za razliku od sloja ispod halokline (10%) i kontrolne postaje AD3 (3,0%) gdje su zabilježene manje vrijednosti. Ljeti su vrijednosti u sloju iznad halokline (13%) i sloju halokline (15%)

bile manje u odnosu na zimu, dok su u sloju ispod halokline (11%) i na kontrolnoj postaji (7,7%) bile nešto veće. Raspodjela nukleotidnih sljedova specifičnih za ovo koljeno pokazala je povećani udio sljedova karakterističnih za rod *Owenweeksia* i morske skupine NS4 i NS5 u svim uzorcima (Prilog, Slika XII). Sljedovi specifični za morske skupine NS4 i NS5 činili su veći udio sljedova specifičnih za koljeno *Bacteroidetes* ljeti u odnosu na zimu. Također, bitni dio nukleotidnih sljedova ovog koljena zimi, pogotovo na unutarnjim postajama u sloju pod utjecajem riječne vode gdje je detektirana i povećana koncentracija klorofila *a*, činili su sljedovi karakteristični za rod *Flavobacterium*. Slično sljedovima specifičnim za ovaj rod, zimi je na svim postajama detektiran povećani udio nukleotidnih sljedova karakterističnih za rod *Formosa*.

Predstavnici razreda *Gammaproteobacteria* pokazali su sličnu distribuciju. Veće vrijednosti udjela predstavnika ovog razreda zabilježene su zimi. Najveći udio razreda *Gammaproteobacteria* zabilježen je zimi u sloju halokline (16%) i sloju ispod halokline (17%), dok su na kontrolnoj postaji AD3 (13%) i sloju iznad halokline (5,0%) zabilježene manje vrijednosti. Ljeti su veće vrijednosti zabilježene u sloju iznad halokline (13%) i sloju halokline (15%) dok su u sloju ispod halokline (11%) i na kontrolnoj postaji (7,7%) zabilježene manje vrijednosti. Nukleotidni sljedovi karakteristični za ovaj razred klasificirani su uglavnom kao klad SAR86 s nešto većim udjelom zimi u odnosu na ljeto (Prilog, Slika XIII). Bitni udio uz klad SAR86 u sljedovima specifičnim za ovaj razred činili su sljedovi karakteristični za rod *Litoricola* čiji je udio bio bitno veći ljeti, pogotovo na unutarnjim postajama u sloju pod utjecajem riječne vode.

## **6. RASPRAVA**

---

Primjena molekularnih metoda u morskoj mikrobnjoj ekologiji uzrokovala je pravu revoluciju omogućujući po prvi puta identifikaciju i određivanje brojnosti većine, uzgojivih i neuzgojivih, prokariotskih skupina (6, 170). Zasnovane na analizi gena za RNA male podjedinice ribosoma, molekularne metode uglavnom uključuju sekvenciranje gena za 16S rRNA, klasičnim pristupom izradom knjižnica klonova i sekvenciranjem po Sangeru ili primjenom sekvenciranja nove generacije te detekciju pojedinačnih stanica FISH-om, vezivanjem specifičnih sonda za molekulu 16S rRNA. U ovom radu opisana je sezonska dinamika prokariotskog pikoplanktona u tri različita ekosustava Jadranskog mora: južnom i sjevernom Jadranu te estuariju rijeke Krke koristeći kombinaciju dvije molekularne metode neovisne o uzgojivosti: 454 pirosekvenciranje visoke rezolucije i kvantitativnu analizu CARD-FISH.

Usporedbom podataka 454 pirosekvenciranja i analize CARD-FISH utvrđena je niska pozitivna korelacija između seta podataka dobivenog 454 pirosekvenciranjem i seta podataka dobivenog analizom CARD-FISH za južni Jadran i estuariju rijeke Krke, dok je za sjeverni Jadran utvrđena vrlo niska negativna vrijednost istog korelacijskog koeficijenta. Nepodudarnost strukture zajednice određene ovim metodama moguće je uzrokovana pristranošću koju unosi PCR tijekom umnažanja molekule kalupa, problemima tijekom izrade knjižnice prije samog 454 pirosekvenciranja, razlikom u broju rRNA operona među različitim filogenetskim skupinama te razlikom u efikasnosti ekstrakcije DNA različitih skupina. Također, fiziološka neaktivnost, koja dovodi do smanjenog broja ribosoma u stanici, može uzrokovati razlike u strukturi zajednice određene ovim metodama. U južnom Jadranu polovicu zajednice čini klad SAR11, koji sadrži mali broj ribosoma, pogotovo na većim dubinama, što može dovesti do smanjene detekcije predstavnika ove skupine analizom CARD-FISH što je i ranije uočeno (59). Najveća nepodudarnost između 454 pirosekvenciranja i analize CARD-FISH uočena je u sjevernom Jadranu, gdje su detektirane i najveće brojnosti predstavnika koljena *Bacteroidetes* i razreda *Gammaproteobacteria* te roda *Synechococcus*. Od svih sekvenciranih bakterijskih genoma poznato je da genomi predstavnika razreda *Gammaproteobacteria* i koljena *Bacteroidetes* uz genome predstavnika koljena *Firmicutes* sadrže najveći broj kopija gena za 16S rRNA (171). Također, poznato je da soj CC9311 roda *Synechococcus*, koji je prilagođen obalnim morskim ekosustavima, sadrži dva rRNA operona (172) što je jedan od mogućih uzroka neuobičajeno visokog udjela nukleotidnih sljedova specifičnih za ovaj rod u studenom 2011. godine na postaji SJ108.



Također, pokazalo se da bakterije izolirane iz tla koje brzo formiraju kolonije na krutoj podlozi sadrže veći broj rRNA gena za malu podjedinicu ribosoma u odnosu na bakterije kojima treba duže vrijeme za formiranje kolonija (173). Sposobnost brzog stvaranja kolonija karakteristika je tzv. „r-ekotipova“ prilagođenih okolišu bogatom nutrijentima kao što je sjeverni Jadran. U „r-ekotipove“ spadaju klad *Roseobacter*, mnogi predstavnici razreda *Gammaproteobacteria* te koljena *Bacteroidetes* i *Cyanobacteria* (4). Veća razlika u strukturi zajednice sjevernog Jadrana određene 454 pirosekvenciranjem i analizom CARD-FISH moguća je posljedica upravo povećanog udjela tzv. „r-ekotipova“ s većim brojem rRNA operona.

Zimsko duboko miješanje vodenog stupca i ingresija LIW-a dva su oceanografska fenomena južnog Jadrana koja imaju bitnu ulogu u kontroli cjelokupne produkcije Jadranskog mora. Duboko zimsko miješanje, tipično za područja umjerene geografske širine, jedan je od najvažnijih čimbenika koji utječe na sezonsku dinamiku (npr. na brojnost, metabolički kapacitet i sl.) pikoplanktona južnog Jadrana (14, 68, 78, 110). Pojava je specifična i snažnija u odnosu na ostala područja umjerene geografske širine zbog lokalnih meteoroloških (snažna bura) i hidrografskih uvjeta potrebnih za stvaranje guste vode (26, 174). U radu Najdek i sur. (125), dan je detaljan opis vodenih slojeva i raspodjele nutrijenata za isto istraživano razdoblje. Ukratko, koncentracije nutrijenata su bile veće u dubokom sloju u odnosu na eufotičku zonu s izuzetkom zime, kada je uniformna raspodjela uočena kroz cijeli vodeni stupca. Naime, obogaćivanje eufotičke zone nutrijentima tijekom zimskog miješanja vodenog sloja uzrokovalo je snažno povećanje autotrofne biomase. Snažno zimsko miješanje vodenog stupca utjecalo je na distribuciju različitih skupina pikoplanktona direktno, prenoseći tipične dubokomorske skupine (SAR324, SAR202 i SAR406) u površinski sloj, i indirektno, donoseći nutrijente u eufotičku zonu uzrokujući time fitoplanktonski cvat. Nadalje, duboko zimsko miješanje uzrokovalo je, također, promjenu u bakterijskoj raznolikosti u eufotičkoj zoni i u dubokom sloju.

Bogatstvo OTU-a bakterijskih zajednica eufotičke zone varirao je kroz različite sezone. Najveće vrijednosti detektirane su ljeti, a najmanje u proljeće, tijekom fitoplanktonskog cvata. Ljetna maksimalna vrijednost bogatstva OTU-a u eufotičkoj zoni razlikuje se od podataka dobivenih za površinske vode zapadnog La Manche-a, gdje su uočeni zimski maksimum i ljetni minimum bogatstva (175, 176), te za BATS (engl. *Bermuda Atlantic Time-Series Study*), gdje je uočena suprotna dinamika s većim vrijednostima

bogatstva OTU-a uočenim zimi, tijekom miješanja, a manjim ljeti, tijekom temperaturne stratifikacije (14). Proljetni minimum bogatstva OTU-a može se objasniti dostupnošću niza novih ekoloških niša, zbog fitoplanktonske proizvodnje nove organske tvari, u kojima specijalističke skupine mogu naglo povećati svoju brojnost (83). Nadalje, ljetna maksimalna vrijednost bogatstva OTU-a može se objasniti snažnijom ingresijom LIW-a, koja je mogući izvor novih podskupina specifičnih za LIW, zbog pojačane dinamike vrtloga (ljeti su obje postaje bile pod utjecajem LIW-a) (45, 125).

Tijekom cijele godine eufotičkom zonom i miješanim slojem dominirale su bakterije dok su arheje bile manje brojne. Slična distribucija pronađena je u Atlantskom (67) i Tihom oceanu (177). Predstavnici klada SAR11 bili su najbrojnija skupina te su redovito činili više od 40% zajednice. Slična sezonska dinamika klada SAR11, s maksimumom brojnosti nakon zimskog miješanja vodenog stupca, pronađena je u sjeveroistočnom Sargaškom moru (68), dok je u obalnom oligotrofnom području Sredozemnog mora veći udio klada SAR11 uočen u proljeće i ljeti (178). Međutim, u oba istraživanja udio klada SAR11 u cjelokupnoj zajednici bio je manji što se može objasniti manjim brojem sonde specifičnih za klad SAR11 koje su korištene u ovim istraživanjima. Naime, za detekciju klada SAR11 u južnom Jadranu kao i u estuariju rijeke Krke primijenjen je osjetljiv pristup zasnovan na korištenju mješavine šest sonde za FISH, uz dodatak pomoćnog oligonukleotida te umnožavanje signala koristeći metodu CARD (engl. *Catalyzed Reporter Deposition*). Široka rasprostranjenost i velika brojnost ove skupine u oceanima (66) te analiza genoma jedinog uzgojenog predstavnika ovog klada (vrsta *Pelagibacter ubique*) (69, 70) upućuju na zaključak da predstavnici klada SAR11 obavljaju glavnu ulogu u oksidaciji otopljene organske tvari niske molekularne mase u oligotrofnim sustavima.

Sezonalnost cijanobakterija, druge najbrojnije skupine u južnom Jadranu, snažno je ovisila o zimskom miješanju kada je uočen snažan pad brojnosti predstavnika ove skupine. Sličan snažan pad brojnosti roda *Prochlorococcus* zbog sezonskog miješanja vodenog stupca uočen je i na postaji BATS. Pad brojnosti pripisan je selektivnom uklanjanju ekotipova roda *Prochlorococcus* adaptiranih na niski intenzitet svjetla koji se nisu mogli nositi s turbulentnim procesom zimskog miješanja (179). U jesen, nukleotidni sljedovi specifični za rod *Synechococcus* bili su dominantni iznad 75 m dubine dok su ispod 75 m brojniji bili sljedovi specifični za rod *Prochlorococcus*. U drugim sezonama, na svim dubinama, bilo je moguće pronaći sljedove specifične isključivo za rod *Prochlorococcus* ili podjednaki udio

nukleotidnih sljedova karakterističnih za oba roda (180). Uočeno snažno povećanje brojnosti predstavnika koljena *Bacteroidetes* i razreda *Gammaproteobacteria* u proljeće atipično je za oligotrofne otvorene vode (67). U obalnim i eutrofnim sustavima povećanje brojnosti predstavnika ovih skupina povezano je s fitoplanktonskim cvatovima te s razgradnjom biomase proizvedene tijekom cvata (83, 97). Također, smatra se kako se koljeno *Bacteroidetes* u razdoblju nakon cvata postepeno zamjenjuje s razredom *Gammaproteobacteria* (83, 97). Sličnu dinamiku ove dvije skupine moguće je bilo uočiti u južnom Jadranu u jesen i pogotovo u proljeće. Snažni odgovor predstavnika ove dvije skupine u proljeće podudara se s najvećom zabilježenom vrijednošću koncentracije klorofila *a*, uglavnom kao posljedica cvata dijatomeja vrsta *Chaetoceros* spp. i *Guinardia striata* (S. Ljubimir, osobno priopćenje). U obalnim vodama, vrste srodne rodovima *Ulvibacter*, *Formosa* i *Polaribacter*, klasificirane u red *Flavobacteriales* (koljeno *Bacteroidetes*), povećavaju svoju brojnost tijekom ili kratko nakon cvata dijatomeja (181). Iako su nukleotidni sljedovi iz južnog Jadrana uglavnom klasificirani u red *Flavobacteriales* sljedovi niti jedne od ovih skupina nisu pronađeni u velikom udjelu. Umjesto toga, morske skupine NS2b, NS4 i NS5 činile su većinu nukleotidnih sljedova koljena *Bacteroidetes* što može upućivati na zaključak da su ove skupine bolje prilagođene oligotrofnim uvjetima. U istom istraživanju, pokazalo se da rod *Reinekea* i klad SAR92 razreda *Gammaproteobacteria* povećavaju svoju brojnost nakon cvata dijatomeja te kao odgovor na završetak fitoplanktonskog cvata (181). Slično kao i kod koljena *Bacteroidetes* nisu pronađeni nukleotidni sljedovi srodni ovim skupinama u visokom udjelu. Klad SAR86 je činio većinu nukleotidnih sljedova razreda *Gammaproteobacteria* što upućuje na zaključak da je klad SAR86 analog klada SAR92 i roda *Reinekea* u oligotrofnim otvorenim vodama. Također, kod predstavnika ovog klada genomskim istraživanjima utvrđeno je postojanje velikog broja gena za tonB receptore koje koriste za stjecanje organske tvari (80, 81). Nadalje, utvrđeno je i postojanje gena za proteorodopsin što se smatra dodatnom prilagodbom oligotrofnim uvjetima (80, 81).

Duboki sloj južnog Jadrana sadržavao je veći udio arheja u odnosu na eufotičku zonu i miješani sloj, pogotovo u jesen i ljeti. Sličan udio arheja uočen je u mezopelagičkim vodama Atlantskog oceana (67, 117) i dubokim vodama istočnog Sredozemlja (114). Povećani udio arheja u dubokom sloju u jesen i ljeti upućuje na odgovor arheja na procese u eufotičkoj zoni (182). Zimi na 800 m i 1000 m dubine te u proljeće na 600 m uočena je neočekivana

dominacija nukleotidnih sljedova srodnih rodu *Sphingomonadales* koji su gotovo u potpunosti pripadali rodu *Sphingobium*. Jedini podatak, koliko je poznato, o naglom povećanju brojnosti predstavnika ove skupine vezan je uz povećanje brojnosti jedne vrste ovog reda u obalnoj laguni koje je povezano s povećanjem brojnosti filamentozne cijanobakterije (183). Raspodjela klada SAR202 (koljeno *Chloroflexi*) slična je raspodjeli arheja s većom brojnošću u dubokom sloju u jesen i ljeti za razliku od zime kada je ravnomjerno raspoređen kroz cijeli vodeni stupac (67, 184). Klad SAR406 (koljeno *Deferribacteres*) činio je ~6% zajednice u dubokom sloju kroz cijelu godinu s izuzetkom ljeta kada mu je udio porastao na više od 10%. Klad SAR324 razreda *Deltaproteobacteria*, slično kao klad SAR406, imao je maksimum udjela u zajednici ljeti u dubokom sloju s jednim dodatnim maksimumom zimi u miješanom sloju (67). U istom istraživanju uočena je neravnomjerna raspodjela klada SAR406 uzduž transekta u Atlantskom oceanu. Ovakva neravnomjerna raspodjela objašnjena je prirodnom varijacijom zbog sezonske promjene okolišnih čimbenika što je također najvjerojatniji uzrok sezonske varijacije u raspodjeli klada SAR406 u južnom Jadranu (67).

Sjeverni Jadran je plitki ekosustav kojeg karakterizira snažna varijacija sezonskih oceanografskih i bioloških uvjeta (185). Snažan utjecaj na sezonsku dinamiku bakterijskih zajednica, uz sezonske promjene fizikalnih uvjeta, ima protok rijeke Po, jedne od najvećih rijeka Sredozemnog mora (186). Sezonski fitoplanktonski cvatovi, uzrokovani sezonskim temperaturnim ciklusima i dostupnošću nutrijenata, glavni su čimbenik koji utječe na strukturu bakterijske zajednice sjevernog Jadrana (186). U periodu od listopada 2011. do siječnja 2012. bogatstvo OTU-a je bilo veće na postaji SJ107 u odnosu na postaju SJ108 što je moguće povezano s dotokom vode iz srednjeg Jadrana. Naime, slično kao u južnom Jadranu dotok vode u područje sjevernog Jadrana omogućuje donos novih skupina, pogotovo ako se uzme u obzir da je udio nukleotidnih sljedova specifičnih za SAR11 u listopadu 2011. i siječnju 2012. bio vrlo velik (131).

Ukupan broj prokariotskog pikoplanktona sjevernog Jadrana pokazao je već prije opisani obrazac s većim vrijednostima zabilježenim u ljetnom površinskom sloju u odnosu na pridneni sloj i zimske mjesece. To se povezuje s povećanom primarnom proizvodnjom u uvjetima poluzatvorene cirkulacije, tipične za ljetno razdoblje u sjevernom Jadranu, koja omogućava zadržavanje nutrijenata porijeklom iz riječne vode u ovom području (186, 187). Bitan dio bakterijske zajednice sjevernog Jadrana činile su skupine razreda *Alphaproteobacteria*. Među njima bitan doprinos imao je klad SAR11 pogotovo u listopadu

2011. i siječnju 2012., što je vidljivo iz raspodjele nukleotidnih sljedova. Tijekom zime veći udio klada SAR11 može se povezati sa smanjenom primarnom proizvodnjom te s ingresijom oligotrofnije vode iz srednjeg Jadrana (131). Osim klada SAR11, tijekom fitoplanktonskog cvata u jesen 2011. bitan dio zajednice činili su predstavnici klada *Roseobacter*. Povećana brojnost ove skupine zabilježena je tijekom cvatova fitoplanktona i u Tršćanskom zaljevu (16, 71, 132). Za predstavnike ove skupine poznato je da sudjeluju u razgradnji fitoplanktonskog osmolita dimetilsulfoniopropionata otpuštajući plin dimetil sulfid koji utječe na klimu (73–75).

Za razliku od južnog Jadrana, gdje je uz rod *Synechococcus* bitan dio cijanobakterijske zajednice činio rod *Prochlorococcus*, u sjevernom Jadranu uočena je vrlo snažna dominacija roda *Synechococcus*. Dominacija roda *Synechococcus* u eutrofnom području poput sjevernog Jadrana nije iznenađujuća te je i prethodno zabilježena (120, 131). Najveća zastupljenost ovog roda u prokariotskoj pikoplanktonskoj zajednici na obje postaje određena je u rujnu 2011. Velika brojnost roda *Synechococcus* tijekom ljetnih mjeseci u površinskom sloju može se objasniti vrlo efikasnim iskorištavanjem niskih koncentracija nutrijenata koje karakteriziraju ovo razdoblje. Prednost u uzimanju hranjivih soli nad fitoplanktonom cijanobakterije ostvaruju zbog većeg omjera površine i volumena stanice (186, 188). Vrlo veliki udio nukleotidnih sljedova specifičnih za rod *Synechococcus* detektiran je i u studenom 2011. na postaji SJ108. Ovaj podatak ipak treba uzeti s oprezom jer nije potvrđen analizom CARD-FISH pa je vrlo vjerojatno nastao kao produkt 454 pirosekvenciranja. Također, poznato je da rod *Synechococcus* sadrži više rRNA operona što je barem dijelom moglo utjecati na povećani udio nukleotidnih sljedova specifičnih za ovaj rod (171, 172).

