

Molekularna karakterizacija bakterijskih zajednica tala Skradinskog buka

Martinović, Adriana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:379784>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Adriana Martinović

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA
BAKTERIJSKIH ZAJEDNICA TALA SKRADINSKOG
BUKA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Sandija Orlića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja nastavnika biologije i kemije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularna karakterizacija bakterijskih zajednica tala u Skradinskom buku

Adriana Martinović
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Bakterije predstavljaju brojnu i široko rasprostranjenu skupinu mikroorganizama s važnom ulogom u evoluciji, no još su nedovoljno istražena skupina organizama. S ciljem istraživanja uloge bakterija u ekosustavu tla nužno je poznavati njihovu taksonomiju te populacijsku strukturu. Cilj ovog rada bio je molekularno karakterizirati bakterijske zajednice u uzorcima tla prikupljenim na lokalitetu Skradinski buk u Nacionalnom parku Krka metodama sekvenciranja sljedeće generacije te utvrditi eventualni utjecaj vegetacije na sastav analiziranih bakterijskih zajednica. Hipoteza istraživanja bila je da različiti uzorci tla imaju različiti sastav bakterijskih zajednica te da prisutnost vegetacije uvjetuje prisutnost određenih bakterijskih skupina u ispitivanom uzorku. Analizom dobiveni slijedovi nukleotida ukazuju na veliku raznolikost bakterijskih zajednica što je u skladu s činjenicom da se radi o području koje je pod visokim stupnjem zaštite te su ljudske djelatnosti u njemu ograničene. Pojedine porodice bakterija javljaju se u svim uzorcima u podjednakim udjelima kao što su porodice *Verrucomicrobiaceae*, kao najzastupljenija, te *Sphingomonadaceae*, *Bryobacteraceae* i *Zoogloeaceae* koje su zastupljene u manjem udjelu. Veća zastupljenost porodice *Verrucomicrobiaceae* uočena je u tlima bogatim vegetacijom što se može tumačiti kao posljedica međusobne interakcije bakterijskih vrsta ove porodice i biljne vegetacije kao eukariotskih organizama.

(59 stranica, 20 slika, 4 tablice, 51 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: ekosustav, bakterijske populacije, tlo, sedra, sekvenciranje

Voditelj: dr.sc. Sandi Orlić

Suvoditelj: dr.sc. Silvija Černi, doc.

Ocjenitelji: dr.sc. Silvija Černi, doc.

izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Rad prihvaćen: 14. prosinca 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of science
Division of Biology

Graduation Thesis

Molecular characterization of bacterial communities in different soils from Skradinski buk

Adriana Martinović

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Bacteria represent a numerous and widespread group of organisms with a important role in evolution. Despite the important role they are still insufficiently researched groups of organisms. For determining the role of bacteria in soil ecosystems, their taxonomy and biodiversity should be known. The aim of this paper is the molecular characterization of bacterial communities in soil samples collected at the Skradinski buk placed in Krka National Park using the sequencing method of the next generations and determine the possible influence of vegetation on the composition of bacterial communities in analyzed soil samples. The hypothesis is that different soil samples show a large diversity of bacterial communities and that the presence of vegetation will cause the presence of certain bacterial families in the tested soil. The results of this study are presented in nucleotide sequences which show that different soil samples are characterized by many different bacterial communities. Some families of bacteria appear in all samples in equal shares such as family *Verrucomicrobiaceae*, as most present in each sample, and *Sphingomonadaceae*, *Bryobacteraceae* and *Zoogloeaceae* in a smaller proportion. Greater representation of family *Verrucomicrobiaceae* was shown in soils rich in vegetation which can be interpreted as a result of reciprocal links that bacterial species and plant vegetation and the fact that these bacteria present in soils rich in vegetation such as grassland because of the interconnectedness with eucariotic organisms.

(59 pages, 20 figures, 4 tables, 51 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: ecosystem, bacterial population, soil, tuff, sequencing

Supervisor: dr. sc. Sandi Orlić

Co supervisor: dr. sc. Silvija Černi, Assoc. Prof

Reviewers: dr. sc. Silvija Černi, Assoc. Prof

dr. sc. Ines Radanović, Assoc. Prof

dr. sc. Vesna Petrović Peroković; Assoc. Prof

Thesis accepted: Decembar 14th 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	7
1.1 Bakterije i živi svijet	8
1.2 Filogenetska pripadnost bakterija	8
1.3 Građa bakterijske stanice.....	10
1.4 Ekološka uloga bakterija u tlu	12
1.5 Metode za proučavanje bakterija u okolišu.....	14
1.5.1. Metode sekvenciranja sljedeće generacije	17
1.6. Skradinski buk kao lokalitet istraživanja	18
 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	22
 3. MATERIJALI I METODE	24
3.1. Uzorkovanje	25
3.2. Izolacija DNA	26
3.3. PCR (lančana reakcija polimerazom)	26
3.4. Elektroforeza umnoženih fragmenata u gelu agaroze	27
3.5. Obrada podataka.....	28
 4. REZULTATI	29
4.1. Izolacija genomske DNA	30
4.2. Taksonomija bakterijskih zajednica determiniranih u uzorcima tla.....	30
4.3. Multidimenzionalno skaliranje - Analiza glavnih koordinata (MDS).....	46
 5. RASPRAVA	48

6. ZAKLJUČAK.....	52
7. LITERATURA	54
8. ŽIVOTOPIS.....	60

1. UVOD

1.1 Bakterije i živi svijet

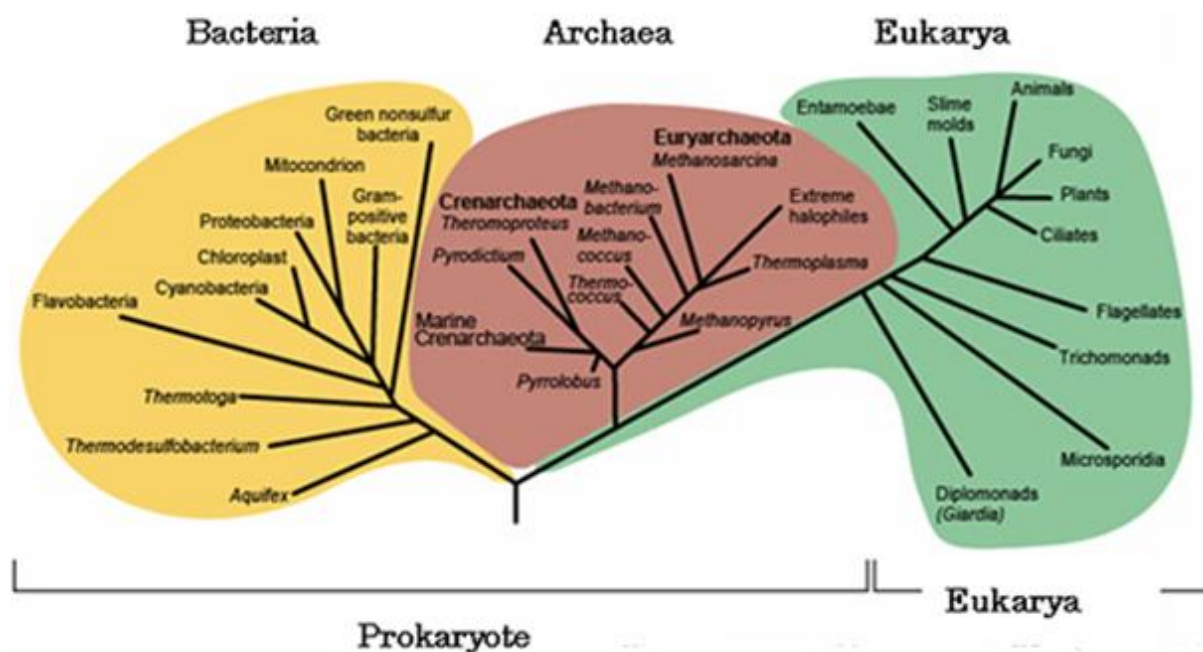
Kada je riječ o živom svijetu tla, treba istaknuti da je to još uvijek nedovoljno istraženo područje i samim time ostavlja puno prostora za otkrivanje nekih novih saznanja o organizmima čije je ono stanište, kao i o njihovoj važnosti u održavanju ekosustava. Jedna od najvažnijih sastavnica tla, uz fizikalne i kemijske, jest biološka raznolikost definirana organizmima koji nastanjuju tlo, a predstavljaju glavne čimbenike koji uvjetuju vitalno funkcioniranje tla kao ekosustava (Fierer 2017).

Ekosustav predstavlja zajednicu organizama koji su u interakciji s okolinom u kojoj žive, a odlikuje ga složena organizacija na kojoj se temelji ravnoteža međusobnih odnosa (Swannack i Grant 2008). Svi organizmi kojima tlo predstavlja stanište, međusobno su povezani kompleksnim hranidbenim lancem čiju osnovu čine mikroorganizmi. Mikrobiom tla, kojeg čine bakterije, virusi, arheje, protisti, gljive te eukariotski organizmi mikroskopske veličine (Fierer 2017), u uskoj su međusobnoj interakciji, ali i u interakciji s biljkama i životinjama tla. Biljke, mahovine i alge kao autotrofni organizmi igraju najvažniju ulogu u primarnoj produkciji stvarajući organsku tvar pomoću iskorištavanja anorganske, odnosno vode, ugljikova dioksida i sunčeve energije, dok će heterotrofi prisutni u tlu, fauna tla, većina gljiva i bakterije, koje su predmet ovog istraživanja, kao sekundarni i tercijarni konzumenti, koristiti tu organsku tvar kao izvor energije.

1.2 Filogenetska pripadnost bakterija

Istraživanje filogenetske raznolikosti, temeljeno na analizi gena za ribosomsku RNA (rRNA), kao rezultat daje podjelu živog svijeta na tri domene: Bacteria, Archea i Eucarya (Woese 1990) (Slika 1). Pod pojmom mikroorganizmi obuhvaćeni su predstavnici u sve tri spomenute domene, izuzevši viruse i subvirusne patogene koji nisu svrstani u opisane domene živog svijeta. Mikroorganizmi predstavljaju mnogobrojnu, vrlo raširenu skupinu organizama koju karakterizira njihova mikroskopska veličina. Riječ je o organizmima koji imaju iznimno važnu ulogu u svim ekosustavima, procesu bioremedijacije te ciklusima kruženja tvari u prirodi (Fierer 2017). Bakterije čine jednu (Bacteria) od tri domene na koje je podijeljen živi svijet, dok druge dvije čine arheje (Archaea) i eukarioti (Eukarya). Arheje čine drugu domenu života, a radi se o skupini prokariotskih organizama s nekim eukariotskim značajkama

(Woese 1993). Treća domena života, eukarioti, sadrži sve eukariotske organizme: životinje, biljke i jednostanične organizme koji sadrže pravu jezgru, kao što su alge, kvasci i druge gljive (Rosenberg 2017).



Slika 1. Domene živog svijeta prema Carlu Woeseu dobivene usporedbom rRNA sekvenca
Preuzeto iz : Madigan MT i Martinko JM (2005): Brock microbiology organisms

Na temelju sekvenciranja gena ribosomske RNA, domena arheja razlikuje se od domene bakterija i svrstava u zasebnu skupinu (Woese 1993). Osim filogenetske, temeljna razlika tih dviju prokariotskih domena je u građi stanične membrane (kod arheja građene od lipida načinjenih od izoprenskih lanaca esterski vezanih s jedinicama glicerola, dok su lipidi u membranama bakterija i eukariota građeni kao esteri glicerola s ravnim lancima masnih kiselina) te stanične stijenke (Eme i Doolittle 2015).

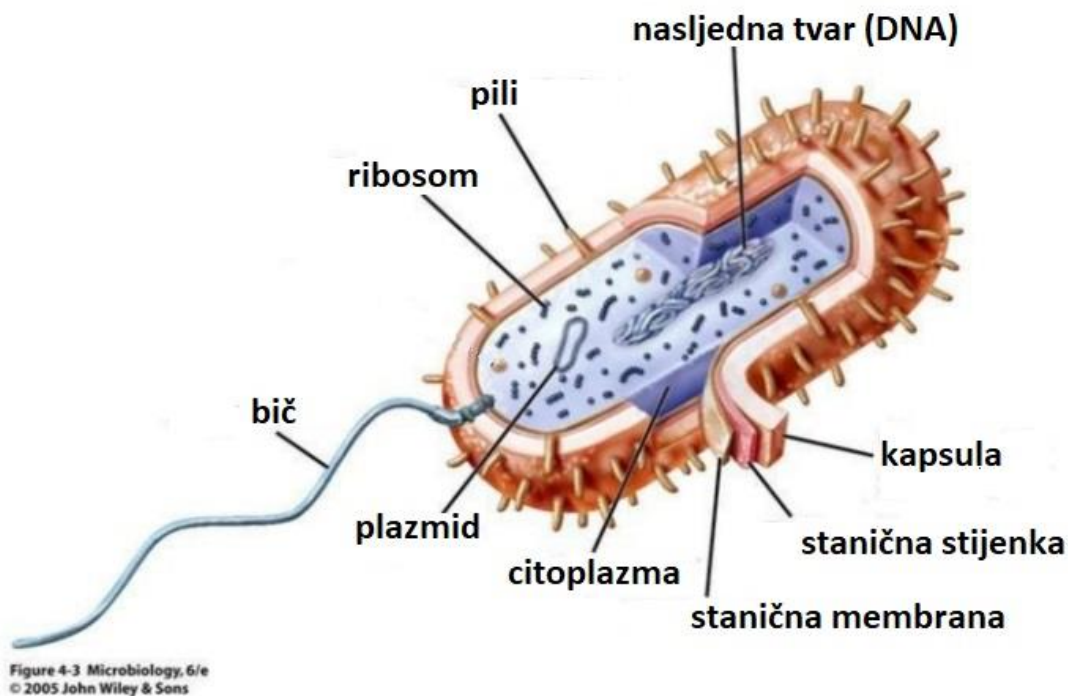
Bakterije predstavljaju brojnu skupinu organizama s vrlo važnom ulogom u biološkoj evoluciji. Zemljina atmosfera bogata kisikom, kakva je danas, bila je jedan od preduvjeta za nastanak kompleksnije eukariotske stanice. Upravo su bakterije bile te koje su omogućile razvoj stanice u tom smjeru. Naime, bakterije su gotovo dvije milijarde godina bile dominantan oblik života na Zemlji, a to je za posljedicu imalo nakupljanje sve većih količina kisika kojeg su one proizvodile. Do tada na njega neprilagođeni organizmi počeli su ugibati, a istovremeno započeo je razvoj aerobnih organizama. Kao posljedica toga, anaerobni

organizmi koji se nisu prilagodili životu u uvjetima velikih količina kisika, povukli su se na ona staništa gdje je kisik još uvijek prisutan u manjim količinama.

Osim što su važni evolucijski čimbenici, njihova važnost ističe se u tome što čine osnovu svakog hranidbenog lanca u prirodi, a većina njih neophodna su za život drugih živih organizama, kao što je već spomenuto ranije u tekstu. Sveprisutnost bakterija odnosno njihovo obitavanje u svim biotopima čini ih najrasprostranjenijim organizmima na Zemlji gdje potiču i/ili sudjeluju u važnim biološkim te kemijskim procesima što ih čini neizostavnim dijelom živog svijeta.

1.3 Građa bakterijske stanice

S obzirom da se bakterije prema sistematici živog svijeta svrstavaju u prokariote, glavna strukturna razlika između njih i eukariota jest građa njihove stanice. Naime, bakterijsku stanicu karakterizira nedostatak jezgrine ovojnice kao i organela, iako postoje iznimke. Naime, neke vrste bakterija koljena *Planctomycetes* koje se nalaze u tlu i moru imaju membrane unutar kojih je smješten njihov genetički materijal (Wiley i sur. 2011). Bakterijska stanica sadrži citoplazmu unutar koje se nalazi bakterijski genetski materijal koji se naziva nukleoid. Osim njega, pojedine bakterijske stanice mogu sadržavati i dodatne kružne molekule DNA koji se nazivaju plazmidi, a njihov doprinos bakterijskoj stanici jesu dodatna svojstva kao što su otpornost na antibiotike, prilagodbe na ekstremne uvjete života i dr. Kao tipični stanični dijelovi, prisutni su i ribosomi, citoplazmatska membrana, kao i stanična stijenka koja obavija citoplazmatsku membranu kod gotovo svih bakterija. Strukture specifične za bakterijske stanice nalaze se s njene vanjske strane, a to su bičevi i pili kao strukture koje bakterijama omogućavaju ili dodatno pomažu za pokretanje i/ili prihvatanje za određenu podlogu. Spolni pili omogućuju rekombinaciju genetskog materijala bakterija (Slika 2), (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011).



Slika 2. Građa bakterijske stanice

Slika je preuzeta iz Wiley i Sons (2005.): Essential microbiology

Osim nedostatka spomenutih organela, bakterijske stanice karakteriziraju i njihovi različiti oblici stanica. Tako prema morfologiji bakterijskih stanica razlikujemo slijedeće tipove: koki (okruglaste stanice), bacili (izdužene stanice), spirili (zavijene stanice), vibriji (stanice poput zarez), koko-bacili (izduženi koko oblik) te spirohete (specifične zavijene stanice). Veličina prosječnih bakterijskih stanica varira od veličine mikoplazmi (0,3 do 0,8 μm) do veličine cijanobakterija (promjer 10 μm) (Wiley i sur. 2013). Građa stanične stijenke odnosno peptidoglikan kao njezin sastavni dio, temelj je još jedne u nizu podjela bakterija. S obzirom na količinu peptidoglikana (mureina) u staničnoj stijenci bakterija, dijele se prema Gramu na gram-pozitivne i gram-negativne.

Ribosomi su građeni od ribosomskih ribonukleinskih kiselina (rRNA) i specifičnih ribosomskih proteina čija je uloga sinteza proteina. Svaki ribosom sastavljen je od manje i veće podjedinice koje se kod bakterija označavaju kao 30S podjedinica te 50S podjedinica. Manja podjedinica, 30S, veže mRNA i služi za čitanje genskog koda zapisanog u molekuli

glasničke RNA (mRNA), dok peptidna veza između aminokiselina nastaje u aktivnom mjestu veće podjedinice, 50S (Ramakrishnan 2002). Gen za 16S rRNA, koji kodira RNA komponentu 30S podjedinice bakterijskog kromosoma prisutan je u svim bakterijama u jednoj ili više kopija tog gena. Taj gen je karakterističan za svaku bakterijsku vrstu što ga čini temeljem za usporedbu, klasifikaciju te identifikaciju bakterija (Wang i sur. 2015).