Dvije bakterijske skupine koje su činile veliki dio prokariotske pikoplanktonske zajednice sjevernog Jadrana su koljeno *Bacteroidetes* i razred *Gammaproteobacteria* čija je brojnost bila vezana uz povećanje klorofila *a*, odnosno uz proizvodnju organske tvari. Povećanje udjela predstavnika ova dva razreda posebno je bilo uočljivo u jesen 2011. na postaji SJ108. Ovo razdoblje karakterizirao je veliki porast fitoplanktonske biomase (jesenski maksimum klorofila *a*) uzrokovan povećanim donosom hranjivih soli u izuzetno visokom protoku rijeke Po. Stoga se prisustvo ove dvije skupine može povezati s razgradnjom produkata jesenskog fitoplanktonskog cvata što je dobro opisano i u drugim obalnim sustavima (83, 97, 132). Nasuprot tome, a slično kao i kod južnog Jadrana, unutar koljena *Bacteroidetes* nisu pronađene skupine koje su prethodno povezane s dijatomejskim cvatovima

(rodovi *Ulvibacter*, *Formosa* i *Polaribacter*) (83). Najveći udio u nukleotidnim sljedovima specifičnim za ovo koljeno zauzimale su morske skupine NS4 i NS5. Morska skupina NS2b, iako brojna u nukleotidnim sljedovima južnog Jadrana, nije činila veći udio u nukleotidnim sljedovima sjevernog Jadrana. Također, unutar razreda *Gammaproteobacteria* najveći dio nukleotidnih sljedova činio je, slično kao u južnom Jadranu, klad SAR86, a ne rod *Reinekea* i klad SAR92 koji su činili većinu zajednice razreda *Gammaproteobacteria* tijekom dijatomejskog cvata u Sjevernom moru (83). Velik udio klada SAR86 unutar nukleotidnih sljedova razreda *Gammaproteobacteria* zabilježen je i u Tršćanskom zaljevu (132). Zanimljiva je razlika u raspodjeli nukleotidnih sljedova razreda *Gammaproteobacteria* u svibnju 2011. između postaje SJ107 i SJ108. Naime, na postaji SJ107 nukleotidnim sljedovima specifičnim za razred *Gammaproteobacteria* dominiraju klad OM60 (NOR5) i klad SAR86, koji su prilagođeniji oligotrofnijim uvjetima, dok na postaji SJ108 većinu sljedova ovog razreda čine rodovi *Alteromonas* i *Pseudoalteromonas*, prilagođeniji eutrofnijim uvjetima s mogućnošću brzog rasta (4). Ovakva raspodjela potvrđuje dobro poznate razlike u trofičkom stupnju između zapadnog i istočnog dijela sjevernog Jadrana (186).

Estuariji i obalna područja pod utjecajem rijeka predstavljaju kontrastne ekosustave u kojima prokariotske pikoplanktonske zajednice pokazuju snažne varijacije u prostoru i vremenu, prvenstveno zbog snažnog gradijenta saliniteta i nutrijenata. Mnoga su se istraživanja bavila bakterijskom proizvodnjom i biomasom u ovakvim kontrastnim ekosustavima (87, 88, 135, 136, 189, 190) dok su istraživanja strukture zajednica bila nešto rjeđa i uglavnom su koristila ili sekvenciranje gena za 16S rRNA (87, 89, 90, 92, 93, 191) ili FISH (87, 88, 192, 193). Istraživanja koja bi kombinirala 454 pirosekvenciranje gena za 16S rRNA i analizu CARD-FISH, pogotovo u krškim estuarijima i u više sezona, koliko je poznato, nisu provedena. Osnovni čimbenik koji utječe na strukturu zajednice estuarija rijeke Krke je sezona, dok je gradijent saliniteta sekundarni čimbenik. Uzorci se grupiraju najprije na temelju pripadnosti sezoni, a tek naknadno na temelju pripadnosti određenom sloju (riječnoj vodi, haloklini ili dubokom morskom sloju) koji je uvjetovan gradijentom saliniteta. Nekoliko je istraživanja identificiralo sezonske promjene kao osnovni čimbenik varijabilnosti bakterijskih zajednica obalnih voda (175, 176, 194). Međutim, istraživanja strukture bakterijskih zajednica estuarija koja su uključivala prostornu i vremensku dinamiku dala su oprečne rezultate. Osnovni čimbenik varijacije bakterijskih zajednica rijeke Kolumbije i

obalnog područja države Oregon (SAD) bila je prostorna komponenta (89), dok je izmjena sezona, slično kao i u estuariju rijeke Krke, najviše uvjetovala promjenu zajednice u zaljevu Chesapeake (Maryland/Virginia, SAD) (191). Pretpostavlja se da je u slučaju male prostorne varijacije, koja ne uključuje više od jedne vrste okoliša (obalno more, otvoreno more, estuarij rijeke i sl.), prostorna komponenta dominantna dok u slučaju promatranja samo jedne vrste okoliša, kao u slučaju estuarija rijeke Krke, dominantna vremenska komponenta (89). Estuarij rijeke Krke klasificiran je u visokostratificirani tip (34, 35) kojeg karakterizira niski terigeni donos zbog krškog područja i serije sedrenih barijera smještenih uzvodno od estuarija. Na granici slatke i slane vode, haloklini, opisano je formiranje filma organske tvari za koji se pretpostavlja da stabilizira gradijent gustoće smanjujući vertikalno turbulentno miješanje slatke i slane vode te utječe na transport energije i mase te na transformaciju partikulatne i otopljene tvari. Naime, sva tvar koja ulazi u estuarij mora proći kroz ovaj granični sloj (35). Vjerojatno je formiranje ovakvog sloja koje je uzrokovano snažnim gradijentom saliniteta uzrok postojanja različitih bakterijskih zajednica koje su specifične za sloj halokline i slojeve iznad i ispod halokline.

Uzrok dominacije sezonskih promjena nad gradijentom saliniteta vjerojatno leži u većem protoku rijeke zimi u odnosu na ljeto. Naime, zimi su vrijednosti saliniteta u riječnoj vodi bile bitno manje te je haloklina bila smještena na većoj dubini odražavajući veći protok rijeke. Osim toga, koncentracije nutrijenata (DIN-a i ortosilikata) bile su veće zimi u odnosu na ljeto što je rezultiralo većom autotrofnom biomasom (koncentracija klorofila *a*) i posljedično većom koncentracijom partikulatne i otopljene organske tvari (POC-a i DOC-a). Organska tvar koja se akumulira u sloju halokline vjerojatno potječe barem dijelom od slatkovodnog fitoplanktona koji se razvija u Visovačkom jezeru i koji ulazeći u estuarij propada uslijed osmotskog šoka zbog povećanog saliniteta (17, 36).

Bogatstvo OTU-a u estuariju rijeke Krke pokazalo je razlike između zime i ljeta. Zanimljivo, povećane razlike utvrđene su između sloja halokline zimi i ljeti što je moguće povezano, kao i kod južnog Jadrana, s dostupnošću niza novih ekoloških niša zbog fitoplanktonskog cvata zimi, u kojima specijalističke skupine mogu naglo povećati svoju brojnost (83). Također, sličan obrazac uočen je u zaljevu Chesapeake, s minimalnim vrijednostima bogatstva vrpce u analizi DGGE krajem zime i početkom proljeća (191). Iako Shannon-ov indeks raznolikosti nije pokazao bitne varijacije, najmanje vrijednosti koje su detektirane ljeti u vodi najvećeg saliniteta, u sloju ispod halokline i na kontrolnoj postaji AD3,

u suprotnosti su s istraživanjem provedenim u zaljevu Chesapeake gdje je utvrđena najveća vrijednost indeksa raznolikosti upravo u području najvećeg i u području najmanjeg saliniteta, dok je u području intermedijarnih vrijednosti saliniteta indeks dosegno najmanje vrijednosti (90).

Ukupan broj prokariotskog pikoplanktona u estuariju rijeke Krke slijedio je već prije opisan obrazac s najvećim vrijednostima u površinskom riječnom sloju, intermedijarnim vrijednostima na graničnom sloju halokline i najmanjim vrijednostima u dubokom morskom sloju (135, 136). Bakterije su snažno dominirale zajednicama među kojima je najzastupljeniji bio klad SAR11. Veća zastupljenost ovog klada uočena je ljeti, pogotovo u dubljem sloju i na kontrolnoj postaji, što ne iznenađuje jer je koncentracija organske tvari ljeti bila manja. Također, veći udio u prokariotskoj pikoplanktonskoj zajednici klad SAR11 činio je na vanjskoj postaji AD3 koja je pod mnogo manjim utjecajem riječne vode i koja je u svakoj sezoni sadržavala manje organske tvari. Naime, predstavnici ovog klada prilagođeniji su oligotrofnijim uvjetima u kojima obavljaju glavnu ulogu u oksidaciji otopljene organske tvari niske molekularne mase (70). Za razliku od klada SAR11 predstavnici skupine *Roseobacter* bili su karakteristični za riječnu vodu i sloj halokline, odnosno područja s većom koncentracijom klorofila *a* i organske tvari. Pronađeni su i u drugim estuarijima, međutim udio u zajednici im je bio nešto manji (87). Od prije je poznat obrazac po kojemu se predstavnicima ove skupine povećava brojnost tijekom povećanja fitoplanktonske biomase (71, 195). Predstavnici ove skupine obavljaju bitnu ulogu u transformaciji sumpornih spojeva, poput fitoplanktonskog osmolita dimetilsulfoniopropionata, te je moguće da u estuariju rijeke Krke obavljaju istu ulogu (73–75). Također, mnogo predstavnika klada *Roseobacter* poznati su aerobni anoksigeni fotoheterotrofi koji sadrže bakterioklorofil *a*. Mogućnost aerobne anoksigene fotoheterotrofije kao i razgradnje sumpornih spojeva nije uniformna karakteristika svih predstavnika ove skupine što može objasniti sezonske razlike uočene u raspodjeli nukleotidnih sljedova unutar predstavnika ove skupine u estuariju rijeke Krke (73).

Koljeno *Actinobacteria* i razred *Betaproteobacteria* skupine su koje su česti stanovnici estuarija i voda smanjenog saliniteta (87, 89, 90, 92, 93, 192, 193). Sličan obrazac većeg udjela koljena *Actinobacteria* i razreda *Betaproteobacteria* u riječnoj vodi smanjenog saliniteta i postepeni pad udjela prema morskoj vodi uočen je i u ostalim estuarijima poput zaljeva Chesapeake, estuarija rijeke Choptank ili estuarija Biserne rijeke (87, 88, 192). Zanimljivo, koljeno *Actinobacteria* pokazalo je snažnu sezonsku raspodjelu s većim udjelom



tijekom ljetnih mjeseci. Sličan obrazac s ljetnim maksimumom abundancije uočen je ljeti u boćatim vodama Baltičkog mora (93). Čini se kako je pored saliniteta temperatura važan čimbenik koji određuje brojnost predstavnika ove skupine. Veliki dio aktinobakterijskih nukleotidnih sljedova ljeti činili su sljedovi srodni kandidatu *Aquiluna*. Genom jednog od sojeva ovog roda sekvenciran je te, zanimljivo, sadrži aktinobakterijski proteorodopsin što mu omogućuje dobivanje energije iz svjetla kao u slučaju vrste *Pelagibacter ubique* (196). Predstavnici razreda *Betaproteobacteria* pokazali su manje sezonske razlike u odnosu na koljeno *Actinobacteria*. Čini se kako ova tipična slatkovodna skupina izravno reagira na promjenu saliniteta te stoga pokazuje veći udio u zajednici zimi tijekom većeg protoka rijeke. Veći udio razreda *Betaproteobacteria* u uzvodnom dijelu estuarija te krajem zime i u rano proljeće uočen je i u ostalim estuarijima (192).

Cijanobakterije su u estuariju rijeke Krke pokazale bitne sezonske razlike. Zimi je udio cijanobakterija bio najveći na kontrolnoj postaji AD3 dok im je na unutarnjim postajama, u području maksimuma klorofila *a*, udio bio manji. Za razliku od zime, ljeti je udio na unutarnjim postajama bio veći. Čini se kako su glavnu ulogu u primarnoj proizvodnji zimi, kada su uočene povećane koncentracije DIN-a, imale dijatomeje (Z. Ljubešić, osobno priopćenje) dok su ljeti cijanobakterije imale prednost zbog većeg omjera površine i volumena stanice (186, 188). Veći udio cijanobakterija ljeti bio je vidljiv iz omjera udjela nukleotidnih sljedova specifičnih za cijanobakterije i kloroplaste. Također, iz raspodjele nukleotidnih sljedova vidljiva je dominacija roda *Synechococcus* cijanobakterijskim zajednicama estuarija rijeke Krke u obje sezone što je u suprotnosti s istraživanjem Šantić i sur. koji su u šibenskoj luci u ljetnim mjesecima detektirali veću brojnost roda *Prochlorococcus* metodom protočne citometrije (121).

Udio koljena *Bacteroidetes* i razreda *Gammaproteobacteria* u prokariotskoj pikoplanktonskoj zajednici bio je veći zimi, u području povećane koncentracije klorofila *a* i organske tvari. Ovakva distribucija ne iznenađuje jer su predstavnici ove dvije skupine povezani s razgradnjom fitoplanktonske biomase u obalnim sustavima (83, 97). Skupine koljena *Bacteroidetes* koje su činile najveći udio nukleotidnih sljedova ovog koljena bile su morske skupine NS3a, NS4 i NS5 te rodovi *Flavobacterium* i *Formosa*. Povećanje brojnosti roda *Formosa* u fitoplanktonskim dijatomejskim cvatovima već je prije opisano (83). Zanimljivo je da niti u estuariju rijeke Krke, kao ni u južnom i sjevernom Jadranu, nisu pronađene ostale skupine koljena *Bacteroidetes* (rodovi *Polaribacter* i *Ulvibacter*) povezane s

fitoplanktonskim cvatovima u obalnom Sjevernom moru, već je ponovno utvrđen veći udio morskih skupina NS4 i NS5, ali ne i morske skupine NS2b kao u južnom Jadranu. Najveći dio nukleotidnih sljedova razreda *Gammaproteobacteria* činili su sljedovi srodni kladu SAR86, slično kao i u južnom Jadranu. Nije utvrđen veći udio roda *Reinekea* ili klada SAR92 kao u obalnim vodama Sjevernog mora (83). Slično kao ljeti u južnom Jadranu (Prilog, Slika IV), u estuariju rijeke Krke ljeti je utvrđen povećani udio nukleotidnih sljedova specifičnih za rod *Litoricola*. Genomska istraživanja uzgojenog soja srodnog ovome rodu utvrdila su postojanje gena za proteorodopsin te mogućnost fiksacije ugljikovog dioksida (197) što ukazuje na kompleksne sustave dobivanja energije prokariotskih organizama, pogotovo u uvjetima smanjene koncentracije organske tvari.

Iako u sva tri istraživana ekosustava različiti fenomeni uzrokuju povećanje koncentracije nutrijenata, koji posljedično uzrokuju cvatove fitoplanktona, u svim ekosustavima zajednički je snažan utjecaj organske tvari proizvedene fitoplanktonskim cvatovima na strukturiranje bakterijskih zajednice (83, 110, 191). Najočitija promjena vidljiva je u povećanju brojnosti predstavnika koljena *Bacteroidetes* i razreda *Gammaproteobacteria* tijekom cvata što je zabilježeno u sva tri istraživana ekosustava. Korištenje 454 pirosekvenciranja zajedno s analizom nukleotidnih sljedova SILVAngs softverom omogućilo je detaljniju i dublju taksonomsku klasifikaciju. Ovakvim pristupom identificirane su podskupine koljena *Bacteroidetes* i razreda *Gammaproteobacteria* koje, koliko je poznato, ranije nisu često povezivane s razgradnjom fitoplanktonske biomase. Naime, povećani broj nukleotidnih sljedova morske skupine NS4 i NS5 koljena *Bacteroidetes* i klada SAR86 razreda *Gammaproteobacteria* pronađen je u sva tri istraživana područja tijekom maksimuma klorofila *a* (110, 195). Suprotni obrazac utvrđen je za klad SAR11 razreda *Alphaproteobacteria* u sva tri područja. Naime, tijekom povećanja koncentracije klorofila *a* uočen je pad udjela predstavnika klada SAR11 u zajednici i udjela nukleotidnih sljedova specifičnih za ovu skupinu. Ovakva dinamika klada SAR11 ne iznenađuje s obzirom na poznatu prilagodbu predstavnika ove skupine na oligotrofne uvjete (66, 70). Korištenje metoda sekvenciranja nove generacije povezane s kvantitativnom analizom CARD-FISH omogućile su detaljniji opis strukture bakterijskih zajednica Jadranskog mora i identifikaciju do sada neistraženih ili slabo istraženih skupina i njihove potencijalne uloge u fenomenima poput cvatova fitoplanktona.

Jadransko more obilježava heterogenost ekosustava koja se odražava i u raznolikosti mikroorganizama u pojedinim područjima. Razumijevanje uloge koje mikroorganizmi obavljaju u pojedinim područjima neminovno je vezano uz opis njihove raznolikosti i raspodjele. Ovaj rad prvi je sistematičan prikaz bakterijske raznolikosti u Jadranu te predstavlja podlogu za daljnja istraživanja funkcionalnih karakteristika mikrobnih zajednica.

## **7. ZAKLJUČCI**

---

Na temelju 454 pirosekvenciranja gena za 16S rRNA, taksonomske klasifikacije reprezentativnih nukleotidnih sljedova te provedene analize CARD-FISH sa sondama odabranim na temelju analize nukleotidnih sljedova mogu se donijeti sljedeći zaključci:

Primjenom 454 pirosekvenciranja gena za 16S rRNA i kvantitativne analize CARD-FISH detaljno je analizirana raznolikost bakterijskih zajednica u Jadranskom moru.

Hidrografske karakteristike južnog Jadrana, pogotovo duboko zimsko miješanje vodenog stupca te ingresija LIW-a, imaju snažan utjecaj na sastav prokariotske pikoplanktonske zajednice, bogatstvo OTU-a i brojnosti različitih filogenetskih skupina.

Protok rijeke Po povezan sa sezonskim hidrografskim promjenama sjevernog Jadrana utječe na promjenu bogatstva OTU-a bakterijskih zajednica te na brojnost različitih filogenetskih skupina.

Prostorna i sezonska dinamika bakterijskih zajednica estuarija rijeke Krke snažno ovisi o protoku rijeke, gradijentu saliniteta i čimbenicima povezanim s ova dva fenomena. U estuariju, u različitim sezonama, identificirane su tri različite bakterijske zajednice karakteristične za sloj iznad halokline, sloj halokline i sloj ispod halokline.

Klad SAR11 najbrojniji je predstavnik prokariotske pikoplanktonske zajednice Jadranskog mora čineći većinu zajednice južnog Jadrana, obalnog područja srednjeg Jadrana (postaja AD3) i dubokog sloja estuarija rijeke Krke.

Cijanobakterije u Jadranskom moru čine dva morska roda: *Synechococcus* i *Prochlorococcus*. U južnom Jadranu ova dva roda pokazuju karakterističnu vertikalnu raspodjelu koja uključuje veću prisutnost roda *Synechococcus* do 75 m dubine nakon čega ga zamjenjuje rod *Prochlorococcus*. Cijanobakterijskim zajednicama sjevernog Jadrana dominira rod *Synechococcus* s izraženim sezonskim varijacijama.

Velike promjene strukture bakterijskih zajednica Jadranskoga mora zbivaju se tijekom fitoplanktonskih cvatova. Koljeno *Bacteroidetes* i razred *Gammaproteobacteria*, poznati po razgradnji fitoplanktonske mase, najbrojnije su skupine tijekom ovakvih događaja u sva tri istraživana područja.

Podskupine koljena *Bacteroidetes* koje se pojavljuju tijekom fitoplanktonskih cvatova su morske skupine NS4 i NS5, u sva tri istraživana područja, i dodatno NS2b u južnom Jadranu te morska skupina NS3a uz rodove *Flavobacterium* i *Formosa* u estuariju rijeke

---

Krke. Također, klad SAR86 je najvažniji predstavnik razreda *Gammaproteobacteria* u Jadranskom moru tijekom fitoplanktonskih cvatova.

Razred *Betaproteobacteria* u Jadranskom moru pojavljuje se u staništima pod utjecajem riječne vode: estuariju rijeke Krke i zapadnom području sjevernog Jadrana pod snažnim utjecajem rijeke Po.

Predstavnici koljena *Actinobacteria*, koji su inače vezani uz vode smanjenog saliniteta, pojavljuju se u svim istraživanim područjima, međutim povećani udio u zajednicama zabilježen je samo u staništima pod snažnim utjecajem riječne vode.

Dubokomorske sustave Jadranskog mora karakteriziraju tipične dubokooceanske skupine bakterija: SAR324, SAR202 i SAR406. Također, duboko Jadransko more karakterizira i veći udio arheja.

Rezultati dobiveni primjenom novih molekularnih metoda osnova su za daljnja istraživanja funkcionalnih karakteristika mikrobnih zajednica Jadranskoga mora.

## **8. LITERATURA**

---

1. **Kirchman DL.** 2008. Introduction and overview, str. 1–26. *u* Kirchman, DL (prir.), *Microbial Ecology of the Oceans*, 2. izd. Wiley-Blackwell, New Jersey.
2. **Worden AZ, Not F.** 2008. Ecology and diversity of picoeukaryotes, str. 159–206. *u* Kirchman, DL (prir.), *Microbial Ecology of the Oceans*, 2. izd. Wiley-Blackwell, New Jersey.
3. **Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ.** 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:6578–6583.
4. **Fuhrman JA, Hagström Å.** 2008. Bacterial and archaeal community structure and its patterns, str. 45–90. *u* Kirchman, DL (prir.), *Microbial Ecology of the Oceans*, 2. izd. Wiley-Blackwell, New Jersey.
5. **Roselló-Mora R, Amann R.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:39–67.
6. **Su C, Lei L, Duan Y, Zhang K-Q, Yang J.** 2012. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**:993–1003.
7. **Jannasch HW, Jones GE.** 1959. Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.* **4**:128–139.
8. **Staley JT, Konopka A.** 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**:321–346.
9. **Woese CR, Fox GE.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:5088–5090.
10. **Woese CR.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221–271.
11. **Pace N, Stahl D, Lane D, Olsen G.** 1985. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM Am. Soc. Microbiol. News* **51**:4–12.



12. **Amann RI, Krumholz L, Stahl DA.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762–770.
13. **Sogin M, Morrison H, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ.** 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**:12115–12120.
14. **Vergin K, Done B, Carlson C, Giovannoni S.** 2013. Spatiotemporal distributions of rare bacterioplankton populations indicate adaptive strategies in the oligotrophic ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **71**:1–13.
15. **Azam F.** 1998. Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens. *Science* **280**:694–696.
16. **Pernthaler J, Amann R.** 2005. Fate of Heterotrophic Microbes in Pelagic Habitats : Focus on Populations. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:440–461.
17. **Viličić D.** 2003. Oceanografski čimbenici i fitoplankton Jadranskoga mora, str. 106–146. *u* Matekalo Draganović, J (prir.), Fitoplankton u ekološkom sustavu mora. Zagreb.
18. **Zore-Armanda M.** 1963. Les masses d’eau de la Mer Adriatique. *Acta Adriat.* **10**:5–88.
19. **Zore-Armanda M.** 1963. Mixing of three water types in the south Adriatic. *Rapp. P. - v. Réunion. Commn int. Explor. Sci. Mer méditerr.* **17**:879–885.
20. **Orlić M, Gačić M, La Violette PE.** 1992. The currents and circulation of the Adriatic Sea. *Oceanol. Acta* **15**:109–124.
21. **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. *J. Phys. Oceanogr.* **27**:1492–1514.

22. **Russo A, Maccaferri S, Djakovac T, Precali R, Degobbi D, Deserti M, Paschini E, Lyons DM.** 2005. Meteorological and oceanographic conditions in the northern Adriatic Sea during the period June 1999-July 2002: influence on the mucilage phenomenon. *Sci. Total Environ.* **353**:24–38.
23. **Grilli F, Paschini E, Precali R, Russo A, Supić N.** 2005. Circulation and horizontal fluxes in the northern Adriatic Sea in the period June 1999-July 2002. Part I: geostrophic circulation and current measurement. *Sci. Total Environ.* **353**:57–67.
24. **Hopkins TS.** 1992. The structure of Ionian and Levantine Seas. *Rep. Meteorol. Ocean.* **41**:35–56.
25. **Socal G, Acri F, Bastianini M, Bernardi Aubry F, Bianchi F, Cassin D, Coppola J, De Lazzari A, Bandelj V, Cossarini G, Solidoro C.** 2008. Hydrological and biogeochemical features of the Northern Adriatic Sea in the period 2003-2006. *Mar. Ecol.* **29**:449–468.
26. **Mihanović H, Vilibić I, Carniel S, Tudor M, Russo A, Bergamasco A, Bubić N, Ljubešić Z, Viličić D, Boldrin A, Malačić V, Celio M, Comici C, Raicich F.** 2013. Exceptional dense water formation on the Adriatic shelf in the winter of 2012. *Ocean Sci.* **9**:561–572.
27. **Vollenweider RA, Marchetti A, Viviani R.** 1992. Eutrophication, structure and dynamics of a marine coastal system: results of ten-year monitoring the Emilia-Romagna coast (Northwest Adriatic Sea), str. 63–106. *u* Vollenweider, RA, Rinaldi, A, Montanari, G (prir.), *The Science of the Total Environment Supplement, Marine Coastal Eutrophication.* Elsevier, Amsterdam.
28. **Zore M.** 1956. On the gradient currents in the Adriatic Sea. *Acta Adriat.* **8**:1–38.
29. **Batistić M, Kršinić F, Jasprica N, Carić M, Viličić D, Lučić D.** 2004. Gelatinous invertebrate zooplankton of the South Adriatic: species composition and vertical distribution. *J. Plankton Res.* **26**:459–474.

30. **Civitarese G, Gačić M, Lipizer M, Eusebi Borzelli GL.** 2010. On the impact of the Bimodal Oscillating System (BiOS) on the biogeochemistry and biology of the Adriatic and Ionian Seas (Eastern Mediterranean). *Biogeosciences* **7**:3987–3997.
31. **Pravdić V, Juračić M.** 1988. The Environmental Capacity Approach to the Control of Marine Pollution: The Case of Copper in the Krka River Estuary. *Chem. Ecol.* **3**:105–117.
32. **Legović T, Gržetić Z, Smirčić A.** 1991. Effects of wind on a stratified estuary. *Mar. Chem.* **32**:153–161.
33. **Legović T.** 1991. Exchange of water in a stratified estuary with an application to Krka (Adriatic Sea). *Mar. Chem.* **32**:121–135.
34. **Gržetić Z.** 1990. Osnovna hidrološka i kemijska svojstva estuarija Krke (doktorski rad). Sveučilište u Zagrebu.
35. **Žutić V, Legović T.** 1987. A film of organic matter at the fresh-water/sea-water interface of an estuary. *Nature* **328**:612–614.
36. **Viličić D, Legović T, Žutić V.** 1989. Vertical distribution of phytoplankton in a stratified estuary. *Aquat. Sci.* **51**:31–46.
37. **Cetinić I, Viličić D, Burić Z, Olujić G.** 2006. Phytoplankton Seasonality in a Highly Stratified Karstic Estuary (Krka, Adriatic Sea). *Hydrobiologia* **555**:31–40.
38. **Gržetić Z, Precali R, Degobbis D, Škrivanić A.** 1991. Nutrient enrichment and phytoplankton response in an Adriatic karstic estuary. *Mar. Chem.* **32**:313–331.
39. **Gadanhó M, Almeida JMGCF, Sampaio JP.** 2003. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**:217–227.
40. **Muyzer G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:317–322.

41. **Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR.** 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2943–2950.
42. **Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R.** 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3094–3101.
43. **Klepac-Ceraj V, Hayes CA, Gilhooly WP, Lyons TW, Kolter R, Pearson A.** 2012. Microbial diversity under extreme euxinia: Mahoney Lake, Canada. *Geobiology* **10**:223–235.
44. **Pjevac P, Korlević M, Berg JS, Bura-Nakić E, Ciglencečki I, Amann R, Orlić S.** 2015. Community shift from phototrophic to chemotrophic sulfide oxidation following anoxic holomixis in a stratified seawater lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**:298–308.
45. **Galand PE, Potvin M, Casamayor EO, Lovejoy C.** 2010. Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean. *ISME J.* **4**:564–576.
46. **Agogué H, Lamy D, Neal PR, Sogin ML, Herndl GJ.** 2011. Water mass-specificity of bacterial communities in the North Atlantic revealed by massively parallel sequencing. *Mol. Ecol.* **20**:258–274.
47. **Glenn TC.** 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* **11**:759–769.
48. **Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD.** 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:5112–5120.
49. **Mardis ER.** 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* **24**:133–141.

- 
50. **Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B.** 2003. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:8817–8822.
  51. **Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, Sogin ML.** 2007. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science* **318**:97–100.
  52. **Van de Peer Y.** 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res.* **24**:3381–3391.
  53. **Vergin KL, Beszteri B, Monier A, Cameron Thrash J, Temperton B, Treusch AH, Kilpert F, Worden AZ, Giovannoni SJ.** 2013. High-resolution SAR11 ecotype dynamics at the Bermuda Atlantic Time-series Study site by phylogenetic placement of pyrosequences. *ISME J.* **7**:1322–1332.
  54. **Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R.** 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**:335–336.
  55. **Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF.** 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:7537–7541.
  56. **Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO.** 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**:D590–D596.

- 
57. **Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM.** 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**:D141–D145.
58. **DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL.** 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5069–5072.
59. **De Corte D, Sintes E, Yokokawa T, Herndl GJ.** 2013. Comparison between MICRO–CARD–FISH and 16S rRNA gene clone libraries to assess the active versus total bacterial community in the coastal Arctic. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**:272–281.
60. **Pernthaler A, Pernthaler J.** 2007. Fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microbes. *Methods Mol. Biol.* **353**:153–164.
61. **Frigaard N-U, Martinez A, Mincer TJ, DeLong EF.** 2006. Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic Bacteria and Archaea. *Nature* **439**:847–850.
62. **Stackebrandt E, Goebel BM.** 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:846–849.
63. **Cohan FM.** 2001. Bacterial Species and Speciation. *Syst. Biol.* **50**:513–524.
64. **Button DK, Schut F, Quang P, Martin R, Robertson BR.** 1993. Viability and Isolation of Marine Bacteria by Dilution Culture: Theory, Procedures, and Initial Results. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:881–891.
65. **Simu K, Hagström Å.** 2004. Oligotrophic Bacterioplankton with a Novel Single-Cell Life Strategy. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2445–2451.

- 
66. **Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, Giovannoni SJ.** 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**:806–810.
  67. **Schattenhofer M, Fuchs BM, Amann R, Zubkov M V, Tarran GA, Pernthaler J.** 2009. Latitudinal distribution of prokaryotic picoplankton populations in the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* **11**:2078–2093.
  68. **Carlson CA, Morris R, Parsons R, Treusch AH, Giovannoni SJ, Vergin K.** 2009. Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwestern Sargasso Sea. *ISME J.* **3**:283–295.
  69. **Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ.** 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**:630–633.
  70. **Giovannoni SJ, Tripp HJ, Givan S, Podar M, Vergin KL, Baptista D, Bibbs L, Eads J, Richardson TH, Noordewier M, Rappé MS, Short JM, Carrington JC, Mathur EJ.** 2005. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* **309**:1242–1245.
  71. **Eilers H, Pernthaler J, Peplies J, Glöckner FO, Gerdt G, Amann R.** 2001. Isolation of novel pelagic bacteria from the German bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5134–5142.
  72. **Selje N, Simon M, Brinkhoff T.** 2004. A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. *Nature* **427**:445–448.
  73. **Buchan A, Moran MA.** 2005. Overview of the Marine *Roseobacter* Lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5665–5677.
  74. **González JM, Simó R, Massana R, Covert JS, Casamayor EO, Pedrós-Alió C, Moran MA.** 2000. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4237–4246.

- 
75. **Gonzalez JM.** 2003. *Silicibacter pomeroyi* sp. nov. and *Roseovarius nubinhibens* sp. nov., dimethylsulfoniopropionate-demethylating bacteria from marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1261–1269.
76. **Giovannoni SJ, Stingl U.** 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* **437**:343–348.
77. **Mullins TD, Britschgi TB, Krest RL, Giovannoni SJ.** 1995. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* **40**:148–158.
78. **Morris RM, Vergin KL, Cho J-C, Rappe MS, Carlson CA, Giovannoni SJ.** 2005. Temporal and spatial response of bacterioplankton lineages to annual convective overturn at the Bermuda Atlantic Time-series Study site. *Limnol. Ocean.* **50**:1687–1696.
79. **Béjà O, Aravind L, Koonin E V, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP, Jovanovich SB, Gates CM, Feldman RA, Spudich JL, Spudich EN, DeLong EF.** 2000. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**:1902–1926.
80. **Dupont CL, Rusch DB, Yooseph S, Lombardo M-J, Richter RA, Valas R, Novotny M, Yee-Greenbaum J, Selengut JD, Haft DH, Halpern AL, Lasken RS, Nealson K, Friedman R, Venter JC.** 2012. Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. *ISME J.* **6**:1186–1199.
81. **Rusch DB, Lombardo M-J, Yee-Greenbaum J, Novotny M, Brinkac LM, Lasken RS, Dupont CL.** 2013. Draft Genome Sequence of a Single Cell of SAR86 Clade Subgroup IIIa. *Genome Announc.* **1**:e00030–12.
82. **Cho J-C, Giovannoni SJ.** 2004. Cultivation and Growth Characteristics of a Diverse Group of Oligotrophic Marine *Gammaproteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:432–440.



- 
83. **Teeling H, Fuchs BM, Becher D, Klockow C, Gardebrecht A, Bennke CM, Kassabgy M, Huang S, Mann AJ, Waldmann J, Weber M, Klindworth A, Otto A, Lange J, Bernhardt J, Reinsch C, Hecker M, Peplies J, Bockelmann FD, Callies U, Gerdts G, Wichels A, Wiltshire KH, Glöckner FO, Schweder T, Amann R.** 2012. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science* **336**:608–611.
84. **Todd JD, Rogers R, Li YG, Wexler M, Bond PL, Sun L, Curson ARJ, Malin G, Steinke M, Johnston AWB.** 2007. Structural and regulatory genes required to make the gas dimethyl sulfide in bacteria. *Science* **315**:666–669.
85. **Glockner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R.** 2000. Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of *Actinobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5053–5065.
86. **Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S.** 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**:14–49.
87. **Kirchman DL, Dittel AI, Malmstrom RR, Cottrell MT.** 2005. Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnol. Oceanogr.* **50**:1697–1706.
88. **Zhang Y, Jiao N, Cottrell M, Kirchman D.** 2006. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production along a salinity gradient in the South China Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **43**:233–241.
89. **Fortunato CS, Herfort L, Zuber P, Baptista AM, Crump BC.** 2012. Spatial variability overwhelms seasonal patterns in bacterioplankton communities across a river to ocean gradient. *ISME J.* **6**:554–563.
90. **Campbell BJ, Kirchman DL.** 2013. Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *ISME J.* **7**:210–220.

- 
91. **Riemann L, Leitet C, Pommier T, Simu K, Holmfeldt K, Larsson U, Hagström Å.** 2008. The native bacterioplankton community in the central Baltic sea is influenced by freshwater bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:503–515.
  92. **Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF.** 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* **5**:1571–1579.
  93. **Andersson AF, Riemann L, Bertilsson S.** 2010. Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Sea bacterioplankton communities. *ISME J.* **4**:171–181.
  94. **Kirchman DL.** 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**:91–100.
  95. **Cottrell MT, Kirchman DL.** 2000. Natural Assemblages of Marine *Proteobacteria* and Members of the *Cytophaga-Flavobacter* Cluster Consuming Low- and High-Molecular-Weight Dissolved Organic Matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1692–1697.
  96. **Cottrell MT, Yu L, Kirchman DL.** 2005. Sequence and expression analyses of Cytophaga-like hydrolases in a Western arctic metagenomic library and the Sargasso Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8506–8513.
  97. **Sintes E, Witte H, Stodderger K, Steiner P, Herndl GJ.** 2013. Temporal dynamics in the free-living bacterial community composition in the coastal North Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* **83**:413–424.
  98. **Gómez-Pereira PR, Schüler M, Fuchs BM, Bennke C, Teeling H, Waldmann J, Richter M, Barbe V, Bataille E, Glöckner FO, Amann R.** 2012. Genomic content of uncultured *Bacteroidetes* from contrasting oceanic provinces in the North Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* **14**:52–66.

- 
99. **Chisholm SW, Olson RJ, Zettler ER, Goericke R, Waterbury JB, Welschmeyer NA.** 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* **334**:340–343.
  100. **Johnson PW, Sieburth JM.** 1979. Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Oceanogr.* **24**:928–935.
  101. **Waterbury JB, Watson SW, Guillard RRL, Brand LE.** 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature* **277**:293–294.
  102. **Partensky F, Blanchot J, Vaultot D.** 1999. Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Bull. l'Institut océanographique* **19**:457–475.
  103. **Rocap G, Distel DL, Waterbury JB, Chisholm SW.** 2002. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* Ecotypes by Using 16S-23S Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1180–1191.
  104. **Dufresne A, Garczarek L, Partensky F.** 2005. Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. *Genome Biol.* **6**:R14.
  105. **Johnson ZI, Zinser ER, Coe A, McNulty NP, Woodward EMS, Chisholm SW.** 2006. Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science* **311**:1737–40.
  106. **Palenik B, Brahmsha B, Larimer FW, Land M, Hauser L, Chain P, Lamerdin J, Regala W, Allen EE, McCarren J, Paulsen I, Dufresne A, Partensky F, Webb EA, Waterbury J.** 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* **424**:1037–1042.
  107. **Béjà O, Suzuki MT.** 2008. Photoheterotrophic marine prokaryotes, str. 131–158. *u* Kirchman, DL (prir.), *Microbial Ecology of the Oceans*, 2. izd. Wiley-Blackwell.

- 
108. **Capone DG, Burns JA, Montoya JP, Subramaniam A, Mahaffey C, Gunderson T, Michaels AF, Carpenter EJ.** 2005. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochem. Cycles* **19**:1–17.
  109. **Morris RM, Rappé MS, Urbach E, Connon SA, Giovannoni SJ.** 2004. Prevalence of the *Chloroflexi*-related SAR202 bacterioplankton cluster throughout the mesopelagic zone and deep ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2836–2842.
  110. **Treusch AH, Vergin KL, Finlay LA, Donatz MG, Burton RM, Carlson CA, Giovannoni SJ.** 2009. Seasonality and vertical structure of microbial communities in an ocean gyre. *ISME J.* **3**:1148–1163.
  111. **Woese CR, Kandler O, Wheelis ML.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:4576–4579.
  112. **Fuhrman JA, McCallum K, Davis AA.** 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**:148–149.
  113. **DeLong EF.** 1992. *Archaea* in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:5685–5689.
  114. **De Corte D, Yokokawa T, Varela MM, Agogué H, Herndl GJ.** 2009. Spatial distribution of *Bacteria* and *Archaea* and amoA gene copy numbers throughout the water column of the Eastern Mediterranean Sea. *ISME J.* **3**:147–158.
  115. **Baltar F, Arístegui J, Gasol J, Hernández-León S, Herndl G.** 2007. Strong coast-ocean and surface-depth gradients in prokaryotic assemblage structure and activity in a coastal transition zone region. *Aquat. Microb. Ecol.* **50**:63–74.
  116. **Herndl GJ, Reinthaler T, Teira E, van Aken H, Veth C, Pernthaler A, Pernthaler J.** 2005. Contribution of *Archaea* to Total Prokaryotic Production in the Deep Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2303–2309.

- 
117. **Varela MM, van Aken HM, Sintes E, Herndl GJ.** 2008. Latitudinal trends of *Crenarchaeota* and *Bacteria* in the meso- and bathypelagic water masses of the Eastern North Atlantic. *Environ. Microbiol.* **10**:110–124.
118. **Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA.** 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**:543–546.
119. **Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB.** 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**:14683–14688.
120. **Radić T, Šilović T, Šantić D, Fuks D, Mičić M.** 2009. Preliminary flow cytometric analyses of phototrophic pico- and nanoplankton communities in the northern Adriatic. *Fresenius Environ. Bull.* **18**:715–724.
121. **Šantić D, Krstulović N, Šolić M, Kušpilić G.** 2011. Distribution of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* in the central Adriatic Sea. *Acta Adriat.* **52**:101–114.
122. **Šilović T, Ljubešić Z, Mihanović H, Olujić G, Terzić S, Jakšić Ž, Viličić D.** 2011. Picoplankton composition related to thermohaline circulation: The Albanian boundary zone (southern Adriatic) in late spring. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **91**:519–525.
123. **Šilović T, Bosak S, Jakšić Ž, Fuks D.** 2012. Seasonal dynamics of the autotrophic community in the Lim Bay (NE Adriatic Sea). *Acta Adriat.* **53**:41–56.
124. **Batistić M, Jasprica N, Carić M, Čalić M, Kovačević V, Garić R, Njire J, Mikuš J, Bobanović-Čolić S.** 2012. Biological evidence of a winter convection event in the South Adriatic: A phytoplankton maximum in the aphotic zone. *Cont. Shelf Res.* **44**:57–71.
125. **Najdek M, Paliaga P, Šilović T, Batistić M, Garić R, Supić N, Ivančić I, Ljubimir S, Korlević M, Jasprica N, Hrustić E, Dupčić-Radić I, Blažina M, Orlić S.** 2014. Picoplankton community structure before, during and after convection event in the offshore waters of the southern Adriatic Sea. *Biogeosciences* **11**:2645–2659.