1.4 Ekološka uloga bakterija u tlu

Kako bismo razumjeli način funkcioniranja i ekološku ulogu bakterijskih zajednica unutar nekog sustava, važno je determinirati vrste i skupine bakterija te odrediti njihovu zastupljenost u populaciji. Bakterije imaju važnu ulogu u održavanju fizikalnih, kemijskih te bioloških karakteristika tala, sudjeluju u biogeokemijskih ciklusima te ostalim procesima važnim za održivost ekosustava tla. Razumijevanje bakterijske ekologije (načina formiranja zajednica, odgovor na promjene u okolišu, fizikalno-kemijske i biološke interakcije i sl.) često je izazovno zbog izrazito visokog stupnja biološke raznolikosti te prostorne heterogenosti tala. Upravo se bakterije smatraju ključnim oružjem u borbi sa zagađenjem okoliša te se predlažu strategije bioremedijacije temeljene na sposobnosti pojedinih mikroorganizama da razgrađuju, za okoliš opasne, policikličke aromatske ugljikovodike (Doyle i sur. 2008).

Tlo je nositelj brojnih funkcija neophodnih za opstanak živog svijeta na Zemlji: osigurava hranu, biomasu i sirovine, stanište brojnim organizmima te rezerve gena, skladišti, filtrira i izmjenjuje hranjive tvari, vodu i ugljik. Ključni je čimbenik u održavanju biološke raznolikosti i ekosustava općenito. Važnu ulogu ima i u ublažavanju sve izraženijih klimatskih promjena, jer uz oceane i karbonatne stijene, upravo tlo sadrži najveće globalne zalihe ugljika (dvostruko više nego Zemljina atmosfera i trostruko više nego ukupna vegetacija na Zemlji) (Janson i Hofmockel 2018).

S obzirom na složenost tla kao medija, vrlo je podložan procesima degradacije i procesima koju u kratkom razdoblju mogu narušiti i ugroziti te onеспособiti njegove funkcije. Posljedice toga očituju se kroz dezertifikaciju, smanjenje plodnosti tla, bioraznolikosti, kakvoće zraka te klimatske promjene, a zbog izrazito sporog procesa nastajanja, ugrožavanje

tla kao staništa brojnih organizama može nanijeti teško popravljivu štetu (Stefanis i sur. 2012).

Najznačajnija skupina mikroorganizama su svakako bakterije čije vrste u tlu broje i preko 20 000 predstavnika, dok brojnost tih jedinki, čija veličina se kreće od 0,2 do 2 μm , može sezati od nekoliko desetaka milijuna do čak milijarde u jednom gramu tla.

Iako su podjele bakterija brojne, važno je istaknuti onu prema načinu ishrane. Na taj način se bakterije dijele na autotrofne i heterotrofne. Bakterije pristune u tlu dijele se na sljedeće skupine:

1. Heterotrofne bakterije koje koriste dušik vezan u organskoj tvari
2. Heterotrofne bakterije koje koriste atmosferski dušik
3. Autotrofne bakterije

Heterotrofne bakterije ne mogu samostalno proizvesti spojeve te se koriste gotovim organskim spojevima koje primaju iz okoliša. Koristeći dušik vezan u organskoj tvari te njenom razgradnjom obogaćuju tlo dušikom i na taj način omogućavaju iskorištavanje nužno potrebnog dušika od strane biljaka. Ova skupina se dijeli na one bakterije koje razgrađuju bjelancevine te se nazivaju amonifikatori, a prema potrebi za kisikom mogu biti i aerobni i anaerobni organizmi; denitrifikatori koji obavljaju proces prijelaza nitrarnog i nitrarnog dušika u slobodni ili vezani u dušikove okside; razgrađivači masti koji se još nazivaju lipolitički mikrobi; razgrađivači ugljikohidrata koji također mogu biti i aerobni, ali i anaerobni organizmi cijanobakterije (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011).

Heterotrofne bakterije koje koriste atmosferski dušik su takozvane nitrogene (dušične) bakterije ili diazotrofi odnosno nitrofikatori koje imaju sposobnost vezivanja slobodnog atmosferskog dušika. Žive slobodno u tlu ili u simbiozi s višim biljkama i na taj način opskrbljuju ih potrebnim dušikom sudjelujući u dušikovom ciklusu. Primjer tih simbiotskih bakterija su one iz rodova *Azotobacter* i *Clostridium* (Fenchel i sur. 2012).

Autotrofne bakterije u tlu dijele se na kemoautotrofne, koje koriste energiju iz oksidacije anorganskih spojeva u tlu kao što su nitrifikacijske bakterije (*Nitrosomonas* i *Nitrobacter*), sumporne bakterije te željezove, manganove i druge. Osim kemoautotrofnih, u tlu su prisutne i fotoautotrofne bakterije čiji su glavni predstavnici cijanobakterije (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011).

Uloge bakterijskih zajednica u tlu su brojne; od nakupljanja, a potom i razgradnje organske i anorganske tvari u tlu do neosinteze odnosno stvaranja humusa. Ključnu ulogu imaju u biološkom kruženju tvari u ekosustavima što predstavlja usku povezanost sa ostatkom živog svijeta. Biološke cikluse kruženja tvari kontroliraju nizom redoks procesa u kojima izravno sudjeluju i na taj način održavaju dinamiku tla. Na kraju, reguliraju ekološke odnose sudjelujući u različitim oblicima suživota s drugim organizmima (anabioza, komensalizam, mutualizam i dr.) (Fenchel i sur. 2012).

1.5 Metode za proučavanje bakterija u okolišu

Opis zajednica organizama predstavlja središnji predmet istraživanja u ekologiji i kao takav ima velik doprinos u detaljnijem uvidu u funkcionalnost određene zajednice. Pojam istraživanja strukture zajednice organizama obuhvaća opis vrste ili skupine organizama prisutnih na određenom staništu te određivanje udjela koji ta skupina ili vrsta zauzima u zajednici.

Opisivanje raznolikosti bakterija u ekosustavima pojednostavljuje se dijeleći ih u različite funkcionalne skupine kao što su primarni proizvođači, fotoheterotrofi, heterotrofi, fiksatori dušika, nitrifikatori te denitrifikatori. Taj velik broj funkcionalnih skupina odražava funkcionalnu i genetičku raznolikost ovih jednostaničnih organizama što otežava istraživanje funkcionalnih karakteristika pojedinih skupina. Kako bi se odredila ciljana svojstva pojedine funkcionalne skupine, vrste je potrebno uzgojiti u čistoj kulturi što često nije jednostavno (Pham i Kim 2012).

Osnovna metoda u proučavanju bakterijskih stanica je mikroskopija koja se koristi za proučavanje mikrobnog fenotipa. Glavni nedostatak ove često korištene metode jest njezina nepouzdanost. Mikroskopskim promatranjem bakterija nemoguće je odrediti sve bakterijske

vrste prisutne u uzorku što zbog čega se u istraživanjima poseže za pouzdanijim i efikasnijim metodama (Pham i Kim 2012).

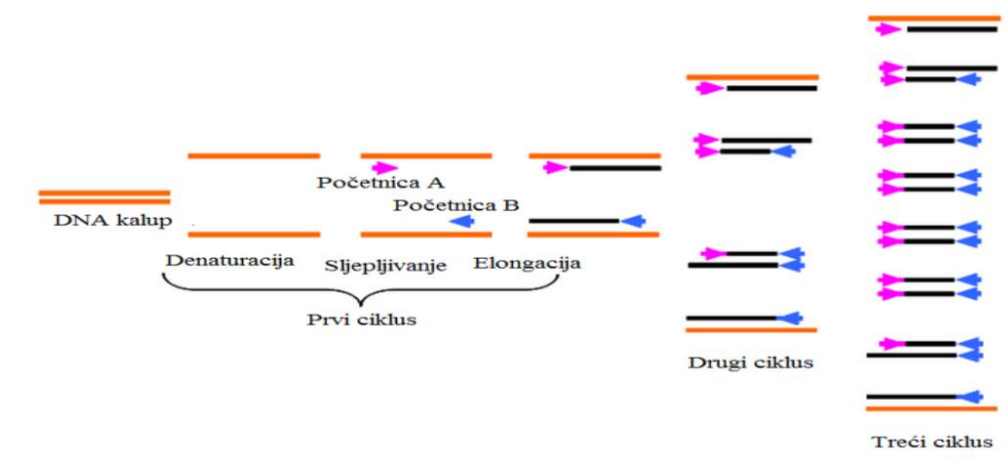
Jedna od najčešće korištenih metoda za proučavanje bakterije je uzgoj na tekućim ili čvrstim hranidbenim podlogama pri čemu se bakterije mogu selektirati s obzirom na uporabu specifičnih hranjivih podloga. Tekuće hranjive podloge pripremaju se otapanjem organskih tvari u destiliranoj vodi, dok se krute hranjive podloge dobiju na način da se u tekuću hranjivu podlogu doda agar. Ono što predstavlja nedostatak ove metode jest to što unatoč obilju bakterijskih vrsta u tlu više od 99% tih vrsta se ne može uzgajati na hranjivim podlogama, a istraživanja provedena na manje od 1% uzgojivih vrsta nisu reprezentativan uzorak filogenetske raznolikosti (Pham i Kim 2012).

Problem identifikacije prokariota uzgojem u kulturi prestaje biti otežavajuća okolnost otkrićem mogućnosti klasifikacije mikroorganizama na temelju evolucijskih odnosa koji svoju osnovu imaju u sličnosti molekula kao što je ribosomalna RNA. Nakon što je otkriveno da je moguće izolirati DNA izravno iz uzoraka prikupljenih u prirodi, klonirati željeni gen i sekvencirati isti, započinje identifikacija mnogih, do tada, nepoznatih organizama što je bio velik korak u napretku istraživanja mikroorganizama. Ono što omogućuje ovakav pristup je gen za 16S rRNA koji zbog toga što je prisutan u svim organizmima, postao ključan i najprimjenjeniji marker u identifikaciji i usporedbi organizama. Daljnjim napretkom tehnologije i razvoj metoda fluorescencijske *in situ* mikroskopije, molekula 16S rRNA odabrana je kao ciljna molekula sonde obilježene fluorescentnim bojama, iz već prethodno navedenih razloga (Korlević 2015). Sekvenciranje rRNA je omogućilo istraživanje i identifikaciju bakterijske taksonomije i filogenije, a istraživanja su pokazala kako 16S rRNA osigurava identifikaciju bakterija do razine rodova u čak 91% slučajeva, a do razine do vrste u 65% do 90% (Akram i sur. 2017).