- 
126. **Quero GM, Luna GM.** 2014. Diversity of rare and abundant bacteria in surface waters of the Southern Adriatic Sea. *Mar. Genomics* **17**:9–15.
127. **Manti A, Boi P, Semprucci F, Cataudella R, Papa S.** 2012. Picoplankton Community Composition by CARD-FISH and Flow Cytometric Techniques: A Preliminary Study in Central Adriatic Sea Water. *Int. J. Oceanogr.* **2012**:909718.
128. **Celussi M, Bussani A, Cataletto B, Del Negro P.** 2011. Assemblages' structure and activity of bacterioplankton in northern Adriatic Sea surface waters: a 3-year case study. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**:77–88.
129. **Celussi M, Cataletto B.** 2007. Annual dynamics of bacterioplankton assemblages in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Gene* **406**:113–123.
130. **Simonato F, Gómez-Pereira PR, Fuchs BM, Amann R.** 2010. Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Syst. Appl. Microbiol.* **33**:128–138.
131. **Šilović T, Balagué V, Orlić S, Pedrós-Alió C.** 2012. Picoplankton seasonal variation and community structure in the northeast Adriatic coastal zone. *FEMS Microbiol. Ecol.* **82**:678–691.
132. **Tinta T, Vojvoda J, Mozetič P, Talaber I, Vodopivec M, Malfatti F, Turk V.** 2014. Bacterial community shift is induced by dynamic environmental parameters in a changing coastal ecosystem (northern Adriatic, northeastern Mediterranean Sea) - a 2-year time-series study. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462–2920.12519.
133. **Bižić-Ionescu M, Zeder M, Ionescu D, Orlić S, Fuchs BM, Grossart H-P, Amann R.** 2014. Comparison of bacterial communities on limnic versus coastal marine particles reveals profound differences in colonization. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462–2920.12466.
134. **Bužančić M, Ninčević Gladan Ž, Marasović I, Kušpilić G, Grebec B, Matijević S.** 2012. Population structure and abundance of phytoplankton in three bays on the eastern Adriatic coast: Šibenik Bay, Kaštela Bay and Mali Ston Bay. *Acta Adriat.* **53**:413–435.

- 
135. **Fuks D, Devescovi M, Precali R, Krstulović N, Šolić M.** 1991. Bacterial abundance and activity in the highly stratified estuary of the Krka River. *Mar. Chem.* **32**:333–346.
136. **Fuks D, Precali R, Devescovi M.** 1994. Bacterial production in the stratified karstic estuary of the Krka River. *Acta Adriat.* **34**:21–28.
137. **Legović T, Gržetić Z, Žutić V.** 1991. Subsurface temperature maximum in a stratified estuary. *Mar. Chem.* **32**:163–170.
138. **Cauwet G.** 1991. Carbon inputs and biogeochemical processes at the halocline in a stratified estuary: Krka River, Yugoslavia. *Mar. Chem.* **32**:269–283.
139. **Moreira-Turcq P, Martin JM, Fleury A.** 1993. Chemical and biological characterization of particles by flow cytometry in the Krka estuary, Croatia. *Mar. Chem.* **43**:115–126.
140. **Moreira-Turcq PF, Cauwet G, Martin JM.** 2001. Contribution of flow cytometry to estimate picoplankton biomass in estuarine systems. *Hydrobiologia* **462**:157–168.
141. **Strickland JDH, Parsons TR.** 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fish. Res. Board Canada* **55**:167–167.
142. **Ivančić I, Degobbis D.** 1984. An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. *Water Res.* **18**:1143–1147.
143. **Dafner E V., Wangersky PJ.** 2002. A brief overview of modern directions in marine DOC studies Part I.-Methodological aspects. *J. Environ. Monit.* **4**:48–54.
144. **Penezić A, Gašparović B, Burić Z, Frka S.** 2010. Distribution of marine lipid classes in salty Rogoznica Lake (Croatia). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **86**:625–636.
145. **Dautović J, Strmečki S, Pestorić B, Vojvodić V, Plavšić M, Krivokapić S, Čosović B.** 2012. Organic matter in the karstic enclosed bay (Boka Kotorska Bay, South Adriatic Sea). Influence of freshwater input. *Fresenius Environ. Bull.* **21**:995–1006.

- 
146. **Barlow R, Cummings D, Gibb S.** 1997. Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls *a* and *b* and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse phase C-8 HPLC. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **161**:303–307.
147. **Massana R, Murray AE, Preston CM, Delong EF.** 1997. Vertical Distribution and Phylogenetic Characterization of Marine Planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:50–56.
148. **Dowd SE, Sun Y, Wolcott RD, Domingo A, Carroll JA.** 2008. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* **5**:459–472.
149. **Ionescu D, Siebert C, Polerecky L, Munwes YY, Lott C, Häusler S, Bižić-Ionescu M, Quast C, Peplies J, Glöckner FO, Ramette A, Rödiger T, Dittmar T, Oren A, Geyer S, Stärk H-J, Sauter M, Licha T, Laronne JB, de Beer D.** 2012. Microbial and Chemical Characterization of Underwater Fresh Water Springs in the Dead Sea. *PLoS One* **7**:e38319.
150. **Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO.** 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**:D590–D596.
151. **Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO.** 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**:1823–1829.
152. **Li W, Godzik A.** 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**:1658–1659.
153. **Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL.** 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**:421.
154. **Stahl DA, Amann R.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, str. 205–248. *u* Stackebrandt, E, Goodfellow, M (prir.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.



- 
155. **Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919–1925.
156. **Daims H, Brühl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:434–444.
157. **Wallner G, Amann R, Beisker W.** 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**:136–143.
158. **Roller C, Wagner M, Amann R, Ludwig W, Schleifer K-H.** 1994. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**:2849–2858.
159. **Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH.** 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **142**:1097–1106.
160. **Schönhuber W, Zarda B, Eix S, Rippka R, Herdman M, Ludwig W, Amann R.** 1999. In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1259–1267.
161. **West NJ, Scho WA, Fuller NJ, Amann RI, Rippka R, Post AF, Scanlan DJ.** 2001. Closely related *Prochlorococcus* genotypes show remarkably different depth distributions in two oceanic regions as revealed by in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **147**:1731–1744.
162. **Fuchs BM, Woebken D, Zubkov M V, Burkill P, Amann R.** 2005. Molecular identification of picoplankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **39**:145–157.

- 
163. **Neef A.** 1997. Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen (doktorski rad). Technische Universität München.
164. **Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer K-H.** 1992. Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593–600.
165. **Zubkov M V, Fuchs BM, Burkill PH, Amann R.** 2001. Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5210–5218.
166. **Bray JR, Curtis JT.** 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* **27**:325.
167. **Amann R, Fuchs BM.** 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:339–348.
168. **Vukojević N.** 1983. Effect of thermocline on sound velocity in the sea (doktorski rad). Sveučilište u Zagrebu.
169. **Sempéré R, Cauwet G.** 1995. Occurrence of Organic Colloids in the Stratified Estuary of the Krka River (Croatia). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **40**:105–114.
170. **Okabe S, Oshiki M, Kamagata Y, Yamaguchi N, Toyofuku M, Yawata Y, Tashiro Y, Nomura N, Ohta H, Ohkuma M, Hiraishi A, Minamisawa K.** 2010. A Great Leap forward in Microbial Ecology. *Microbes Environ.* **25**:230–240.
171. **Větrovský T, Baldrian P.** 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* **8**:e57923.

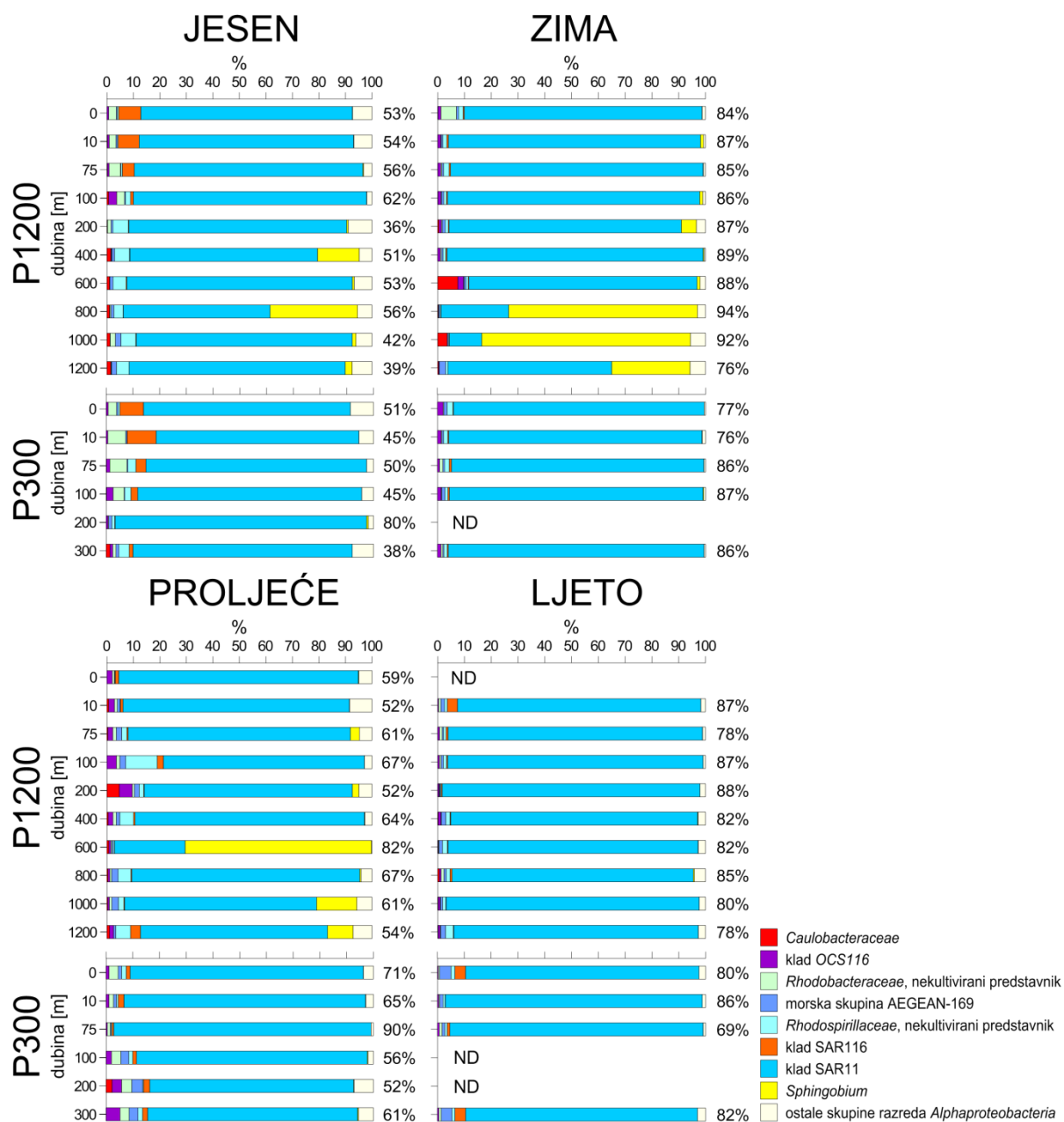
- 
172. **Palenik B, Ren Q, Dupont CL, Myers GS, Heidelberg JF, Badger JH, Madupu R, Nelson WC, Brinkac LM, Dodson RJ, Durkin AS, Daugherty SC, Sullivan SA, Khouri H, Mohamoud Y, Halpin R, Paulsen IT.** 2006. Genome sequence of *Synechococcus* CC9311: Insights into adaptation to a coastal environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**:13555–13559.
173. **Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM.** 2000. rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1328–1333.
174. **Bensi M, Cardin V, Rubino A, Notarstefano G, Poulain PM.** 2013. Effects of winter convection on the deep layer of the Southern Adriatic Sea in 2012. *J. Geophys. Res. Ocean.* **118**:6064–6075.
175. **Gilbert JA, Field D, Swift P, Newbold L, Oliver A, Smyth T, Somerfield PJ, Huse S, Joint I.** 2009. The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environ. Microbiol.* **11**:3132–3139.
176. **Gilbert JA, Steele JA, Caporaso JG, Steinbrück L, Reeder J, Temperton B, Huse S, McHardy AC, Knight R, Joint I, Somerfield P, Fuhrman JA, Field D.** 2012. Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J.* **6**:298–308.
177. **Yin Q, Fu B, Li B, Shi X, Inagaki F, Zhang X-H.** 2013. Spatial variations in microbial community composition in surface seawater from the ultra-oligotrophic center to rim of the South Pacific gyre. *PLoS One* **8**:e55148.
178. **Alonso-Sáez L, Balagué V, Sà EL, Sánchez O, González JM, Pinhassi J, Massana R, Pernthaler J, Pedrós-Alió C, Gasol JM.** 2007. Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**:98–112.
179. **Casey JR, Aucan JP, Goldberg SR, Lomas MW.** 2013. Changes in partitioning of carbon amongst photosynthetic pico- and nano-plankton groups in the Sargasso Sea in response to changes in the North Atlantic Oscillation. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **93**:58–70.

- 
180. **Mella-Flores D, Mazard S, Humily F, Partensky F, Mahé F, Bariat L, Courties C, Marie D, Ras J, Mauriac R, Jeanthon C, Mahdi Bendif E, Ostrowski M, Scanlan DJ, Garczarek L.** 2011. Is the distribution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes in the Mediterranean Sea affected by global warming? *Biogeosciences* **8**:2785–2804.
181. **Teeling H, Glöckner FO.** 2012. Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis—a bioinformatic perspective. *Brief. Bioinform.* **13**:728–742.
182. **Weinbauer MG, Liu J, Motegi C, Maier C, Pedrotti ML, Dai M, Gattuso JP.** 2013. Seasonal variability of microbial respiration and bacterial and archaeal community composition in the upper twilight zone. *Aquat. Microb. Ecol.* **71**:99–115.
183. **Piccini C, Conde D, Alonso C, Sommaruga R, Pernthaler J.** 2006. Blooms of Single Bacterial Species in a Coastal Lagoon of the Southwestern Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:6560–6568.
184. **Varela MM, van Aken HM, Herndl GJ.** 2008. Abundance and activity of *Chloroflexi*-type SAR202 bacterioplankton in the meso- and bathypelagic waters of the (sub)tropical Atlantic. *Environ. Microbiol.* **10**:1903–1911.
185. **Degobbis D, Precali R, Ivančić I, Smolaka N, Fuks D, Kveder S.** 2000. Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *Int. J. Environ. Pollut.* **13**:495–533.
186. **Fuks D, Radić J, Radić T, Najdek M, Blazina M, Degobbis D, Smolaka N.** 2005. Relationships between heterotrophic bacteria and cyanobacteria in the northern Adriatic in relation to the mucilage phenomenon. *Sci. Total Environ.* **353**:178–88.
187. **Ivančić I, Fuks D, Najdek M, Blažina M, Devescovi M, Šilović T, Paliaga P, Orlić S.** 2010. Long-term changes in heterotrophic prokaryotes abundance and growth characteristics in the northern Adriatic Sea. *J. Mar. Syst.* **82**:206–216.
188. **Fogg GE.** 1986. Picoplankton. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **228**:1–30.

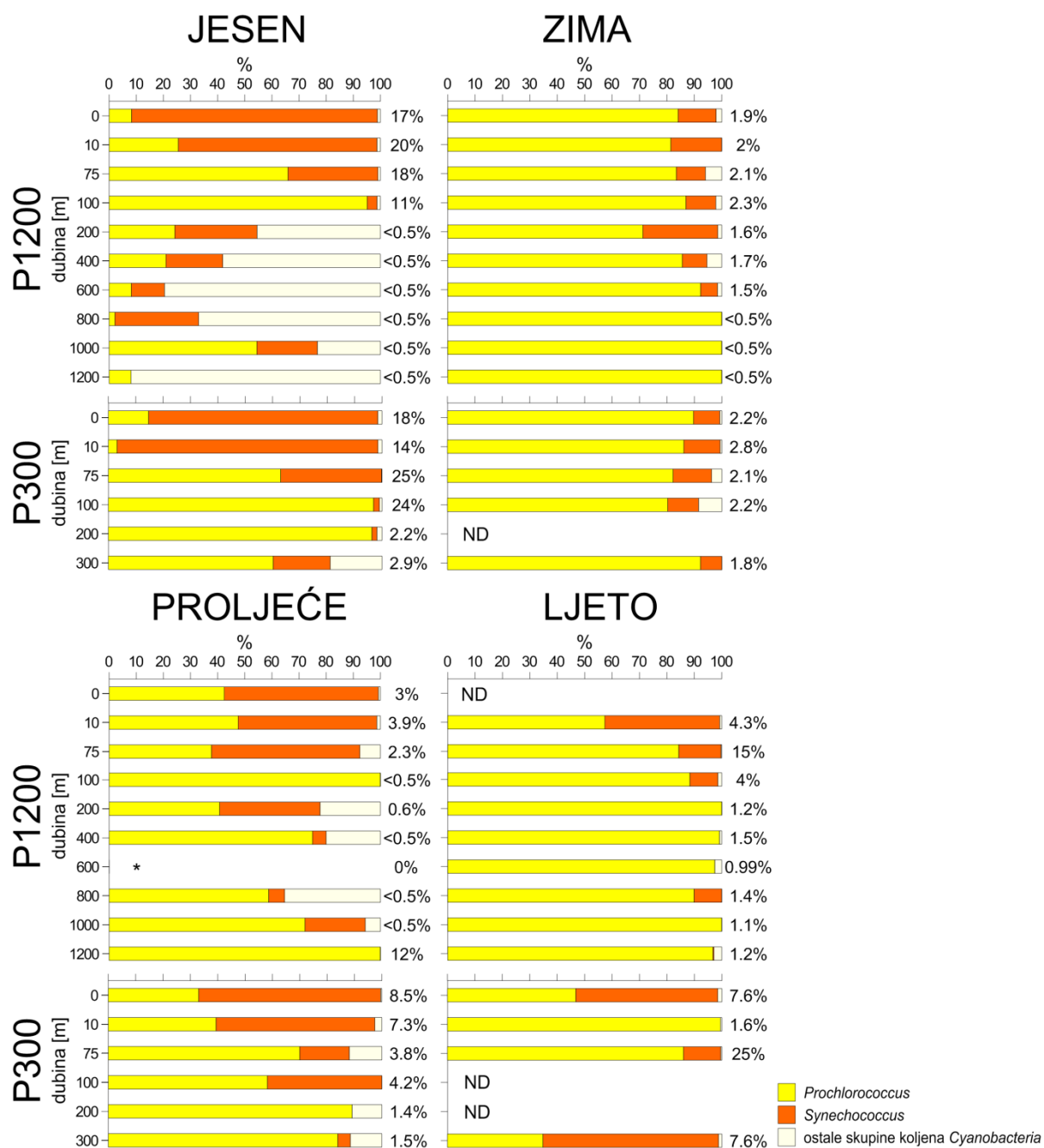
- 
189. **Puddu A, Ferla RL, Allegra A, Bacci C, Lopez M, Oliva F, Pierotti C.** 1998. Seasonal and spatial distribution of bacterial production and biomass along a salinity gradient (northern Adriatic Sea). *Hydrobiologia* **363**:271–282.
190. **Preen K, Kirchman DL.** 2004. Microbial respiration and production in the Delaware Estuary. *Aquat. Microb. Ecol.* **37**:109–119.
191. **Kan J, Crump BC, Wang K, Chen F.** 2006. Bacterioplankton community in Chesapeake Bay: Predictable or random assemblages. *Limnol. Oceanogr.* **51**:2157–2169.
192. **Bouvier TC, del Giorgio P a.** 2002. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnol. Oceanogr.* **47**:453–470.
193. **Alonso C, Gómez-Pereira P, Ramette A, Ortega L, Fuchs B, Amann R.** 2010. Multilevel analysis of the bacterial diversity along the environmental gradient Río de la Plata–South Atlantic Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **61**:57–72.
194. **Fuhrman JA, Hewson I, Schwalbach MS, Steele JA, Brown M V, Naeem S.** 2006. Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**:13104–13109.
195. **Thiele S, Fuchs BM, Ramaiah N, Amann R.** 2012. Microbial community response during the iron fertilization experiment LOHAFEX. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:8803–8812.
196. **Kang I, Lee K, Yang SJ, Choi A, Kang D, Lee YK, Cho JC.** 2012. Genome sequence of „*Candidatus Aquiluna*“ sp. Strain IMCC13023, a marine member of the *Actinobacteria* isolated from an arctic fjord. *J. Bacteriol.* **194**:3550–3551.
197. **Huggett MJ, Rappe MS.** 2012. Genome Sequence of Strain HIMB30, a Novel Member of the Marine *Gammaproteobacteria*. *J. Bacteriol.* **194**:732–733.

## **9. PRILOZI**

---

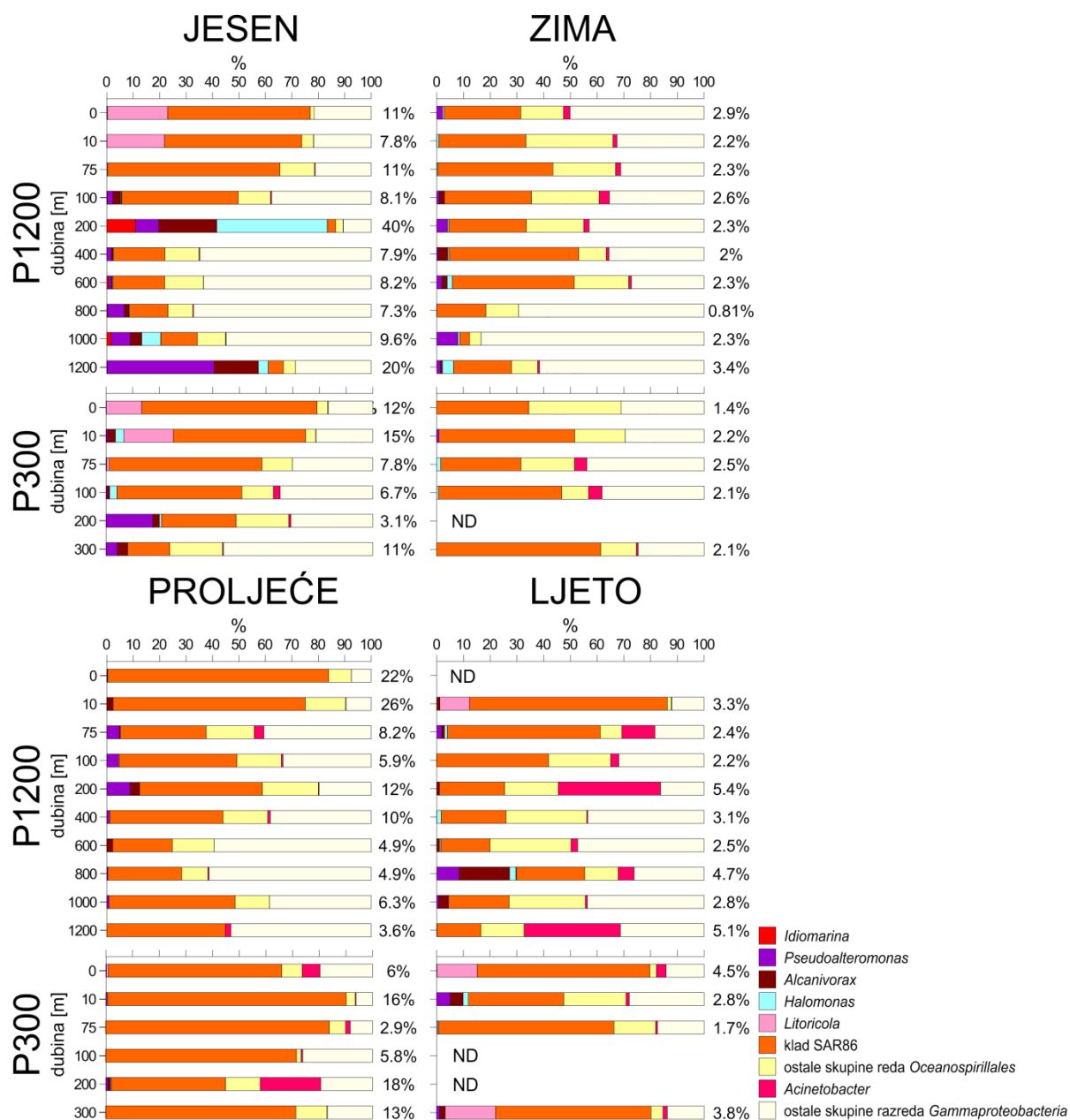


**Slika I.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA razreda *Alphaproteobacteria* na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu. Udio nukleotidnih sljedova razreda *Alphaproteobacteria* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine razreda *Alphaproteobacteria*“. ND, nije determinirano.

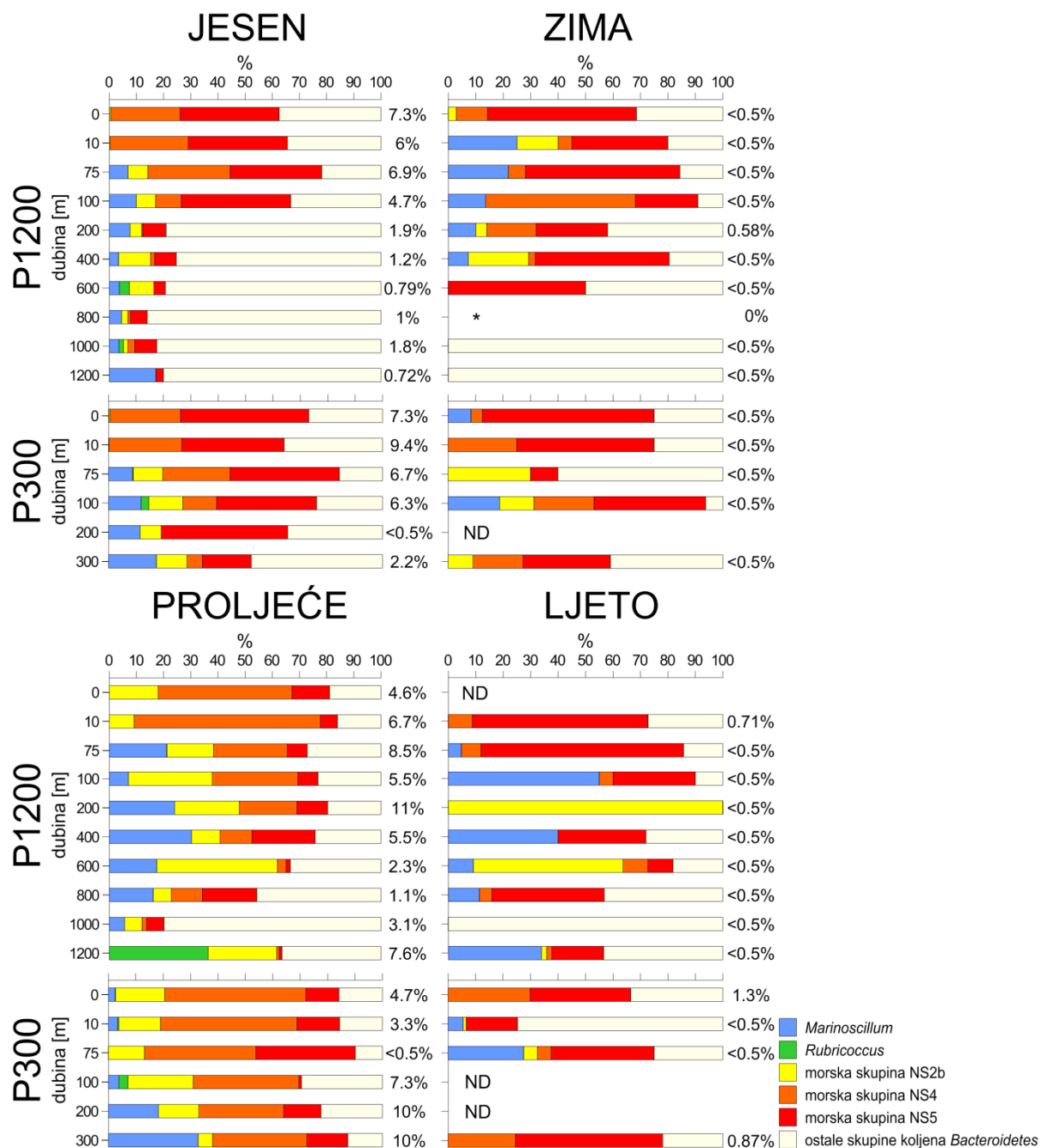


**Slika II.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA koljena *Cyanobacteria* na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu. Udio nukleotidnih sljedova koljena *Cyanobacteria* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine koljena *Cyanobacteria*“. ND, nije determinirano.

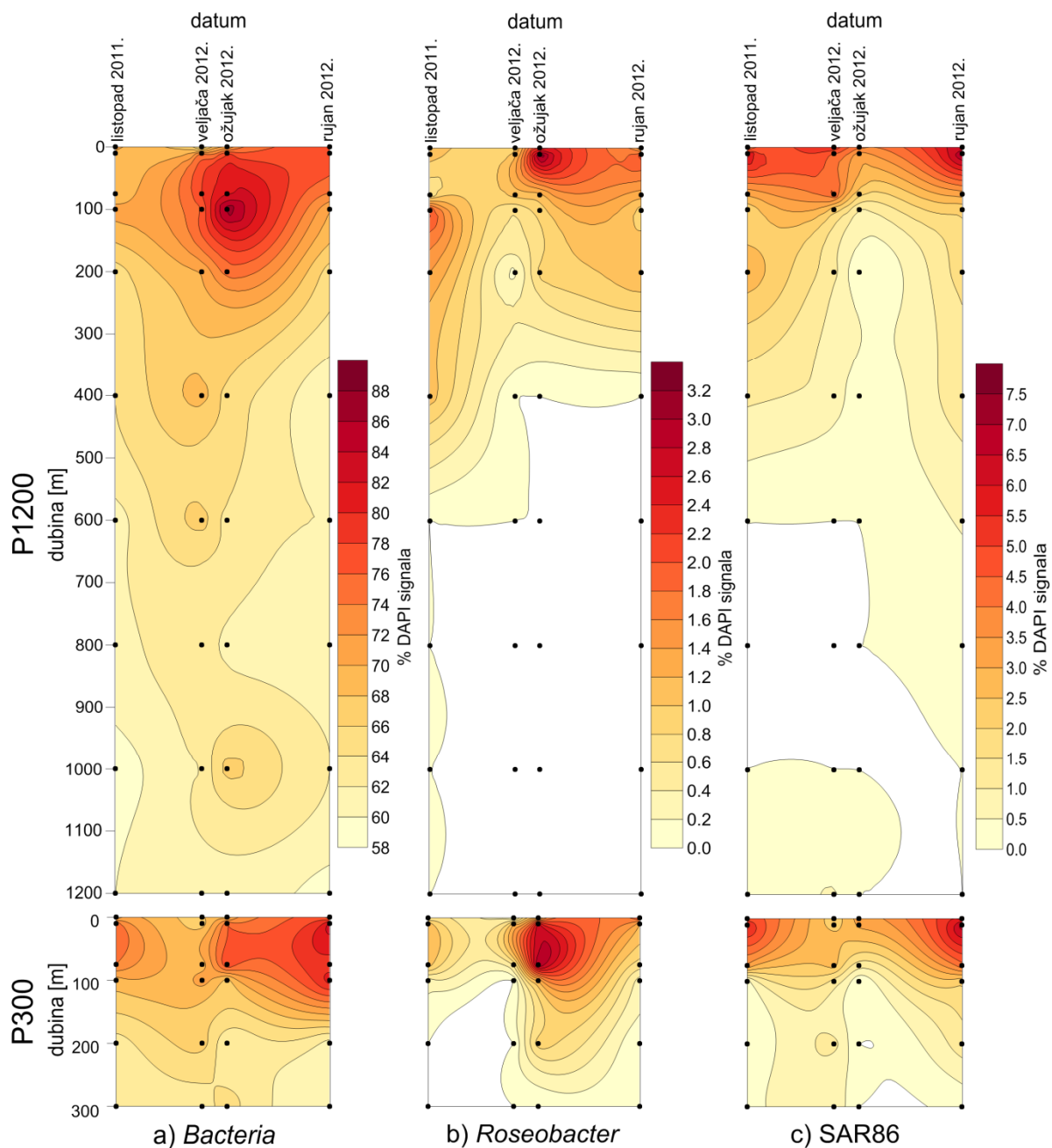




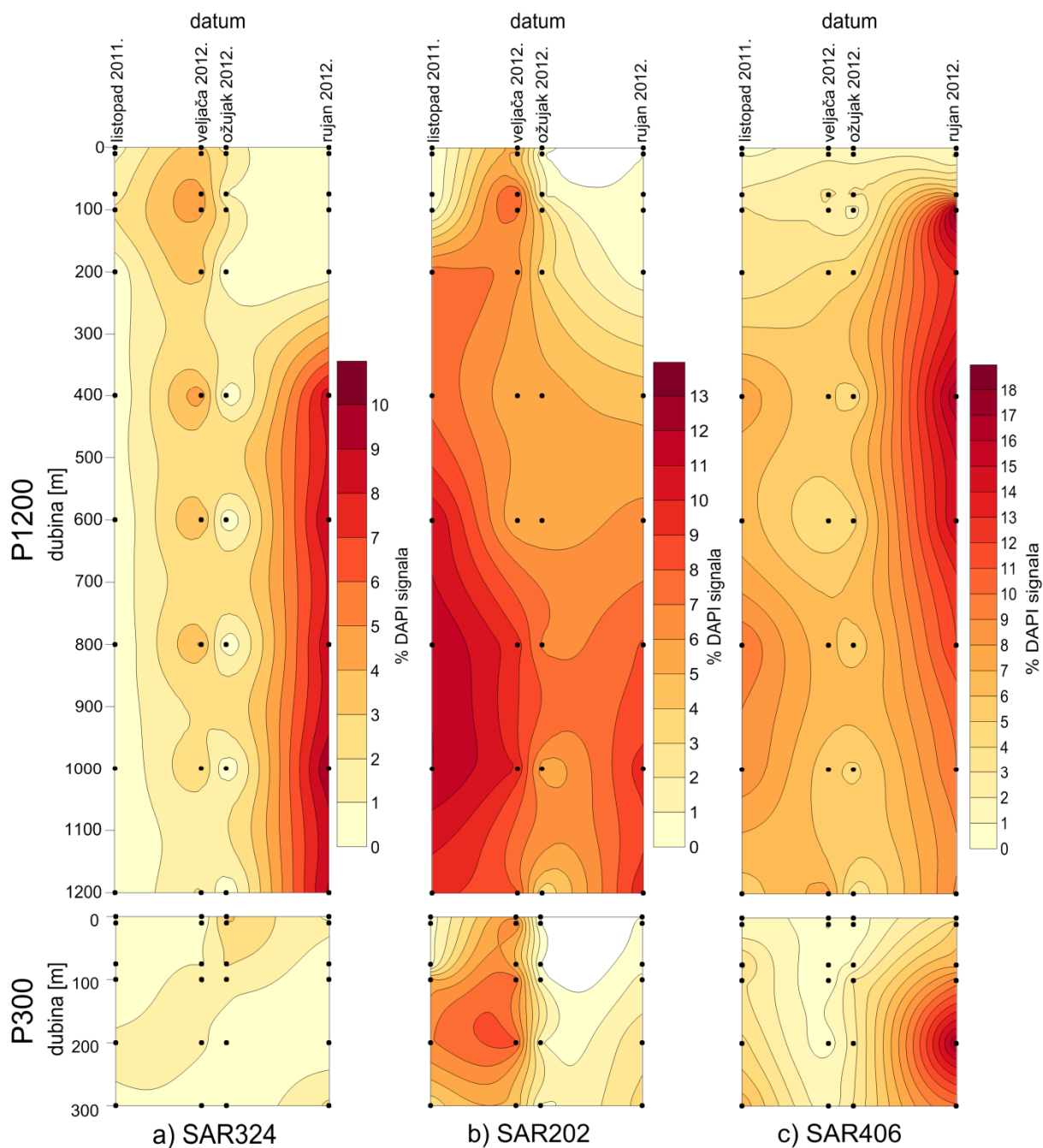
**Slika III.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA razreda *Gammaproteobacteria* na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu. Udio nukleotidnih sljedova razreda *Gammaproteobacteria* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine razreda *Gammaproteobacteria*“. ND, nije determinirano.



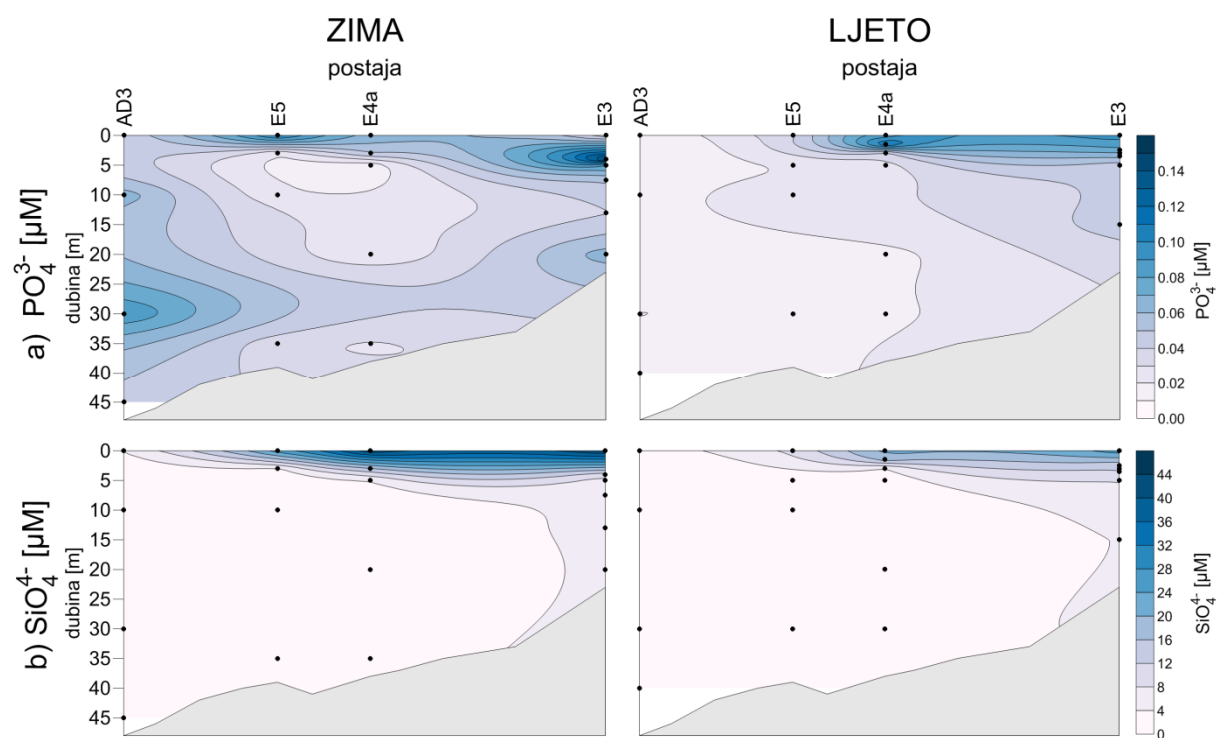
**Slika IV.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA koljena *Bacteroidetes* na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu. Udio nukleotidnih sljedova koljena *Bacteroidetes* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine koljena *Bacteroidetes*“. ND, nije determinirano.