Određivanje strukture zajednice može se provesti posrednim metodama poput denaturirajuće gradijentne elektroforeze (engl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) ili polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), sekvenciranjem ciljnog gena ili fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom (FISH, engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*). Posredne metode temelje se na amplifikaciji ciljnog gena te detekciji produkata denaturacije ili restrikcije ciljnog gena. Ovakve metode omogućuju posrednu usporedbu sastava zajednica, međutim ne dozvoljavaju identifikaciju pojedinih predstavnika zajednice. Sve metode zahtijevaju primarni korak

izolacije DNA iz okoliša ili fiksiranja i filtracije mikrobnih stanica na filtere željene veličine u slučaju FISH-a (Korlević 2015).

Metodi sekvenciranja prethodi umnažanje željenih sljedova nukleotida. Taj korak u istraživanjima odvija se metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Metoda omogućuje umnažanje ciljnog dijela DNA u velikom broju identičnih kopija. U prvom koraku se DNA denaturira s ciljem odvajanja lanaca, a zatim se na ciljna mjesta molekule DNA vežu komplementarne oligonukleotidne sekvence koje se nazivaju početnice. Enzim DNA – polimeraza na temelju lanca koji predstavlja kalup, sintetizira novi lanac na principu komplementarnosti baza unutar regije označene početnicama. Na taj način nastaju milijuni kopija ciljnih DNA fragmenata (predložaka) (Cooper 2010.).



Slika 3. Lančana reakcija polimerazom.

Preuzeto sa: www.slideshare.net

U novije doba, tijekom projekta sekvenciranja ljudskog genoma, započinje razvoj tehnologije sekvenciranja novih generacija (NGS, od eng. next generation sequencing). Tako su u posljednjih 15-tak godina razvijene metode koje omogućavaju veći broj očitavanja paralelno sekvenciranih uzoraka u kraćem vremenu uz drastično manji trošak. Brzi razvoj i relativno niska cijena, omogućili su upotrebu NGS-a u temeljnim znanstvenim područjima, te istraživanjima u kliničkoj dijagnostici, agrogetici i forenzici (Metzker 2010.)

1.5.1. Metode sekvenciranja sljedeće generacije

Metode sekvenciranja sljedeće generacije obuhvaćaju nekoliko različitih metoda koje omogućuju istodobno sekvenciranje predložaka u jednoj reakciji. (Kulski 2015). „Sekvenciranje sintezom“ (od eng. sequencing by synthesis) temelj je većine metoda sekvenciranja sljedeće generacije, utemeljene od strane Shankara Balasubramaianija i Davida Klenermana sa sveučilišta Cambridge. Takvo je sekvenciranje slično Sangerovoj metodi, no koriste se modificirani dNTP-ovi sa terminatorima čija je funkcija blokiranje daljnje polimerizacije. To omogućava da DNA polimeraza dodaje samo jednu bazu na rastući DNA lanac. Terminator sadrži fluorescentne markere koje je moguće detektirati kamerom (Ju i sur. 2008).

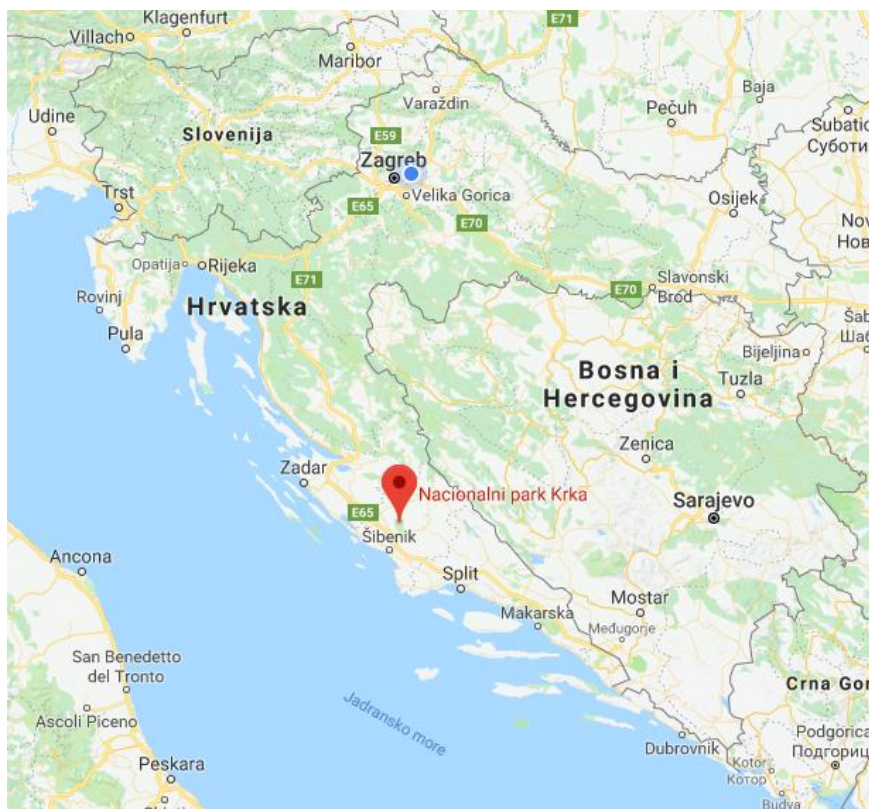
Prije primjene metoda sekvenciranja sljedeće generacije, najveću primjenu imala je već spomenuta Sangerova metoda koju se još naziva i „metodom sekvenciranja prve generacije“. Radi se o metodi koja se temelji na terminaciji sinteze lanca, a zahtijeva razdvajanje jednolančanih molekula DNA koje se razlikuju u jednom nukleotidu, pomoću gel elektroforeze. Sanger i sur. (1977) razvili su ovu metodu koristeći 2,3-dideoksinukleotid trifosfate (ddNTP) i DNA polimerazu. Specifičnost ddNTP-a je odsustvo hidroksilne skupine na 3'kraju, što onemogućuje stvaranje fosfodieterske veze. Enim DNA polimeraza ne prepozna razliku dNTP i ddNTP te se ddNTP može ugraditi u rastući lanac DNA vezanjem 5' fosfatne skupine i 3' hidroksilne skupine posljednjeg nukleotida u lancu. Njegovom ugradnjom, zbog nedostatka 3' hidroksilne skupine, prestaje sinteza lanca. Zbog velikog broja molekula DNA, odsječak novonastalog lanca može biti zaustavljen na bilo koje mjestu što bi za posljedicu ima velik broj molekula DNA različite duljine (Sanger i sur. 1977).

Metode sekvenciranja sljedeće generacije svoju široku primjenu temelje na tri glavne prednosti nad Sangerovom metodom. Pripremanje uzorka čini prvu prednost; umjesto kloniranja fragmenata DNA, knjižnice (od eng. library) se pripremaju u staničnom sustavu (Metzker 2010) Druga prednost je da se više milijuna reakcija sekvenciranja odvija istovremeno, a treću prednost predstavlja eliminacija elektroforeze u svrhu odvajanja fragmenata DNA. Osim navedenog, financijski trošak je znatno manji što metodu čini dostupnijom i primjenjivom u različitim istraživanjima (Metzker 2010; van Dijk 2014) U ovom istraživanju metoda sekvenciranja sljedeće generacije koristila se za određivanje RNA sekvenci regije gena za 16S rRNA (regije V3 – V4) pomoću kojih se mogu odrediti bakterijski taksoni prisutne u uzorku (Cooper 2010).

Uređaj za sekvenciranje nove generacije koji trenutno dominira tržištem jest Illumina, vrlo vjerojatno i zbog činjenice da je cijena sekvenciranja ovom metodom najniža. Ova se platforma također temelji na sekveniranju pomoću sinteze, gdje se zbirke sekvenci s adaptorskim dijelovima denaturiraju u jednolančane DNA molekule koje se potom, vezane na podlogu, umnože pomoću premošćavajućeg PCR-a koristeći se *Bst* polimerazom i formamidom kao denaturirajućim sredstvom (Kulski 2016).

1.6. Skradinski buk kao lokalitet istraživanja

Nacionalni park Krka jedan je od osam nacionalnih parkova u Republici Hrvatskoj koji se prostire na pretežito neizmijenjenom području iznimne prirodne vrijednosti sa znanstvenom, kulturnom, odgojno-obrazovnom i rekreativnom svrhom. Smješten je u središnjoj Dalmaciji na samo par kilometara udaljenosti od grada Šibenika. Gotovo četvrtinu površine parka zauzima vodena površina rijeke Krke koja izvire u podnožju Dinare (Slika 4). Rijeka Krka teče kroz Dalmaciju, na području Šibensko-kninske županije, između ravnokotarskog prostora, zaravni rijeke Čikole i Dalmatinske zagore, a sa zapada, sjevera i sjeveroistoka nadvisuju je planinski masivi Velebita, Dinare, Svilaje i Mosora (Bralić 2005).