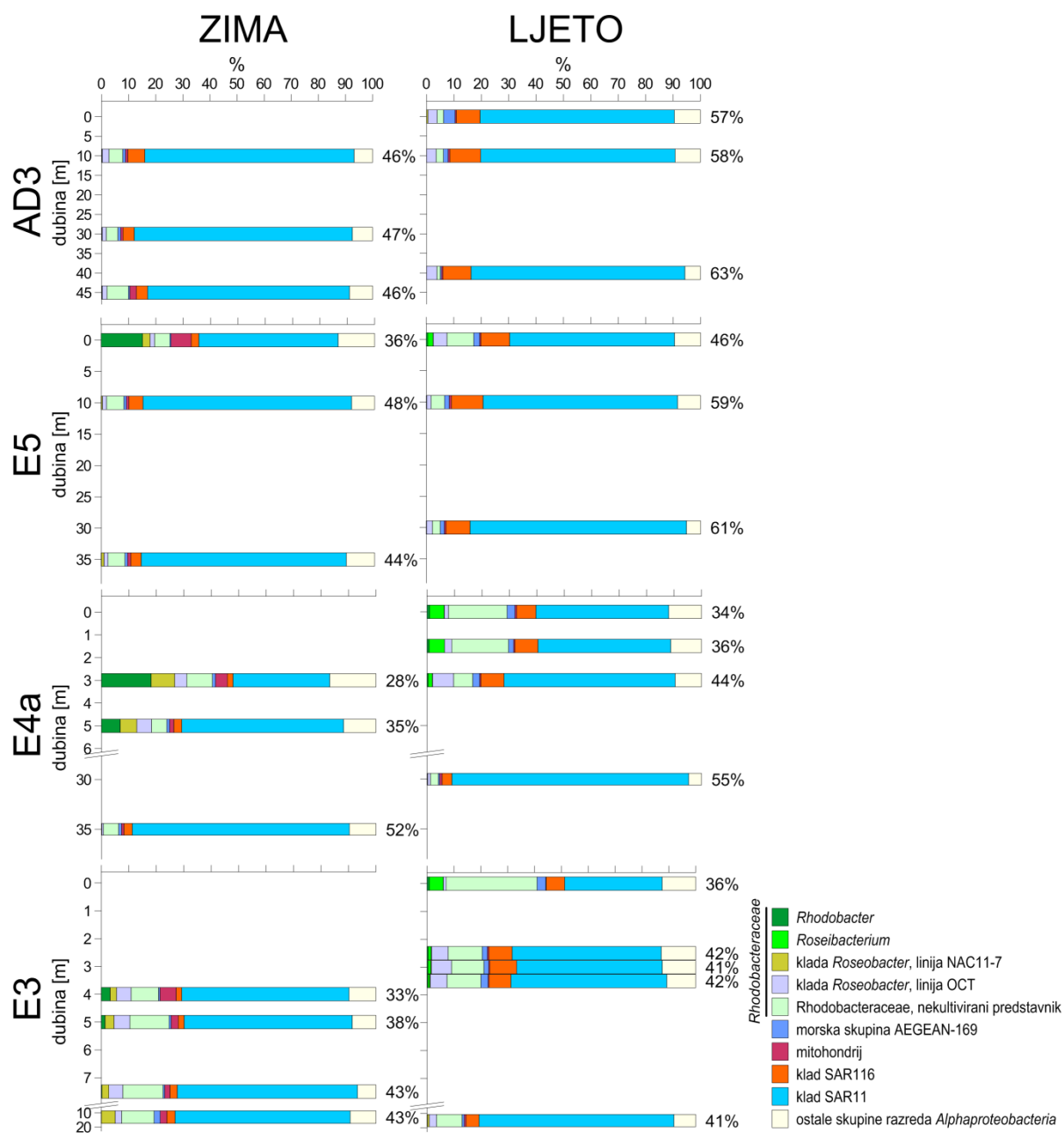
**Slika V.** Vertikalna i sezonska raspodjela bakterija (a) te predstavnika roda *Roseobacter* (b) i klada SAR86 (c) na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu. Udio pojedine skupine prikazan je kao postotak DAPI signala. Dubine uzorkovanja označene su točkama.



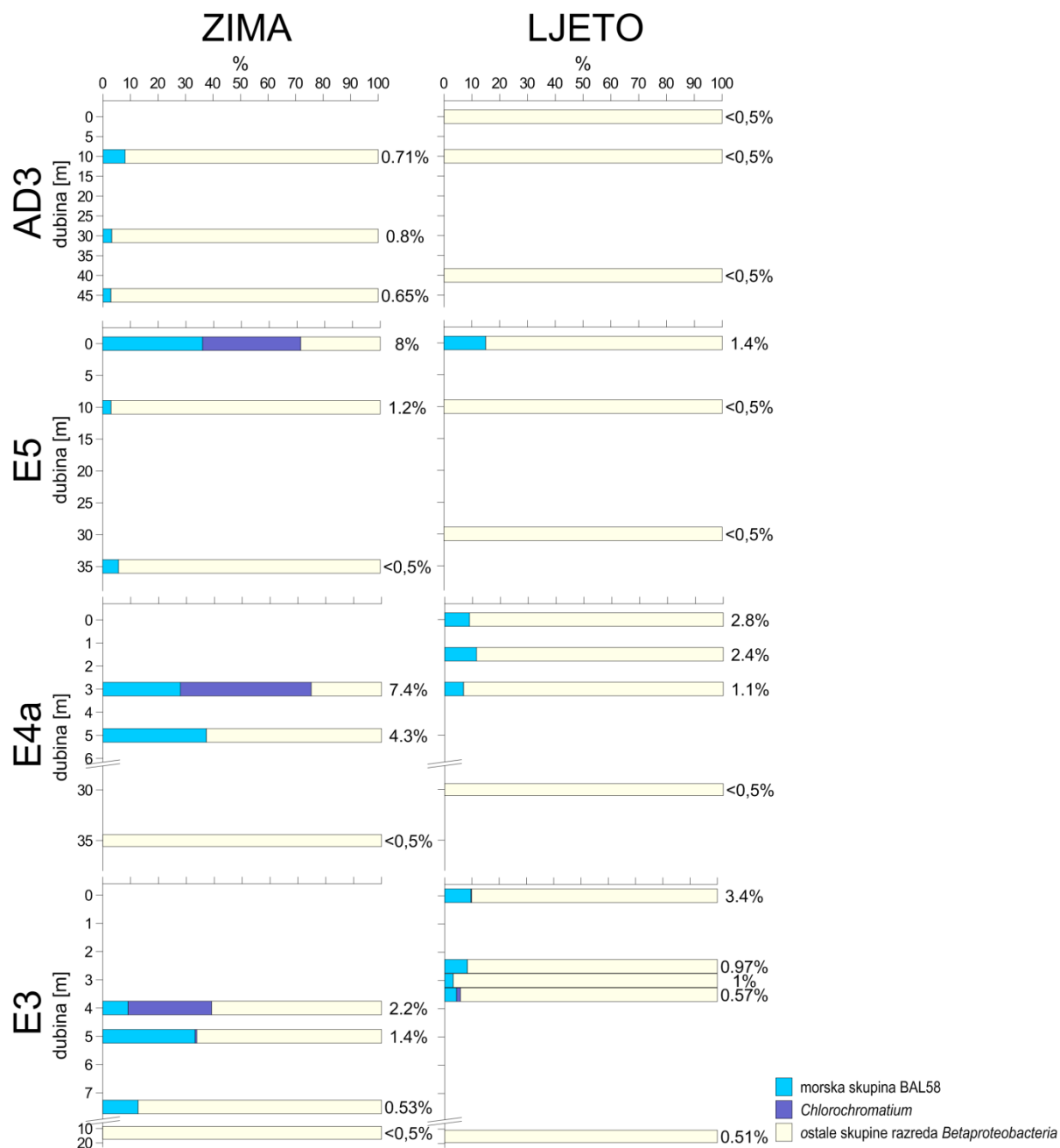
**Slika VI.** Vertikalna i sezonska raspodjela predstavnika klada SAR324 (a), SAR202 (b) i SAR406 (c) na postajama P1200 i P300 u južnom Jadranu. Udio pojedine skupine prikazan je kao postotak DAPI signala. Dubine uzorkovanja označene su točkama.



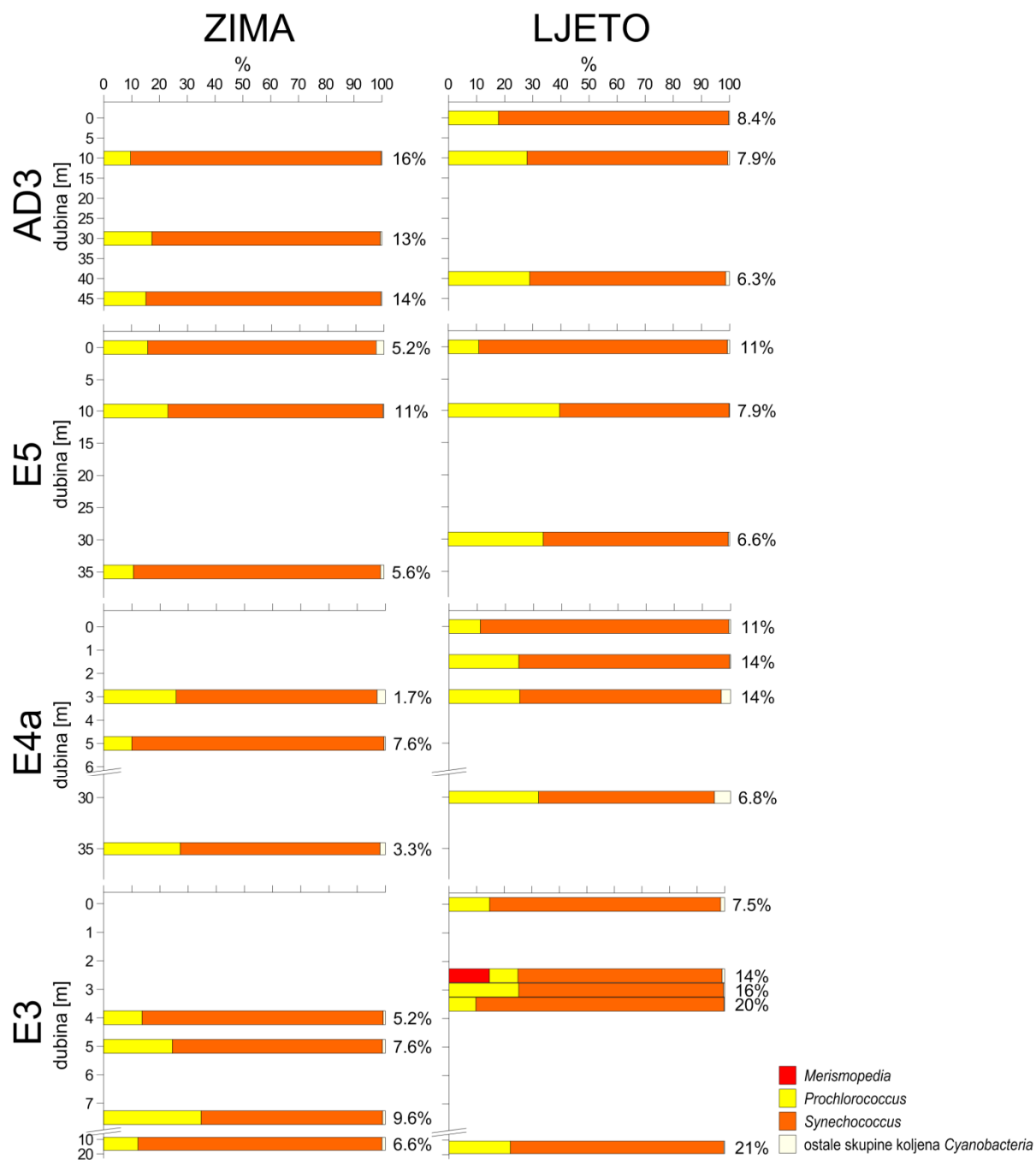
**Slika VII.** Sezonske promjene koncentracije ortofosfata (a) i ortosilikata (b) u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Dubine uzorkovanja označene su točkama.



**Slika VIII.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA razreda *Alphaproteobacteria* u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Udio nukleotidnih sljedova razreda *Alphaproteobacteria* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine razreda *Alphaproteobacteria*“.

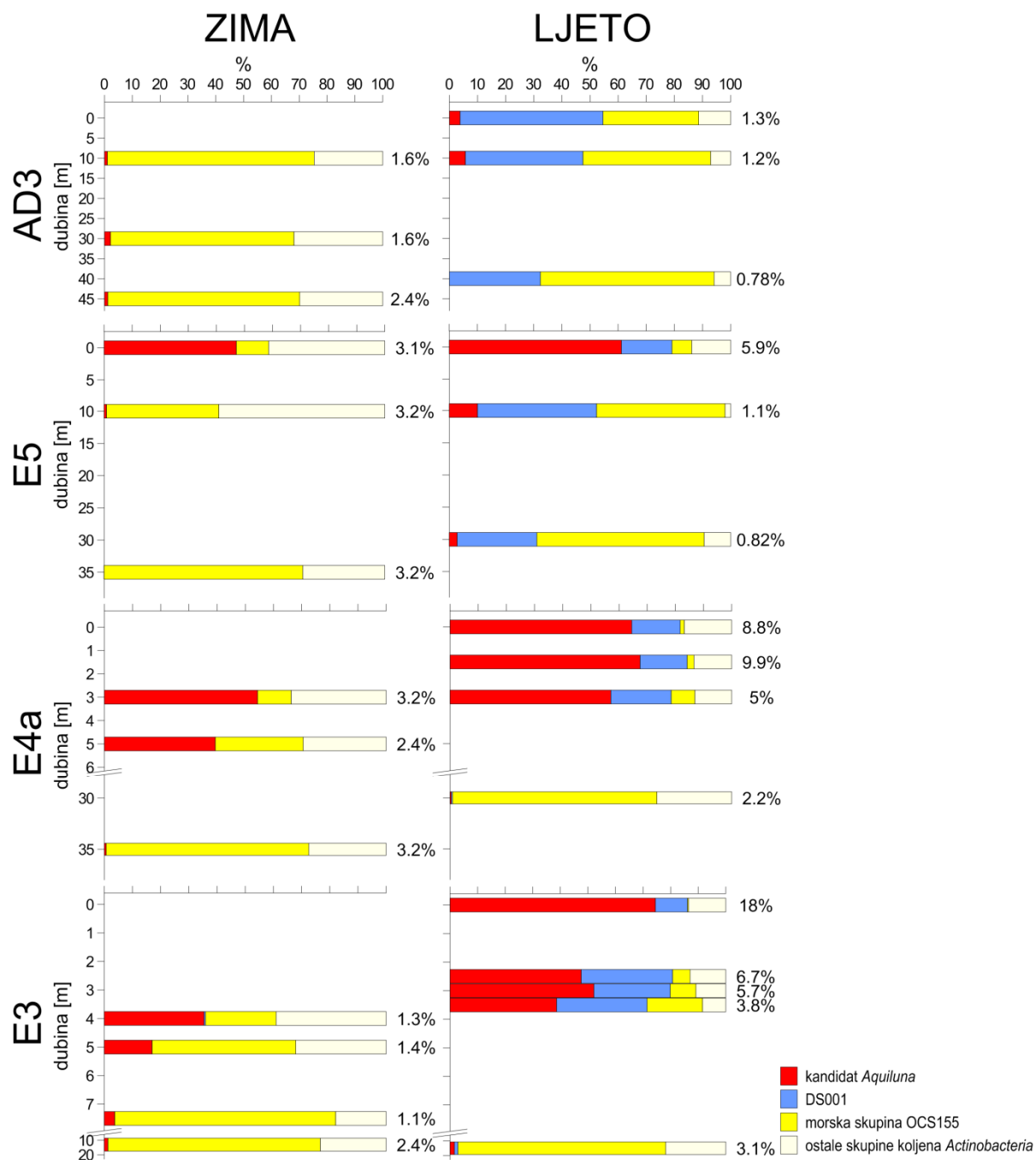


**Slika IX.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA razreda *Betaproteobacteria* u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Udio nukleotidnih sljedova razreda *Betaproteobacteria* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine razreda *Betaproteobacteria*“.

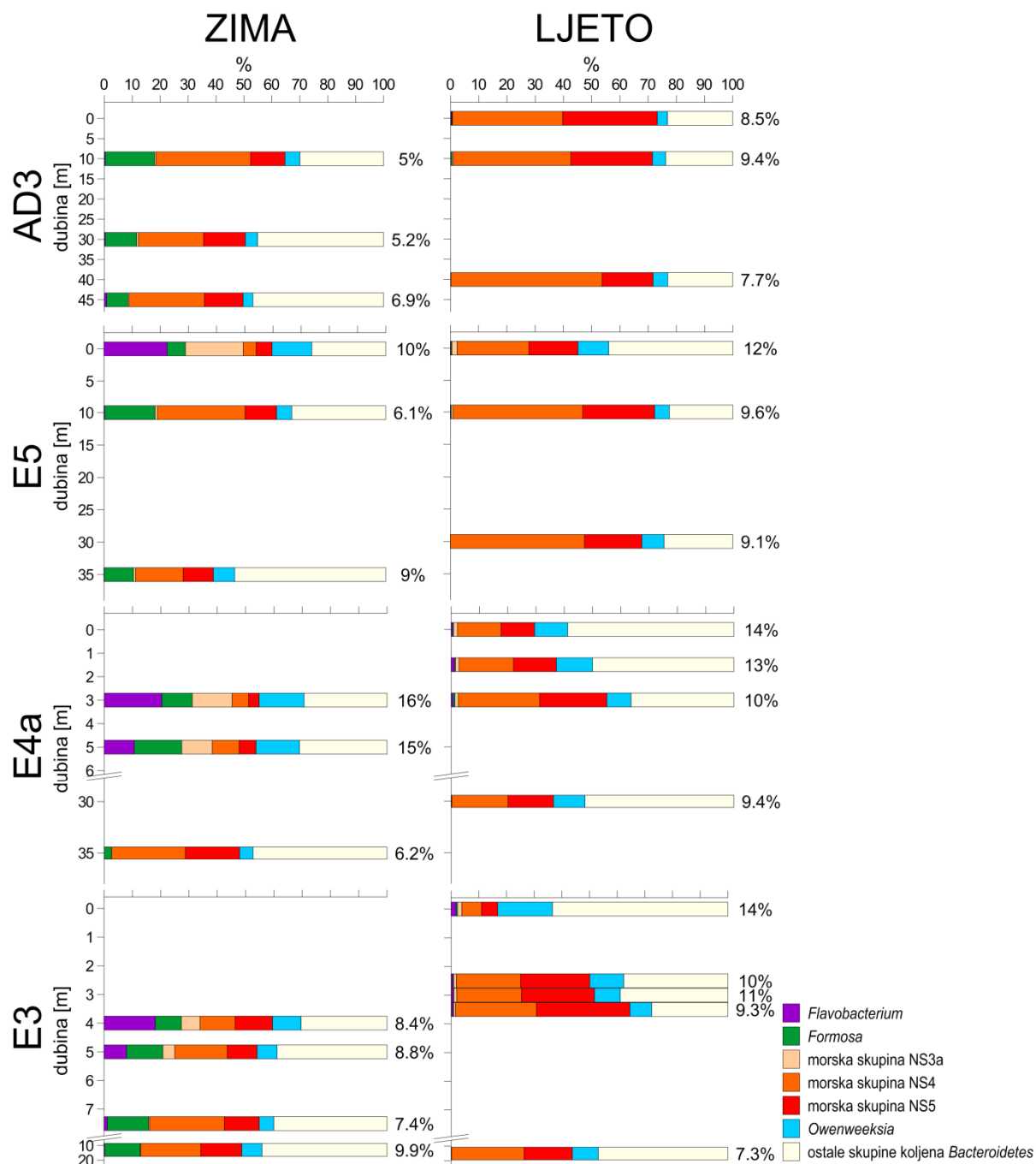


**Slika X.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA koljena *Cyanobacteria* u estuariju rijeke krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Udio nukleotidnih sljedova koljena *Cyanobacteria* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine koljena *Cyanobacteria*“.

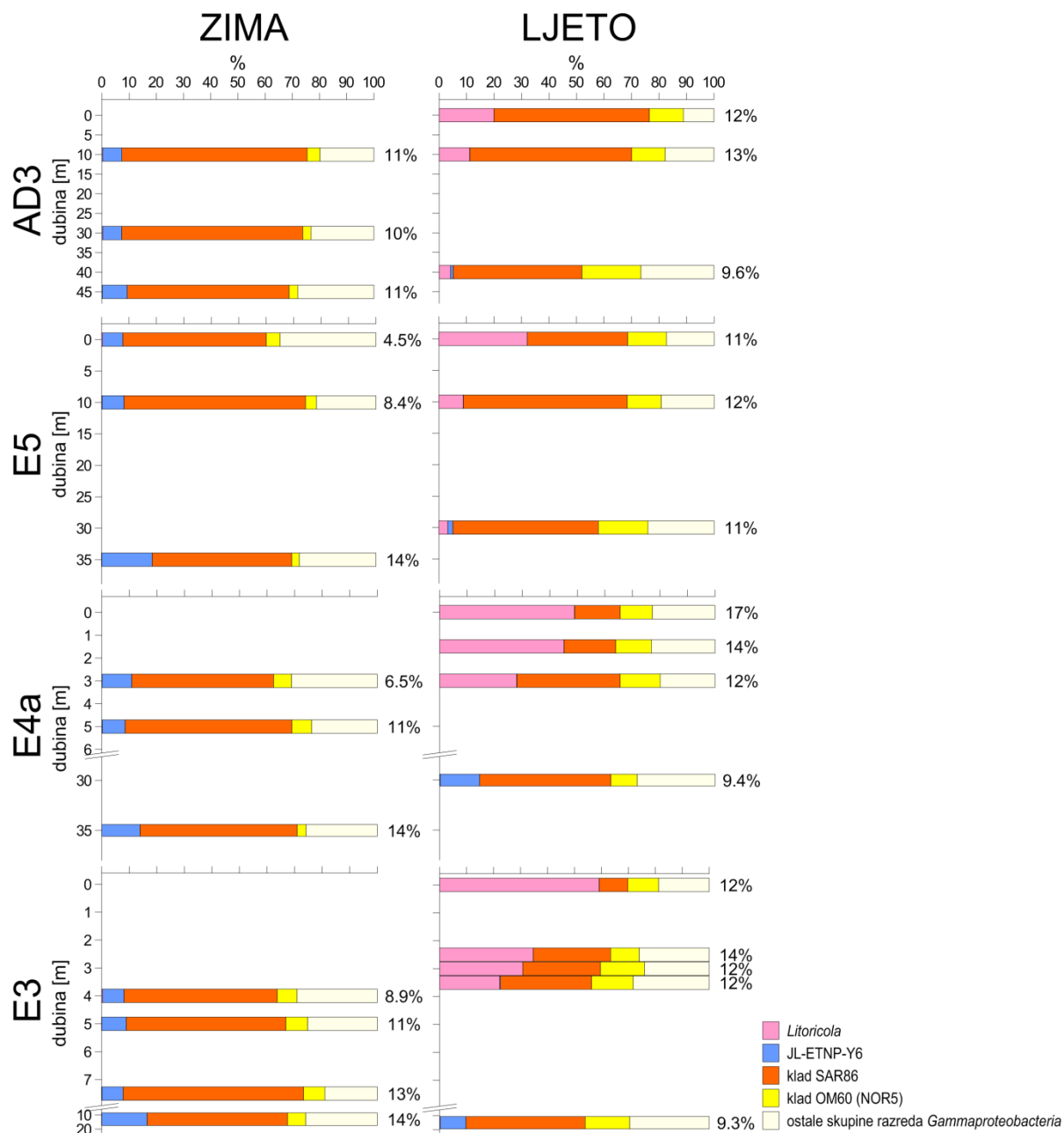




**Slika XI.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA koljena *Actinobacteria* u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Udio nukleotidnih sljedova koljena *Actinobacteria* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine koljena *Actinobacteria*“.



**Slika XII.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA koljena *Bacteroidetes* u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Udio nukleotidnih sljedova koljena *Bacteroidetes* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine koljena *Bacteroidetes*“.



**Slika XIII.** Taksonomska klasifikacija te udio najbrojnijih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA razreda *Gammaproteobacteria* u estuariju rijeke Krke i na kontrolnoj postaji AD3 zimi i ljeti 2013. Udio nukleotidnih sljedova razreda *Gammaproteobacteria* u ukupnom broju nukleotidnih sljedova pojedinog uzorka prikazan je pored stupca. Skupine koje su imale udio manji od 2% u svim uzorcima prikazane su kao „ostale skupine razreda *Gammaproteobacteria*“.

**Tablica I.** Podaci o nukleotidnim sljedovima gena za 16S rRNA dobiveni analizom SILVAngs softverom. U određivanju broja OTU-a i *singleton*-a nisu uzeti u obzir nukleotidni sljedovi klasificirani kao kloroplasti.

područje	sezona (mjesec)	postaja	dubina (m)	minimalna duljina nukleotidnog sljeda (pb)	prosječna duljina nukleotidnog sljeda (pb)	maksimalna duljina nukleotidnog sljeda (pb)	br. nukleotidnih sljedova	br. grupiranih nukleotidnih sljedova	br. identičnih nukleotidnih sljedova	br. klasificiranih nukleotidnih sljedova	br. nukleotidnih sljedova bez srodnika	br. nukleotidnih sljedova uklonjenih u postupku analize	br. OUT-a	br. <i>singleton</i> -a
južni Jadran	jesen (listopad 2011.)	P1200	0 m	202	374	527	23354	15730	5889	23020	314	20	1577	419
			10 m	202	376	531	21168	14002	5159	20757	405	6	1843	536
			75 m	202	371	534	27345	18756	6523	26945	373	27	1926	498
			100 m	202	373	530	38496	26746	9220	38172	270	54	2390	563
			200 m	201	367	529	26246	17574	6120	25632	565	49	2497	657
			400 m	202	374	532	32853	23181	6779	31670	1079	104	2779	540
	zima (veljača 2012.)	P300	0 m	202	377	533	24078	16975	4233	23462	583	33	2829	727
			10 m	201	378	535	30681	20630	7085	29567	1059	55	2903	688
			100 m	202	373	548	25712	18103	5007	25084	604	24	2565	554
			200 m	201	375	553	30697	21096	6700	29895	763	39	2854	697
			300 m	202	372	531	28258	19118	6782	27754	491	13	2106	602
			10 m	202	373	554	22245	15731	5580	21944	287	14	829	157
južni Jadran	jesen (listopad 2011.)	P1200	0 m	202	440	614	12867	7310	3421	12256	392	19	1819	707
			10 m	200	439	552	11492	6784	3039	11141	321	30	1550	574
			75 m	200	440	679	11334	6622	3031	11074	244	16	1566	549
			100 m	200	439	518	8154	4696	2087	7996	150	8	1301	464
			200 m	201	439	583	8693	4829	2384	8539	146	8	1424	541
			400 m	200	439	729	9650	5829	2652	9680	165	5	1307	481
	zima (veljača 2012.)	P300	0 m	201	440	598	6127	3367	1858	5616	467	24	781	278
			10 m	200	439	589	5603	3052	1663	5183	415	5	732	282
			75 m	205	438	554	5196	3203	1042	5064	125	7	896	371
			100 m	200	439	646	6501	3590	2054	6322	172	7	801	277
			300 m	200	439	516	7206	4311	2080	6911	291	4	747	280
			1200 m	200	444	676	4168	2069	1286	4049	117	2	811	287
južni Jadran	proljeće (ožujak 2012.)	P1200	0 m	201	440	598	6127	3367	1858	5616	467	24	781	278
			10 m	200	439	589	5603	3052	1663	5183	415	5	732	282
			75 m	200	438	554	5196	3203	1042	5064	125	7	896	371
			100 m	200	439	646	6501	3590	2054	6322	172	7	801	277
			300 m	200	439	516	7206	4311	2080	6911	291	4	747	280
			1200 m	200	444	676	4168	2069	1286	4049	117	2	811	287
	ljetno (rujan 2012.)	P1200	0 m	200	408	510	4682	3051	1150	4588	82	12	419	95
			10 m	200	407	520	7916	5272	1855	7706	114	96	602	138
			75 m	200	392	552	9058	6219	1432	8770	228	60	1285	391
			100 m	202	404	525	5469	3747	1142	5340	110	19	539	134
			200 m	200	399	539	9072	6205	1341	8569	449	54	1414	445
			400 m	200	390	516	5812	3961	1011	5625	115	72	739	209
ljetno (rujan 2012.)	P300	0 m	200	403	518	2912	1557	906	2653	39	210	234	51	
		10 m	200	413	523	9267	6026	1922	8948	279	40	1276	378	
		100 m	200	405	522	4179	2814	606	3787	158	234	524	146	
		200 m	200	393	512	2895	1844	611	2696	31	168	269	96	
		300 m	200	412	508	16436	10617	4324	16119	285	32	1298	371	
		10 m	200	409	516	8081	5187	2081	7929	120	32	701	191	
estuarij rijeke Krke	jesen (listopad 2011.)	AD3	0 m	200	440	640	19760	10304	7844	19635	102	23	1522	555
			10 m	201	351	508	2899	2066	481	2706	182	11	305	79
			30 m	200	362	508	3288	2309	526	3146	120	22	407	106
			45 m	200	374	511	5990	4166	1115	5917	53	20	662	167
			10 m	200	438	779	15964	9859	3647	15715	241	8	2404	1030
			75 m	200	437	652	15577	10296	2823	15394	161	22	2390	1019
	ljetno (srpanj 2013.)	E5	0 m	200	437	606	10703	6805	1775	10540	141	22	2081	957
			10 m	202	442	555	3840	2167	999	3786	50	4	668	260
			30 m	201	438	567	8177	4746	1346	7998	168	11	2073	1001
			45 m	200	439	628	8101	4899	1286	7922	169	10	1906	888
			10 m	200	441	643	9978	5497	2557	9837	127	14	1904	789
			30 m	201	441	792	9894	5447	2437	9638	193	63	1945	776
estuarij rijeke Krke	jesen (listopad 2011.)	E3	0 m	200	441	651	22304	12226	6961	22315	537	52	3765	1544
			10 m	200	441	633	41353	20514	16426	40498	809	56	4209	1561
			30 m	200	442	667	23306	12980	6395	23009	357	30	3385	1280
			45 m	200	438	550	15519	9579	3693	15385	116	18	2186	851
			10 m	200	440	812	13090	7285	3728	12830	249	11	1987	830
			30 m	200	453	607	18387	10671	4480	17562	781	44	3176	1066
	ljetno (srpanj 2013.)	E3	0 m	200	462	540	11109	7180	2082	10765	287	57	1466	749
			10 m	200	460	542	10931	7788	1990	10628	269	34	960	379
			30 m	221	467	618	11850	8623	1583	11472	332	46	1435	659
			4 m	206	467	801	11956	8384	2191	11536	359	61	1091	482
			5 m	202	467	651	11888	8734	1783	11487	338	53	1127	475
			35 m	204	466	557	9799	6959	1276	9518	243	38	1390	629
estuarij rijeke Krke	jesen (listopad 2011.)	E4a	0 m	206	461	596	15334	10329	3373	14542	735	57	1222	550
			5 m	201	463	556	11594	8296	1989	10918	624	52	1061	411
			7.5 m	204	462	567	11972	8298	2303	11173	747	52	1105	455
			13 m	200	466	560	12778	9467	1645	12058	625	95	1367	541
			40 m	200	463	675	18378	13339	3459	17902	447	29	1373	553
			10 m	204	463	543	12193	8834	1946	11943	231	19	1264	546
	ljetno (srpanj 2013.)	E4a	0 m	200	465	576	12275	8822	1958	11967	289	19	1325	612
			10 m	216	462	542	13648	10102	2259	13437	184	27	1131	442
			30 m	207	461	557	12984	9320	2343	12788	196	20	1263	510
			0 m	213	470	534	11544	7899	2234	11248	285	11	1281	638
			1.5 m	204	469	542	12209	8494	2211	11949	251	9	1371	647
			3 m	203	464	575	10275	7176	1725	10075	189	11	1226	516
ljetno (srpanj 2013.)	E3	0 m	206	471	552	10910	7505	2192	10777	130	3	1124	536	
		2.5 m	203	466	611	9943	6545	1869	9720	213	10	1399	657	
		3 m	210	465	624	12409	8546	2130	12103	298	8	1557	731	
		3.5 m	204	464	597	12084	8202	2290	11843	224	17	1427	636	
		15 m	207	462	598	10048	6894	1792	9782	227	39	1145	478	

**Tablica II.** Broj OTU-a, Chao1 i ACE procjenitelji te Shannon-ov indeks raznolikosti nakon postupka normalizacije zbog nejednolikog broj nukleotidnih sljedova u svakom uzorku. Svako istraživano područje (južni Jadran, sjeverni Jadran i estuarij rijeke Krke normalizirani su zasebno.

područje	sezona (mjesec)	postaja	dubina (m)	broj OTU-a	Chao1 procjenitelj	ACE procjenitelj	Shannon-ov indeks raznolikosti
južni Jadran	jesen (listopad 2011.)	P1200	0 m	642	1124	1103	5,79
			10 m	740	1409	1432	5,78
			75 m	756	1347	1339	5,93
			100 m	812	1473	1470	6,06
			200 m	896	1630	1906	6,16
			400 m	1023	1744	1857	6,50
		600 m	1048	1999	2143	6,51	
		800 m	1012	1990	2084	6,30	
		1000 m	1027	1841	1917	6,51	
		1200 m	1005	1806	1960	6,39	
		P300	0 m	713	1218	1302	5,83
			10 m	458	621	624	5,37
	75 m		633	995	1027	5,64	
	100 m		556	783	802	5,58	
	200 m		1072	2304	2668	6,39	
	300 m		683	904	912	6,04	
	zima (veljača 2012.)	P1200	0 m	816	1744	1974	5,84
			10 m	721	1332	1553	5,57
			75 m	781	1543	1625	5,85
			100 m	736	1301	1341	5,74
			200 m	799	1513	1660	5,83
			400 m	674	1156	1267	5,57
		600 m	791	1518	1660	5,88	
		800 m	439	639	678	4,43	
		1000 m	448	760	759	4,48	
		1200 m	642	956	1039	5,53	
		P300	0 m	558	966	955	5,15
			10 m	535	878	912	5,18
	75 m		629	1191	1313	5,34	
	100 m		531	873	893	5,19	
	300 m		463	666	756	4,85	
	0 m		355	494	565	4,71	
	proljeće (ožujak 2012.)	P1200	10 m	406	587	599	4,94
			75 m	770	1373	1416	5,97
			100 m	414	560	545	5,27
			200 m	793	1286	1377	6,06
			400 m	569	887	885	5,49
			600 m	234	322	314	3,81
		800 m	736	1237	1238	5,88	
		1000 m	452	668	660	5,27	
		1200 m	261	441	424	4,57	
		P300	0 m	612	1138	1202	5,32
			10 m	437	770	806	4,76
			75 m	544	1006	1156	4,92
	100 m		305	414	398	4,84	
	200 m		380	580	530	5,16	
	300 m		495	767	753	5,46	
	ljetno (rujan 2012.)	P1200	10 m	920	2335	2443	5,92
75 m			870	1982	2037	6,00	
100 m			916	2014	2127	6,12	
200 m			568	910	960	5,42	
400 m			1040	2269	2566	6,30	
600 m			996	2234	2259	6,29	
800 m		949	1917	2141	6,15		
1000 m		985	2049	2109	6,31		
1200 m		1094	2715	3167	6,34		
P300		0 m	991	2386	2838	5,67	
		10 m	1044	2331	2543	6,34	
		75 m	864	1598	1741	6,07	
	300 m	805	1607	1831	5,52		
	10 m	2071	3109	3195	6,67		
	10 m	2450	3566	3767	6,97		
sjeverni Jadran	proljeće (svibanj 2011.)	SJ107	10 m	1697	2826	3016	5,74
		SJ108	10 m	1251	1914	2009	5,31
	jesen (listopad 2011.)	SJ107	10 m	2694	4331	4525	6,92
		SJ108	10 m	494	788	718	3,49
	jesen (studenj 2011.)	SJ107	10 m	1072	1777	1776	5,20
		SJ108	10 m	866	1354	1327	4,84
zima (siječanj 2012.)	SJ107	10 m	949	1771	1772	5,05	
	SJ108	10 m	1351	3056	3254	5,56	
estuarij rijeke Krke	zima (veljača 2013.)	AD3	10 m	1276	2771	2910	5,42
			30 m	1466	3604	3599	5,62
			45 m	881	1699	1716	5,04
		E5	35 m	1204	2461	2564	5,54
			3 m	1068	2123	2267	5,48
			5 m	1020	2182	2134	5,24
		E4a	35 m	1324	3125	3012	5,55
			4 m	1076	2566	2447	5,21
			5 m	1007	2045	2002	5,29
		E3	7,5 m	981	1974	1997	4,98
			13 m	1137	2173	2234	5,53
			0 m	933	1823	1822	5,16
	ljetno (srpanj 2013.)	AD3	10 m	1010	2058	2144	5,23
			40 m	994	2208	2113	5,22
			0 m	1091	2654	2479	5,33
		E5	10 m	907	1866	1793	5,11
			30 m	1020	2041	2179	5,29
			0 m	1057	2630	2636	5,40
		E4a	1,5 m	1103	2496	2643	5,46
			3 m	1115	2193	2287	5,42
			30 m	1119	2533	2426	5,28
		E3	0 m	965	2084	2251	5,24
			2,5 m	1273	2699	2836	5,58
			3 m	1262	2889	2873	5,60
3,5 m	1164	2499	2561	5,34			
	15 m	1065	2203	2165	5,13		

**Tablica III.** Udio pojedine skupine u prokariotskoj pikoplanktonskoj zajednici određen analizom CARD-FISH korištenjem specifične sonde za svaku skupinu. ND, nije determinirano.

područje	sezona (mjesec)	postaja	dubina (m)	DAPI signali (x 10 <sup>5</sup> stanica ml <sup>-1</sup> )	% DAPI signala															
					<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Alphapr.</i>	<i>Roseobacter</i>	SAR11	<i>Betapr.</i>	<i>Gammapr.</i>	SAR86	SAR324	<i>Cyano.</i>	<i>Synecho.</i>	<i>Prochlo.</i>	<i>Bactero.</i>	<i>Actino.</i>	SAR202	SAR406
					ARCH915	EUBI-II	ALF968	ROSS57	SAR11-MIX	BET42a	GAM42a	SAR86-1245	SAR324-1412	CYA664	SYN405	PRO405	CF319a	HGC69a	SAR202-319R	SAR406-97
južni Jadran	jesen (listopad 2011.)	P1200	0 m	4,0	1,4	71	ND	1,2	47	ND	9,9	3,5	0,45	17	ND	ND	4,5	ND	0	0,34
			10 m	2,6	2,2	69	ND	1,1	51	ND	10	6,3	0,78	19	ND	ND	5,1	ND	0	0,98
			75 m	3,3	3,4	68	ND	0,60	50	ND	14	3,1	1,5	16	ND	ND	3,4	ND	0	2,2
			100 m	2,6	5,4	71	ND	2,1	50	ND	13	2,1	2,2	17	ND	ND	4,5	ND	0,60	3,2
			200 m	2,4	12	65	ND	1,4	46	ND	9,2	2,9	0,21	0	ND	ND	3,4	ND	7,5	3,1
			400 m	1,4	13	64	ND	1,1	47	ND	4,3	1,1	0,11	0	ND	ND	2,1	ND	7,7	7,8
		600 m	1,1	19	61	ND	0	43	ND	2,5	0	0	0	ND	ND	0,92	ND	11	6,5	
		800 m	0,97	12	61	ND	0	42	ND	0,60	0	0	0	ND	ND	0,10	ND	12	10	
		1000 m	1,1	21	59	ND	0	31	ND	0,98	0	0	0	ND	ND	0	ND	12	9,0	
		1200 m	1,1	10	60	ND	0	31	ND	1,6	0	0	0	ND	ND	0	ND	9,2	5,4	
		P300	0 m	4,8	1,2	68	ND	0,50	49	ND	11	4,5	0,12	19	ND	ND	6,5	ND	0,60	2,1
			10 m	3,9	2,1	76	ND	1,2	51	ND	14	5,7	0	15	ND	ND	9,3	ND	0,60	0,97
	75 m		3,7	3,2	74	ND	1,1	47	ND	12	3,4	0,21	23	ND	ND	8,2	ND	0,60	4,3	
	100 m		3,5	15	69	ND	0,30	51	ND	9,3	0,30	0,12	20	ND	ND	6,3	ND	5,3	3,1	
	200 m		2,1	23	63	ND	0	57	ND	1,6	0,21	1,2	0	ND	ND	2,1	ND	6,9	4,3	
	300 m		2,2	9,9	62	ND	0	47	ND	1,8	0,43	0,86	0	ND	ND	1,9	ND	3,3	6,7	
	zima (veljača 2012.)	P1200	0 m	2,2	ND	62	ND	0,90	54	ND	ND	5,6	3,2	3,1	ND	ND	3,9	ND	5,5	1,4
			10 m	2,3	ND	75	ND	1,1	49	ND	5,8	4,3	3,4	4,3	ND	ND	4,2	ND	4,5	1,8
			75 m	2,5	4,2	78	ND	1,1	51	ND	1,9	4,6	4,5	1,2	ND	ND	2,6	ND	8,2	3,2
			100 m	2,5	4,5	76	ND	0,60	49	ND	1,3	2,1	4,3	2,1	ND	ND	2,2	ND	7,4	2,8
			200 m	4,3	4,8	70	ND	0,10	45	ND	1,2	1,2	3,6	0	ND	ND	1,9	ND	6,6	4,5
			400 m	2,0	6,7	69	ND	0	51	ND	0	0,90	4,8	0	ND	ND	0	ND	5,1	5,3
		P300	600 m	1,7	3,6	67	ND	0	56	ND	0	0	4,2	0	ND	ND	0	ND	5,1	3,9
			800 m	1,3	6,7	64	ND	0	43	ND	0	0	4,2	0	ND	ND	0	ND	9,5	6,4
1000 m			0,94	5,4	62	ND	0	42	ND	0	0	3,1	0	ND	ND	0	ND	10	5,4	
1200 m			1,2	5,3	61	ND	0	45	ND	0	0,60	2,2	0	ND	ND	0	ND	8,2	7,6	
0 m			2,8	0,20	68	ND	0,10	51	ND	3,2	2,1	0,20	0	ND	ND	4,8	ND	5,2	0,20	
10 m			2,6	2,1	67	ND	1,2	47	ND	3,3	2,4	0,40	1,4	ND	ND	5,4	ND	7,1	1,1	
P300	75 m	3,5	3,2	69	ND	0,60	57	ND	3,3	2,7	0,90	0,20	ND	ND	1,1	ND	5,1	0,60		
	100 m	2,1	3,3	71	ND	0	54	ND	2,7	1,3	2,1	0,40	ND	ND	4,8	ND	7,5	0,20		
	200 m	3,7	4,2	67	ND	0	45	ND	5,0	1,2	1,3	0	ND	ND	9,1	ND	8,2	0,50		
	300 m	3,0	4,7	63	ND	0	43	ND	6,5	0,90	0,70	0	ND	ND	12	ND	4,6	1,3		