Slika 4. Geografski smještaj Nacionalnog parka Krka

Slika preuzeta s <https://www.google.hr/maps>

Specifičnost tog krajolika može se zahvaliti nesprenom procesu osedavanja što čini rijeku Krku i njen okoliš pravim krškim fenomenom. Glavnu prirodnu znamenitost nacionalnog parka čini sedam većih sedrenih slapova (Bilušića buk, slap Brljan, Manojlovački slapovi, Rošnjak, slap Miljacka, Roški slap i Skradinski buk) nastalih pod utjecajem vrsta koje imaju sposobnost taloženja kristalića kalcita. Na taj način grade i oblikuju vapnenačke naslage koje nadalje tvore različite oblike sedre koje imena dobivaju prema sedrotvornim mahovinama koji su uz alge ključni sedrotvorni organizmi. Već sredinom 20. stoljeća prepoznata je potreba da se takvo specifično područje pravno zaštiti u svrhu očuvanja iznimnih prirodnih vrijednosti te je Hrvatski Sabor 24. siječnja 1985. godine donio odluku o proglašenju Nacionalnog parka Krka (Bralić 2005).

Sedra je nerijetka pojava u površinskim tokovima dinarskog krša, ali rijetka je pojava znatnih naslaga vapnenca kakvi grade slapove na rijeci Krki. Radi se o slapovima vrlo nježne građe koji su vrlo osjetljivi, kako na utjecaj prirode, tako i na ljudske djelatnosti. Ono što omogućuje očuvanje opstojnosti slapova jest stalni rast fitogene sedre. Nastanak i neprestani

rast slapova rezultat je kompleksnih fizikalnokemijskih i bioloških procesa što zahtijeva očuvanje prirodne ravnoteže ekosustava rijeke Krke (Bonacci i sur. 2017).

Zahvaljujući biogeografskom smještaju i velikom broju raznolikih staništa, Nacionalni park Krka odlikuje vrlo bogat i raznolik biljni i životinjski svijet s brojnim endemičnim rijetkim i ugroženim svojstama što područje oko rijeke Krke svrstava među najvrijednije prirodne cjeline, ne samo u Hrvatskoj nego i u Europi.

Skradinski buk posljednja je i najduža od sedam sedrenih barijera na rijeci Krki. Glasi za jedan od najneobičnijih te najljepših krajobraza Nacionalnog parka Krka, a nalazi se oko 13 kilometara nizvodno od Roškog slapa. Rast sedrene barijere Skradinskog buka uvjetovao je ujezerenje vode rijeke do Roškog slapa i dio donjeg toka rijeke Čikole. Sedreni oblici koji se ondje mogu pronaći su pragovi, sedreni otočići, zastori i barijerice, kao i polušpilje, špilje i brade. Krajolik krasi bujno mediteransko i submediteransko raslinje velikog broja biljnih vrsta. Zahvaljujući neprestanom procesu nastajanja sedre, rijeka Krka predstavlja krški fenomen, čiji kanjon današnji izgled može zahvaliti tektonskim pokretima i površinskim procesima okršavanja u karbonatnim naslagama (Bonacci i sur. 2017; Bralić 2005).

Tlo Nacionalnog parka Krka jedno je od manje istraženih područja što ga čini privlačnim za istraživanja biološke raznolikosti mikroorganizama. To je područje bogato različitim vrstama i oblicima tala iz čega proizlazi pretpostavka o velikoj biološkoj raznolikosti prisutnih mikroorganizama. Istraživanje provedeno na području Nacionalnog parka Krka izazovno je zbog visokog stupnja zaštite prirode i samim time ljudske djelatnosti na tom području su ograničene. Razlog tome je da su sedreni slapovi rijeke Krke vrlo osjetljivi na promjene u okolišu, a koje mogu biti posljedica i ljudske djelatnosti. Samo stalnim rastom fitogene sedre moguće je osigurati i očuvati opstojnost slapova. Nastajanje i rast sedrenih slapova te vegetacije rezultat su složenih fizikalno-kemijskih i bioloških procesa u kojima sudjeluju i bakterijske zajednice (Bonacci i sur. 2017). Stoga će se istraživanje temeljiti na karakterizaciji i usporedbi bakterijskih zajednica uzetih na više različitih testnih ploha s obzirom na prisutnost vegetacije. Na taj način bit će ispitana međusobna povezanost i utjecaj vegetacije i bakterijskih zajednica tla.

Istraživanja biološke raznolikosti odnosno strukture životnih zajednica bitna su kao središnji predmet istraživanja u ekologiji, a glavni razlog tome je to što doprinose detaljnijem uvidu u funkcionalnost zajednica organizama. Većinom se provode u svrhu informiranja o

prisutnosti i brojnosti pojedinih vrsta unutar neke zajednice kako bi se eventualna ugroženost pojedine svojte nastojala spriječiti. Istraživanja bioraznolikosti mikroorganizama nisu toliko zastupljena zbog čega postoji začuđujuće mali broj informacija o raznolikosti njihovih zajednica. Razlog tomu vrlo vjerojatno je i nedovoljna svijest o važnosti pojedinih mikroorganizama za očuvanje ravnoteže ekosustava. (Fierer 2017; Korlević 2015).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bila je molekularna karakterizacija zajednica u odabranim uzorcima tla Skradinskog buka pomoću metoda sekvenciranja sljedeće generacije. Karakterizacija podrazumijeva analizu nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA, identifikaciju bakterija do razine razreda i porodice te utvrđivanje njihove populacijske strukture.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. Analizom dobivenih slijedova nukleotida odrediti taksonomsku strukturu i populacijsku raznolikost bakterijskih zajednica tala u ispitivanim uzorcima
2. Utvrditi eventualnu povezanost bakterijskih zajednica u analiziranim uzorcima tala i prisutne vegetacije .

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorkovanje

U istraživanju je korišteno 10 uzoraka površinskog dijela tla dobivenih u prikupljanju provedenome 27. rujna 2017. godine na deset različitih točaka testne plohe na području Skradinskog buka unutar Nacionalnog parka Krka. Uzorkovanje je obavljeno od strane djelatnika Instituta Ruđer Bošković, a uzorci su pohranjeni u zamrzivaču pri -80°C . Uzorci su označeni kraticama brojevima od SB1 do SB10, a geografski položaj i vrsta uzorka prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Uzorci tla prikupljeni na području Skradniskog buka.

Oznaka uzorka	Geografski položaj	Vrsta uzorka
SB1	(43°48'20.82"S, 15°57'58.52"I)	uzorak prikupljen na samom ulazu na testu plohu
SB2	(43°48'21.05"S, 15°57'57.46"I)	uzorak sedre prikupljen iznad jezera koje tijekom ljeta presušuje
SB3	(43°48'21.48"S, 15°57'55.86"I)	uzorak je prikupljen iznad jezera na mjestu gdje su sedra i tlo izmiješani
SB4	(43°48'22.41"S, 15°57'56.19"I)	uzorak sedre sa područja uz novonastali potok
SB5	(43°48'23.17"S, 15°57'56.65"I)	uzorak sedre pomiješan sa tlom prikupljen na području koje se koristi u svrhu poljoprivrede
SB6	(43°48'24.04"S, 15°57'55.21"I)	uzorak sedimenta iz jezera
SB7	(43°48'23.02"S, 15°57'54.21"I)	uzorak stare sedre
SB8	(43°48'22.77"S, 15°57'54.09"I)	uzorak novonastale sedre sa starog slapa
SB9	(43°48'20.47"S, 15°57'55.78"I)	uzorak erodirane sedre
SB10	(43°48'24.25"S, 15°57'52.45"I)	uzorak sedre iz vode kod velikog slapa nizvodno od testne plohe

3.2. Izolacija DNA

Uzorci su dopremljeni na Institut Ruđer Bošković u Zagrebu gdje je provedena ekstrakcija ukupne DNA. S ciljem istraživanja bakterijskih populacija, izolacija ukupne DNA iz svakog uzorka provedena je koristeći komercijalni komplet reagensa „*DNeasy PowerSoil kit*“ (Qiagen) prema uputama proizvođača.

Od svakog uzorka sedimenta odvagala sam 250 mg i stavila u „Powerbead“ epruvetu te lagano miješala na vrtložnoj miješalici 1 minutu. Potom sam svakom uzorku sedimenta dodala po 60 µl pufera te je sadržaj promiješala na vrtložnoj miješalici 10 minuta u horizontalnom položaju. Zatim sam uzorci centrifugirala na 10, 000 x g 30 sekundi. Dobiveni supernatant izdvojila sam u čiste epruvete od 2 ml, a potom dodala po 250 µl pufera i miješala na vrtložnoj miješalici 5 sekundi. Nakon toga, uzorke sam inkubirala 5 minuta na 4°C. Nakon inkubacije, centrifugirala sam ih 1 minutu na 10, 000 x g. Zatim sam izdvojila 600 µl supernatanta u čiste epruvete od 2 ml, dodala 200 µl pufera te promiješala na vrtložnoj miješalici 5 sekundi. Uzorke sam nakon toga ponovno inkubirala 5 minuta na 4°C i centrifugirala 1 minutu na 10, 000 x g. Izdvojila sam 750 µl supernatanta u čiste epruvete od 2 ml i dodala 1200 µl pufera. Sadržaj sam miješala na vrtložnoj miješalici 5 sekundi, a potom izdvojila 650 µl uzorka u MB Spin Column te centrifugirala 1 minutu na 10, 000 x g. Taj korak sam ponovila tri puta kako bi sav volumen uzorka bio obrađen. Zatim sam dodala 500 µl pufera, sadržaj centrifugirala na 10, 000 x g 30 sekundi. Dobiveni sadržaj prebacila sam u čiste epruvete od 2 ml i dodala 100 µl pufera u središte bijele filter membrane u epruveti. Uzorke sam ponovno centrifugirala na sobnoj temperaturi 30 sekundi na 10, 000 x g te ih izdvojila u MB spin column.