## Nastavak tablice III.

područje	sezona (mjesec)	postaja	dubina (m)	DAPI signali (x 10 <sup>5</sup> stanica ml <sup>-1</sup> )	% DAPI signala																	
					<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Alphapr.</i>	<i>Roseobacter</i>	SAR11	<i>Betapr.</i>	<i>Gammapr.</i>	SAR86	SAR324	<i>Cyano.</i>	<i>Synecho.</i>	<i>Prochlo.</i>	<i>Bactero.</i>	<i>Actino.</i>	SAR202	SAR406		
					ARCH915	EUBI-II	ALF968	ROS537	SAR11-MIX	BET42a	GAM42a	SAR86-1245	SAR324-1412	CYA664	SYN405	PRO405	CF319a	HGC69a	SAR202-319R	SAR406-97		
južni Jadran	proljeće (ožujak 2012.)	P1200	0 m	4,0	2,1	69	ND	2,1	53	ND	21	4,3	1,3	6,1	ND	ND	3,2	ND	0,80	1,4		
			10 m	4,3	2,1	79	ND	3,3	48	ND	24	3,1	2,1	10	ND	ND	5,5	ND	0	1,5		
			75 m	3,0	3,4	81	ND	1,1	47	ND	9,7	2,2	0,90	11	ND	ND	6,7	ND	1,2	3,2		
			100 m	2,6	4,3	88	ND	0,90	48	ND	3,2	0,90	2,2	2,2	ND	ND	3,2	ND	3,5	1,3		
			200 m	3,0	5,6	75	ND	0,90	43	ND	4,3	0	0	2,5	ND	ND	8,2	ND	3,4	4,5		
			400 m	2,0	7,5	65	ND	0	41	ND	1,2	0	0	0	ND	ND	1,2	ND	5,6	4,3		
			600 m	1,8	5,4	63	ND	0	39	ND	0,92	0	0	0	ND	ND	2,1	ND	5,4	4,7		
			800 m	1,6	4,3	61	ND	0	43	ND	2,2	0	0	0	ND	ND	0	ND	6,7	5,3		
			1000 m	1,5	4,6	67	ND	0	41	ND	0	0	0	0	ND	ND	0,20	ND	5,2	4,7		
			1200 m	1,4	3,2	61	ND	0	40	ND	1,4	0	0	0	ND	ND	0,50	ND	3,1	3,1		
			ljetno (rujan 2012.)	P300	0 m	7,9	3,1	68	ND	0,90	53	ND	5,4	3,2	3,1	4,2	ND	ND	13	ND	0	0,80
					10 m	8,6	2,1	76	ND	2,7	58	ND	12	3,1	2,9	6,4	ND	ND	15	ND	0	0,10
	75 m	3,8			7,0	78	ND	3,0	44	ND	6,5	1,2	2,1	7,6	ND	ND	11	ND	0	1,2		
	100 m	3,3			5,4	67	ND	1,2	48	ND	3,0	0	1,2	2,1	ND	ND	5,2	ND	0,80	3,1		
	200 m	4,0			6,6	62	ND	0,90	42	ND	5,3	0	0	2,6	ND	ND	4,2	ND	1,1	2,6		
	300 m	3,4			4,2	65	ND	0	41	ND	6,7	0	0,30	0	ND	ND	1,1	ND	0,90	3,1		
	0 m	4,2			1,1	78	ND	1,2	59	ND	15	6,2	0,59	9,8	ND	ND	3,3	ND	0	1,5		
	10 m	4,6			3,4	78	ND	2,1	59	ND	12	7,2	0,47	9,2	ND	ND	5,6	ND	0	0,66		
	75 m	4,3			9,6	74	ND	1,3	43	ND	2,9	3,2	0,81	19	ND	ND	7,5	ND	0,31	6,1		
	100 m	2,8			16	70	ND	0,90	46	ND	3,2	2,1	0,61	7,6	ND	ND	2,1	ND	0,27	18		
	200 m	1,8			20	65	ND	1,2	43	ND	5,1	1,8	0,49	1,2	ND	ND	2,0	ND	0,33	13		
	400 m	2,1			14	60	ND	0	40	ND	6,1	1,4	8,7	0,23	ND	ND	1,3	ND	4,6	17		
	600 m	1,7	12	62	ND	0	41	ND	3,2	0,56	9,1	0	ND	ND	0	ND	6,4	15				
	800 m	1,3	16	60	ND	0	40	ND	2,1	0,12	8,8	0	ND	ND	0	ND	8,1	12				
1000 m	1,1	16	62	ND	0	40	ND	2,4	0	10	0	ND	ND	0	ND	9,6	10					
1200 m	1,1	9,8	59	ND	0	39	ND	1,2	0	9,2	0	ND	ND	0	ND	9,8	9,2					
P300	0 m	3,2	1,2	74	ND	2,1	47	ND	11	5,2	0,69	8,3	ND	ND	5,4	ND	0	2,9				
	10 m	3,3	2,1	83	ND	1,2	58	ND	15	6,8	1,2	9,2	ND	ND	6,7	ND	0,20	5,1				
	75 m	2,9	4,4	79	ND	0,70	57	ND	2,3	4,3	0,48	18	ND	ND	7,2	ND	0,60	6,7				
	100 m	2,1	17	81	ND	0,30	47	ND	3,1	2,1	0,19	6,8	ND	ND	1,2	ND	1,3	9,5				
	200 m	1,5	23	61	ND	0	40	ND	4,3	1,3	0,19	2,1	ND	ND	0,54	ND	2,9	17				
	300 m	3,2	11	60	ND	0	40	ND	2,2	0,12	2,2	0,90	ND	ND	0	ND	3,4	9,8				

## Nastavak tablice III.

područje	sezona (mjesec)	postaja	dubina (m)	DAPI signali (x 10 <sup>5</sup> stanica ml <sup>-1</sup> )	% DAPI signala																
					<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Alphapr.</i>	<i>Roseobacter</i>	SAR11	<i>Betapr.</i>	<i>Gammapr.</i>	SAR86	SAR324	<i>Cyano.</i>	<i>Synecho.</i>	<i>Prochlo.</i>	<i>Bactero.</i>	<i>Actino.</i>	SAR202	SAR406	
					ARCH915	EUBI-II	ALF968	ROS537	SAR11-MIX	BET42a	GAM42a	SAR86-1245	SAR324-1412	CYA664	SYN405	PRO405	CF319a	HGC69a	SAR202-319R	SAR406-97	
sjeverni Jadran	proljeće (svibanj 2011.)	SJ107	0 m	13	ND	66	22	ND	ND	ND	11	ND	ND	ND	0,96	0,27	19	ND	ND	ND	
			10 m	8,8	ND	74	24	ND	ND	ND	8,3	ND	ND	ND	1,1	0,39	19	ND	ND	ND	ND
		SJ108	0 m	20	ND	78	34	ND	ND	ND	42	ND	ND	ND	3,0	1,5	20	ND	ND	ND	ND
	10 m		9,9	ND	64	23	ND	ND	ND	7,1	ND	ND	ND	3,0	1,1	21	ND	ND	ND	ND	
	ljeto (kolovoz)	SJ107	0 m	18	ND	69	25	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND	4,2	0,30	15	ND	ND	ND	ND
			10 m	13	ND	63	17	ND	ND	ND	9,3	ND	ND	ND	2,2	ND	12	ND	ND	ND	ND
		SJ108	0 m	6,0	ND	69	21	ND	ND	ND	20	ND	ND	ND	2,4	0	5,7	ND	ND	ND	ND
	10 m		17	ND	64	27	ND	ND	ND	12	ND	ND	ND	7,3	0,17	8,0	ND	ND	ND	ND	
	ljeto (rujan)	SJ107	0 m	12	ND	63	25	ND	ND	ND	9,4	ND	ND	ND	1,3	0,40	4,8	ND	ND	ND	ND
			10 m	13	ND	68	15	ND	ND	ND	9,9	ND	ND	ND	5,4	0,29	9,1	ND	ND	ND	ND
		SJ108	0 m	11	ND	71	14	ND	ND	ND	8,2	ND	ND	ND	2,8	0	2,4	ND	ND	ND	ND
	10 m		21	ND	93	34	ND	ND	ND	25	ND	ND	ND	21	0,47	18	ND	ND	ND	ND	
	jesen (listopad 2011.)	SJ107	0 m	14	ND	71	13	ND	ND	ND	4,8	ND	ND	ND	2,0	0,35	2,7	ND	ND	ND	ND
			10 m	20	ND	68	14	ND	ND	ND	7,8	ND	ND	ND	4,4	0	12	ND	ND	ND	ND
		SJ108	0 m	11	ND	83	27	ND	ND	ND	15	ND	ND	ND	3,6	0,10	9,7	ND	ND	ND	ND
	10 m		11	ND	79	19	ND	ND	ND	16	ND	ND	ND	3,1	0,20	6,7	ND	ND	ND	ND	
	jesen (studen 2011.)	SJ107	0 m	12	ND	94	37	ND	ND	ND	29	ND	ND	ND	2,2	0,30	22	ND	ND	ND	ND
			10 m	15	ND	85	25	ND	ND	ND	24	ND	ND	ND	1,4	0,10	13	ND	ND	ND	ND
		SJ108	0 m	13	ND	71	26	ND	ND	ND	11	ND	ND	ND	3,2	1,3	9,7	ND	ND	ND	ND
	10 m		11	ND	78	28	ND	ND	ND	11	ND	ND	ND	2,6	0	8,0	ND	ND	ND	ND	
	zima (siječanj 2012.)	SJ107	0 m	16	ND	94	57	ND	ND	ND	28	ND	ND	ND	4,7	ND	24	ND	ND	ND	ND
			10 m	20	ND	98	32	ND	ND	ND	27	ND	ND	ND	5,7	0,38	25	ND	ND	ND	ND
		SJ108	0 m	8,1	ND	86	43	ND	ND	ND	17	ND	ND	ND	2,1	1,1	3,5	ND	ND	ND	ND
	10 m		6,6	ND	65	45	ND	ND	ND	9,3	ND	ND	ND	5,3	0,78	1,0	ND	ND	ND	ND	
	SJ107	0 m	7,2	ND	69	26	ND	ND	ND	9,5	ND	ND	ND	6,1	1,00	1,3	ND	ND	ND	ND	
		10 m	11	ND	65	29	ND	ND	ND	14	ND	ND	ND	3,5	0	3,3	ND	ND	ND	ND	



## Nastavak tablice III.

područje	sezona (mjesec)	postaja	dubina (m)	DAPI signali (x 10 <sup>5</sup> stanica ml <sup>-1</sup> )	% DAPI signala															
					<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Alphapr.</i>	<i>Roseobacter</i>	SAR11	<i>Betapr.</i>	<i>Gammapr.</i>	SAR86	SAR324	<i>Cyano.</i>	<i>Synecho.</i>	<i>Prochlo.</i>	<i>Bactero.</i>	<i>Actino.</i>	SAR202	SAR406
					ARCH915	EUBI-II	ALF968	ROS537	SAR11-MIX	BET42a	GAM42a	SAR86-1245	SAR324-1412	CYA664	SYN405	PRO405	CF319a	HGC69a	SAR202-319R	SAR406-97
estuarij rijeke Krke	zima (veljača 2013.)	AD3	10 m	9,3	ND	78	6,0	3,0	44	2,0	11	ND	ND	18	ND	ND	3,0	1,0	ND	ND
			45 m	7,5	ND	75	2,0	2,0	38	4,0	15	ND	ND	15	ND	ND	3,0	0,50	ND	ND
		E5	0 m	8,7	ND	82	6,0	12	22	7,0	5,0	ND	ND	5,0	ND	ND	17	2,0	ND	ND
			10 m	8,8	ND	89	15	6,0	38	0,50	13	ND	ND	8,0	ND	ND	14	3,0	ND	ND
		E4a	35 m	7,6	ND	81	18	4,0	36	0	15	ND	ND	3,0	ND	ND	12	0,50	ND	ND
			3 m	12	ND	91	8,0	13	12	8,0	11	ND	ND	6,0	ND	ND	19	3,0	ND	ND
		E3	5 m	12	ND	92	10	10	24	4,0	18	ND	ND	4,0	ND	ND	24	2,0	ND	ND
			35 m	11	ND	88	10	6,0	31	0,50	21	ND	ND	3,0	ND	ND	3,0	0,50	ND	ND
			0 m	11	ND	85	29	6,0	22	12	5,0	ND	ND	3,0	ND	ND	16	3,0	ND	ND
			4 m	7,9	ND	88	24	8,0	24	3,0	19	ND	ND	8,0	ND	ND	23	0,50	ND	ND
		AD3	5 m	8,4	ND	89	15	6,0	24	3,0	21	ND	ND	8,0	ND	ND	21	0,50	ND	ND
			7,5 m	9,9	ND	92	13	6,0	25	0	24	ND	ND	6,0	ND	ND	23	0,50	ND	ND
	13 m		9,0	ND	94	12	4,0	21	0	18	ND	ND	5,0	ND	ND	12	0,50	ND	ND	
	0 m		8,5	ND	76	12	2,0	45	0	14	ND	ND	10	ND	ND	8,0	0	ND	ND	
	ljeto (srpanj 2013.)	E5	10 m	9,6	ND	78	15	4,0	58	0	14	ND	ND	12	ND	ND	9,0	0,50	ND	ND
			40 m	5,7	ND	72	10	0,50	48	0	9,0	ND	ND	8,0	ND	ND	6,0	0	ND	ND
			0 m	8,8	ND	81	15	6,0	48	7,0	13	ND	ND	16	ND	ND	15	8,0	ND	ND
		E4a	10 m	8,8	ND	85	12	4,0	52	0,50	9,0	ND	ND	12	ND	ND	11	0,50	ND	ND
			30 m	8,5	ND	88	11	2,0	53	0	6,0	ND	ND	8,0	ND	ND	9,0	0,50	ND	ND
			0 m	9,2	ND	87	14	12	34	3,0	18	ND	ND	12	ND	ND	14	12	ND	ND
		E3	1,5 m	8,9	ND	78	15	8,0	38	5,0	18	ND	ND	14	ND	ND	18	14	ND	ND
			3 m	9,5	ND	88	12	6,0	48	0,50	15	ND	ND	14	ND	ND	14	8,0	ND	ND
			30 m	7,1	ND	86	9,0	3,0	56	0,50	10	ND	ND	6,0	ND	ND	11	2,0	ND	ND
			0 m	14	ND	72	18	15	15	12	10	ND	ND	10	ND	ND	12	15	ND	ND
2,5 m			12	ND	89	10	6,0	24	3,0	15	ND	ND	14	ND	ND	15	8,0	ND	ND	
3 m			15	ND	85	11	8,0	23	3,0	16	ND	ND	19	ND	ND	13	9,0	ND	ND	
E3	3,5 m	13	ND	83	12	9,0	28	0,50	14	ND	ND	18	ND	ND	14	3,0	ND	ND		
	15 m	10	ND	81	8,0	4,0	31	0,50	12	ND	ND	22	ND	ND	12	2,0	ND	ND		

## **10. ŽIVOTOPIS**

---

Marino Korlević rođen je 23. travnja 1985. u Puli. Diplomirao je biologiju (smjer molekularna biologija) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2009. s diplomskim radom pod naslovom „Evolucija satelitnih DNA u vrstama oblića roda *Meloidogyne*“. Iste godine upisuje Interdisciplinarni doktorski studij iz oceanologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2009. zaposlen je kao znanstveni novak u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Sudjelovao je na nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih projekata. Boravio je po nekoliko mjeseci na suradničkim institutima poput Instituta za evolucijske znanosti Sveučilišta u Montpellieru II, Max Planck instituta za morsku mikrobiologiju u Bremenu i Institutu za biokemiju Sveučilišta u Greifswaldu. Član je Hrvatskog mikrobiološkog društva i Udruženja za opću i primijenjenu mikrobiologiju (njem. *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie*). Koautor je šest znanstvenih radova koje citira Current Contents te više sažetaka u zbornicima skupova. Glavno područje interesa mu je identifikacija, ekologija i taksonomija morskih mikroorganizama.

#### 10.1. Popis objavljenih znanstvenih radova

1. **Korlević M, Zucko J, Najdek Dragić M, Blažina M, Pustijanac E, Zeljko TV, Gacesa R, Baranasic D, Starcevic A, Diminic J, Long PF, Cullum J, Hranueli D, Orlić S.** 2015. Bacterial diversity of polluted surface sediments in the northern Adriatic Sea. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**:189–197.
2. **Korlević M, Pop Ristova P, Garić R, Amann R, Orlić S.** 2015. Bacterial diversity in the South Adriatic Sea during a strong, deep winter convection year. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**:1715–1726.
3. **Pjevac P, Korlević M, Berg JS, Bura-Nakić E, Ciglonečki I, Amann R, Orlić S.** 2015. Community shift from phototrophic to chemotrophic sulfide oxidation following anoxic holomixis in a stratified seawater lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**:298–308.
4. **Najdek M, Paliaga P, Šilović T, Batistić M, Garić R, Supić N, Ivančić I, Ljubimir S, Korlević M, Jasprica N, Hrustić E, Dupčić-Radić I, Blažina M, Orlić S.** 2014. Picoplankton community structure before, during and after convection event in the offshore waters of the southern Adriatic Sea. *Biogeosciences* **11**:2645–2659.

5. **Hamer B, Korlević M, Durmiši E, Nerlović V, Bierne N.** 2012. Nuclear marker Me 15/16 analyses of *Mytilus galloprovincialis* populations along the eastern Adriatic coast. *Cah. Biol. Mar.* **53**:35–44.
6. **Schäfer S, Hamer B, Treursić B, Möhlenkamp C, Spira D, Korlević M, Reifferscheid G, Claus E.** 2012. Comparison of bioaccumulation and biomarker responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* after exposure to resuspended sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **62**:614–627.

## 10.2. Popis sažetaka u zbornicima skupova

1. **Korlević M, Pop Ristova P, Kottmann R, Amann R, Orlić S.** 2013. Bacterial communities in the South Adriatic dominated by SAR11, str. 43. *u* Teparić, R, Frece, J, Mrša, V (prir.), *Power of Microbes in Industry and Environment*. Croatian Microbiological Society, Zagreb.
2. **Korlević M, Pjevac P, Ionescu D, Bura-Nakić E, Najdek Dragić M, Orlić S.** 2012. Microbial communities in the Zmajevsko oko (Rogoznica lake) during stratified and mixed conditions, str. 42. *u* Černi, S, Šeruga Musić, M, Škorić, D (prir.), 5<sup>th</sup> Croatian Congress of Microbiology. Croatian Microbiological Society, Zagreb.
3. **Korlević M, Ionescu D, Paliaga P, Šilović T, Amann R, Najdek M, Orlić S.** 2012. Deep Ocean microbial communities in the South Adriatic Pit, str. 34. *u* 14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology-The Power of the Small. Copenhagen.
4. **Pjevac P, Korlević M, Bura-Nakić E, Orlić S.** 2012. Vertical distribution of microbial communities in the Zmajevsko oko (Rogoznica lake) during stratified and mixed conditions, str. 16–17. *u* 14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology-The Power of the Small. Copenhagen.
5. **Korlević M, Durmiši E, Treursić B, Baričević A, Hamer B.** 2011. *Mytilus galloprovincialis* ferritin: gene and cDNA sequence analysis, str. 85. *u* Travizi, A, Iveša, L, Fafandel, M (prir.), 46<sup>th</sup> European Marine Biology Symposium. Rovinj.