Izoliranu DNA isprala sam etanolom te centrifugirana na 10, 000 x g 30 sekundi. Etanol je uklonjen isparavanjem, a izolirana DNA pohranjena je na temperaturi od -20°C. Koncentracija izolirane DNA određena je na Nanodropu (Thermoscientific, SAD).

3.3. PCR (lančana reakcija polimerazom)

Nakon što je izolirana ukupna DNA iz svakog uzorka, dobiveni produkti podvrgnuti su lančanoj reakciji polimerazom čiji je postupak opisan u daljnjem tekstu. S ciljem

umnažanja fragmenta gena za 16S rRNA (regija V3-V4, oko 250 pb) koristila sam specifične početnice (V3Bac_Il_PE_Adaptor_341FW: 5'-tcg tcg gca gcg tca gat gtg tat aag aga cag cct acg ggn ggc agc ag-3' ; V4Bac_Il_PE_Adaptor_805RV: 5'-gtc tcg tgg gct cgg aga tgt gta taa gag aca gga cta chv ggg tat cta atc c-3') odabrane prema komplementarnosti ciljanim regijama bakterijskih gena.

Lančanu reakciju polimerazom provela sam prema sljedećim koracima čiji su temperaturni uvjeti, trajanje i broj ciklusa navedeni u Tablici 2.

1. Inicijalno denaturiranje u kojem dolazi do razdvajanja lanaca DNA koji će služiti kao kalup u sintezi novih lanaca.
2. Hibridizacija početnica s komplementarnim dijelovima DNA molekule.
3. Sintaza komplementarnog lanca.
4. Finalna ekstenzija.

Tablica 2. Uvjeti provođenja PCR reakcije za umnožavanje V3 i V4 regije u izolatu genomske DNA.

Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ponavljanja
98	30 s	1
62	30 s	29
72	30 s	1
72	5 min	1

3.4. Elektroforeza umnoženih fragmenata u gelu agaroze

Kontrola produkata provedena je u 1% - tnom gelu agaroze. Gel je pripremljen na način da je 1 g agaroze otopljen u 100 mL TAEx1 puferu. Za bojanje gela korišten je SYBR Safe koji se dodaje u gel u tekućem stanju (10 µl na 100 mL gela). SYBR Safe veže se za fragmente dobivene lančanom reakcijom polimeraze te stoga omogućuje vizualizaciju dobivenih produkata tijekom slikanja gela. Elektroforeza je provedena u trajanju 1h.

Tablica 3. Protokol za pripremu 50 x TAE pufera za elektroforezu.

50 x TAE elektroforetski pufer	
Tris free base	242 g
Disodium EDTA	18,61 g
Glacial acetic acid	57,1 mL
DDI H ₂ O	Do 1 litre

Ovako pripremljen pufer razrjeđuje se na 1 x TAE.

Umnoženi produkti dobiveni metodom lančane reakcije polimerazom poslani su na analizu u komercijalni servis (Eurofins, Njemačka), gdje je slijed nukleotida utvrđen metodom sekvenciranja sljedeće generacije (*Next generation sequencing*, NGS) koristeći platformu *Illumina*. Analiza se temelji na principu sekvenciranja sintezom.

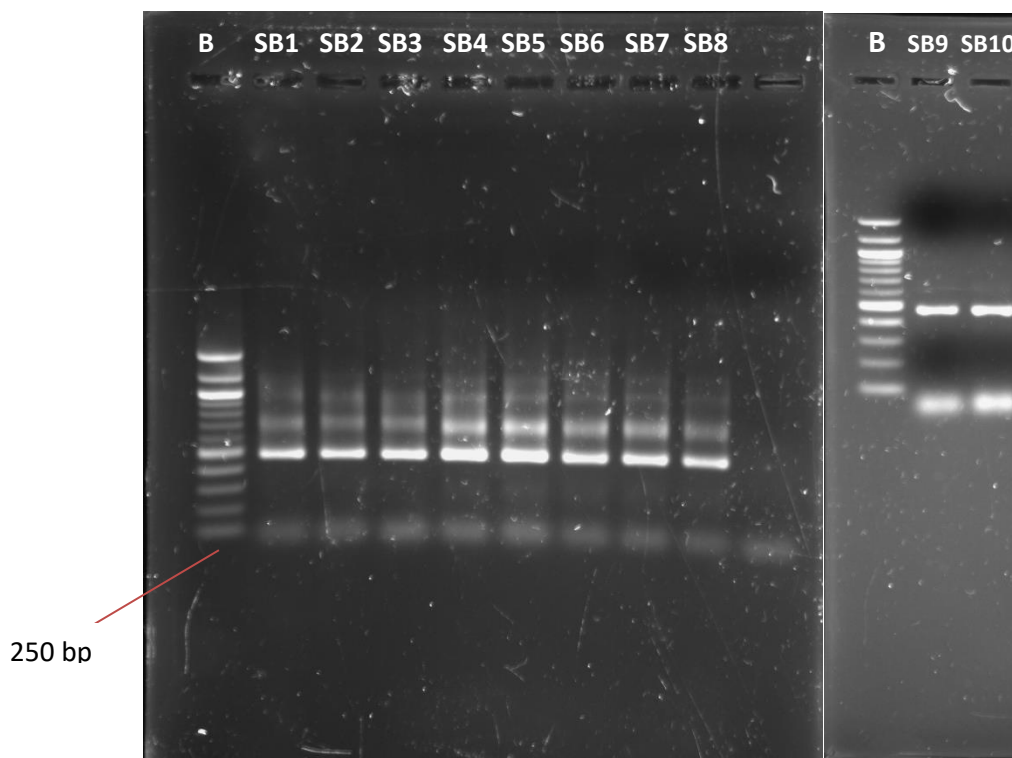
3.5. Obrada podataka

Obrada podataka dobivenih sekvenciranjem provedena je na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu korištenjem više računalnih programa. Srađivanje sekvenci napravljeno je korištenjem programa QIIME (Caporaso i sur 2010.), a klaster analiza korištenjem računalnog programa SWARM (Mahe i sur. 2015.). Identifikacija sekvenci napravljena je prema referentnoj bazi NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Dobivene tablice sekvenci i taksonomskih kategorija statistički su obrađene. Na kraju je provedena i MDS (eng. Multidimensional Scaling) analiza u programu Excel koristeći XLSTAT software.

4. REZULTATI

4.1. Izolacija genomske DNA

Elektroforetska analiza produkata PCR-reakcije potvrdila je prisutnost fragmenata odgovarajuće veličine (250 bp) kod svih analiziranih uzoraka. Gel nakon provedene elektroforeze izolata genomske DNA je prikazan na Slici 5.



Slika 5. Rezultati elektroforeze na 1% - tnom agaroznom gelu. U liniji označenoj s B nalazi se DNA marker, a u linijama označenim SB1 – SB10 su PCR-produkti.

4.2. Taksonomija bakterijskih zajednica determiniranih u uzorcima tla

Illumina sekvenciranjem 10 uzorka dobiveno je ukupno 1 627 568 sekvenci. Nakon obrade podataka određeno je da 544 520 sekvenci pripada domeni bakterija. Za daljnju obradu izdvojene su sekvence koje su imale $\leq 97\%$ sličnosti sa sekvencom navedenoj u bazi podataka. Ukupno je utvrđeno 7986 različitih bakterijskih svojti s ukupno 285 257 sekvenci, od kojih je najveći broj pripadao uzorku SB9 (38 559 sekvenci), a najmanji u uzorku SB2 (19 164 sekvenci).

Na temelju dobivenih sekvenci za regiju gena 16S rRNA određena je taksonomska struktura prisutnih bakterija u pojedinim uzorcima. Uzorci su determinirani na razini koljena, razreda, red i porodice. U nastavku su prikazani rezultati taksonomske analize pojedinih skupina bakterija određenim na temelju sekvenci za 16S rRNA.

Tablica 4. Taksonomija determiniranih bakterija do razine porodice u **uzorcima SB1 – SB10.**

UZORAK	KOLJENO	RAZRED	RED	PORODICA
SB1	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Zoogloeaceae</i>
	<i>Acidobacteria</i>	<i>Solibacteres</i>	<i>Solibacterales</i>	<i>Bryobacteraceae</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>
SB2	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Azonexaceae</i>
	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>
SB3	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
	<i>Acidobacteria</i>	<i>Solibacteres</i>	<i>Solibacterales</i>	<i>Bryobacteraceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chitinophagia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>
SB4	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Saprospira</i>	<i>Saprospirales</i>	<i>Saprospiraceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
SB5	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
	<i>Acidobacteria</i>	<i>Solibacteres</i>	<i>Solibacterales</i>	<i>Bryobacteraceae</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chitinophagia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>

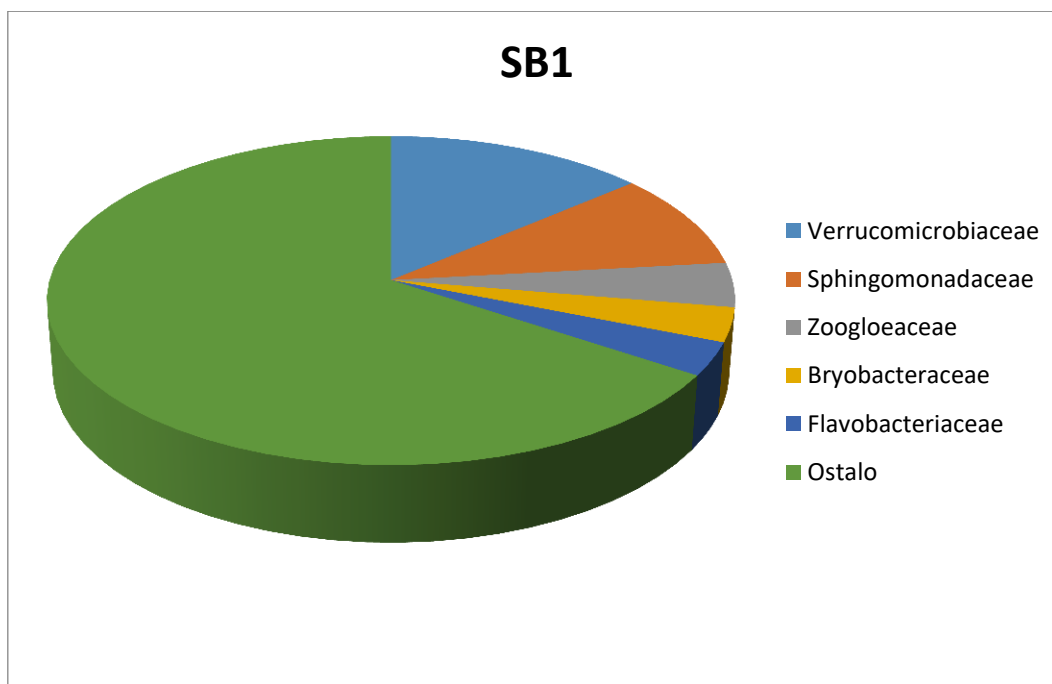
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Xanthobacteraceae</i>
SB6	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
	<i>Acidobacteria</i>	<i>Solibacteres</i>	<i>Solibacterales</i>	<i>Bryobacteraceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Zoogloeaceae</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>
SB7	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Zoogloeaceae</i>
	<i>Acidobacteria</i>	<i>Solibacteres</i>	<i>Solibacterales</i>	<i>Bryobacteraceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanophyceae</i>	<i>Synechococcales</i>	<i>Leptolyngbyaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Nevskiales</i>	<i>Sinobacteraceae</i>
SB8	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>
SB9	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>
SB10	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>
	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>
	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oscillatoriothycideae</i>	<i>Oscillatoriales</i>	<i>Oscillatoriaceae</i>

	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>

4.2. Postotak sekvenci gena za 16S rRNA pojedinih porodica bakterija u uzorcima (SB1 - SB10)

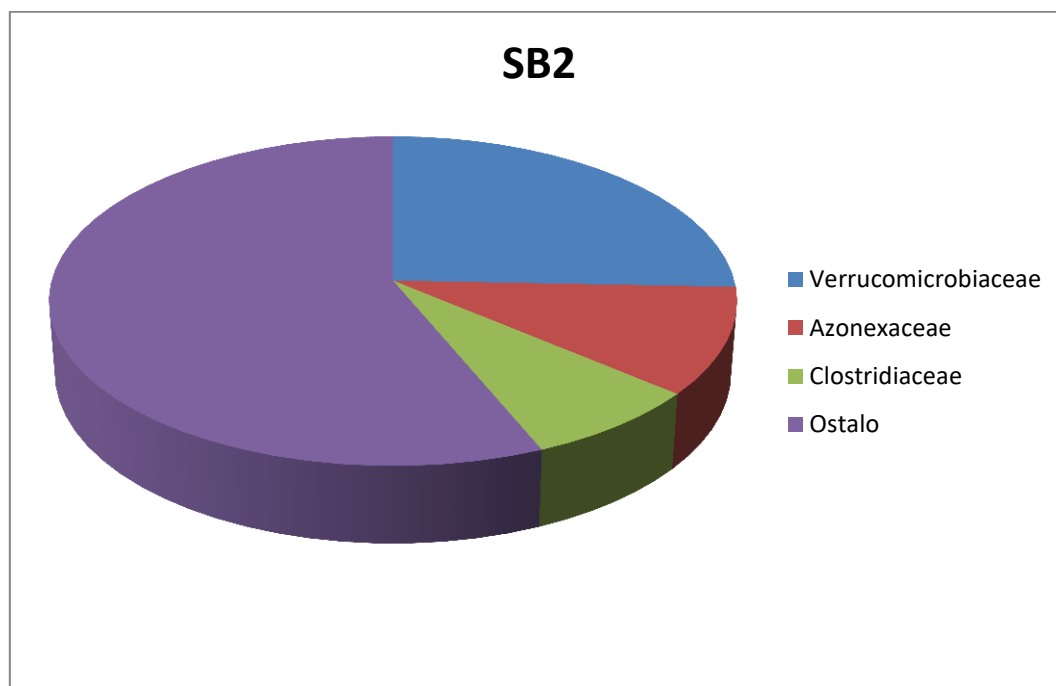
Za svaki pojedini uzorak izračunat je postotak dobivenih sekvenci gena za 16S rRNA te su rezultati postotka sekvenci za porodice bakterija determiniranih u uzorcima grafički prikazani (Slike 5 – 14). Ukoliko vrijednost postotka sekvenci za pojedinu porodicu nije prelazila 3%, rezultat za tu porodicu nije prikazan.

U prvom uzorku (SB1) raspodjela porodica bakterija dobivena je iz postotaka nukleotidnih sljedova izračunatih na temelju rezultata sekvenciranja. Najzastupljenija porodica u ovom uzorku tla je *Verrucomicrobiaceae* čiji je udio 13,80%, a u manjem postotku se još javljaju *Sphingomonadaceae* (9,47%), *Zoogloeaceae* (4,37%), *Bryobacteraceae* (3,35%) te *Flavobacteriaceae* (3,26%). Pod ostalo svrstavaju se bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 6)



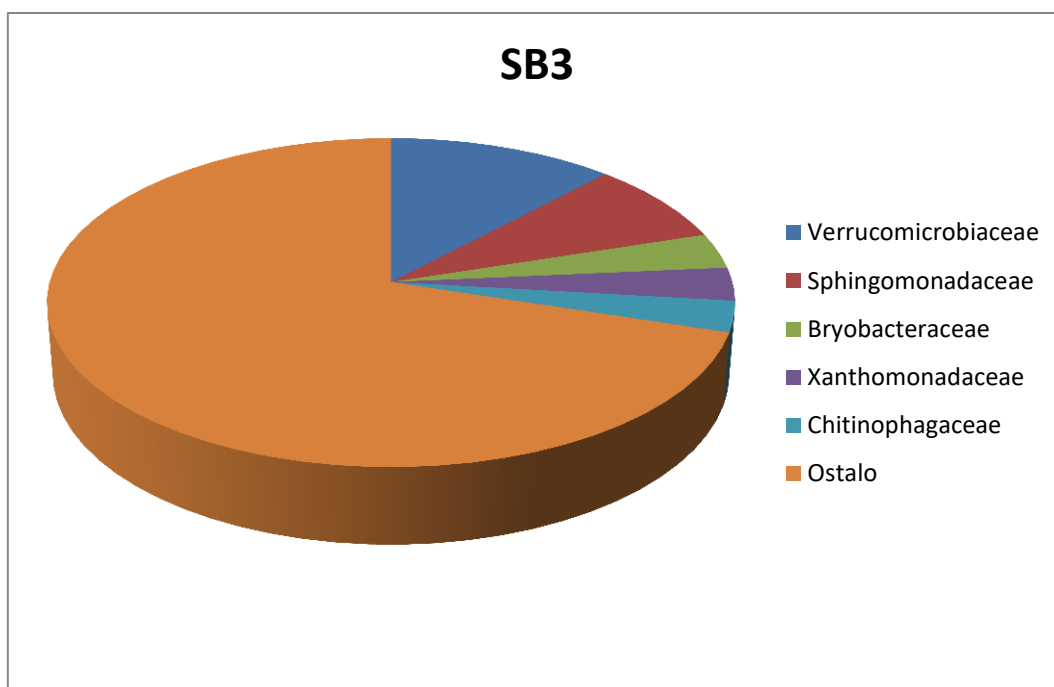
Slika 6. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB1**.

Verrucomicrobiaceae i u drugom uzorku tla (SB2) najzastupljenija je porodica je čiji je udio 25,62%, a u manjem postotku se još javljaju *Azonexaceae* (10,49%) te *Clostridiaceae* (7,58%). Pod ostalo svrstavaju se bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 7).



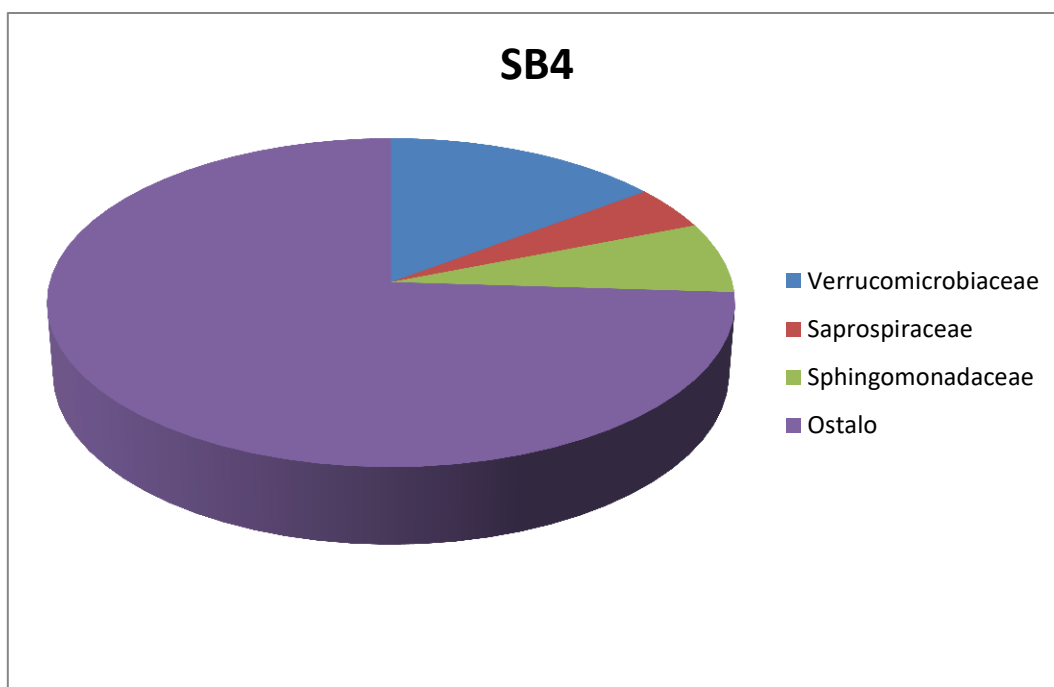
Slika 7. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB2**.

U trećem uzorku (SB3) kao najzastupljenija porodica javlja se *Verrucomicrobiaceae* čiji je udio 12,01%, a u manjem postotku javljaju se još *Sphingomonadaceae* (8,08%), *Bryobacteraceae* (3,47%), *Xanthomonadaceae* (3,25%) te *Chitinophagaceae* (3,04%). Pod ostalo svrstavaju se bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 8).



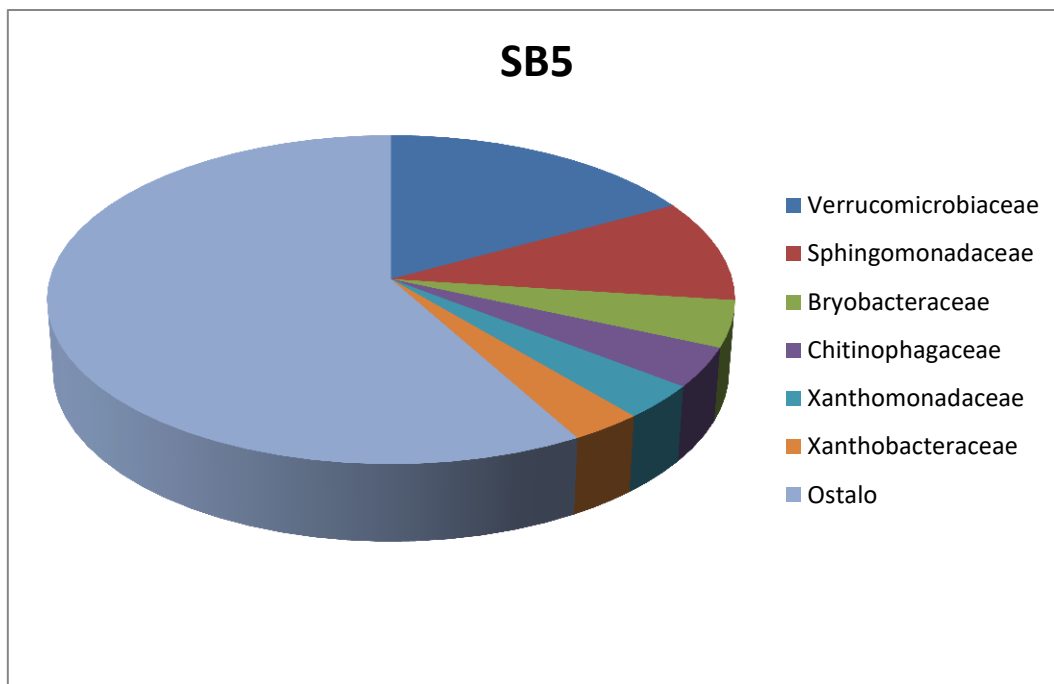
Slika 8. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB3**.

U četvrtom uzorku (SB4) se u najvećem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuje bakterijska porodica *Verrucomicrobiaceae* (14,74%). Sljedeća prema postotku nukleotidnih sljedova je porodica *Sphingomonadaceae* (6,95%), a slijedi ju porodica *Saprospiraceae* (4,29%). Pod ostalo se svrstavaju se bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 9).



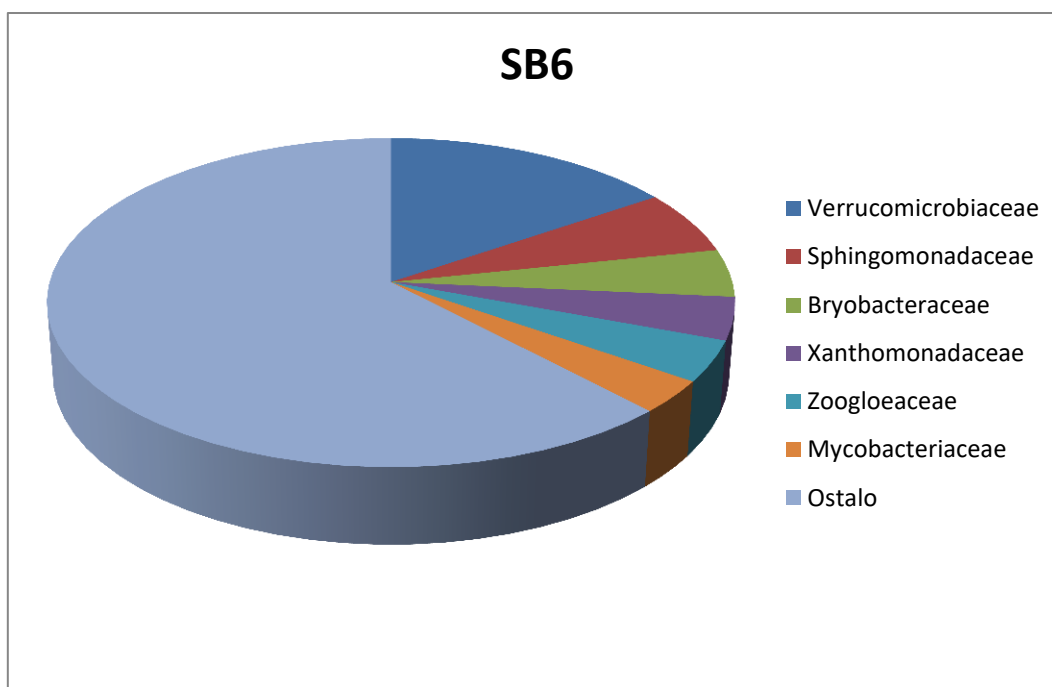
Slika 9. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB4**.

Porodica *Verrucomicrobiaceae* i u petom uzorku tla (SB5) čini najzastupljeniju porodicu bakterija s udjelom sekvenci od 16,99%. Prema postotku nukleotidnih sljedova, iza nje se nalaze *Sphingomonadaceae* (10,05%), *Bryobacteraceae* (4,56%), *Chitinophagaceae* (3,89%), *Xanthomonadaceae* (3,38%) i *Xanthobacteraceae* (3,04%). Postotak ostalog obuhvaća sve one bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 10).



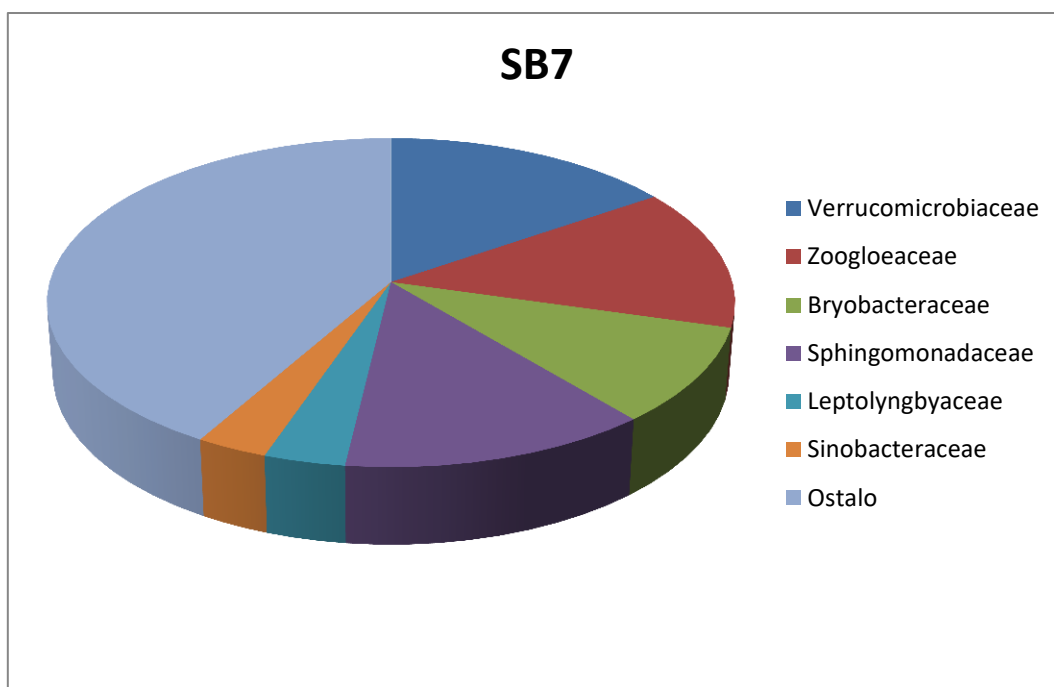
Slika 10. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB5**.

U šestom uzorku tla (SB6), *Verrucomicrobiaceae* ponovno čine najzastupljeniju porodicu bakterija s udjelom sekvenci od 15,51%. Prema postotku nukleotidnih sljedova, iza nje se nalaze *Sphingomonadaceae* (6,23%), *Bryobacteraceae* (4,70%), *Xanthomonadaceae* (4,19%), *Zoogloeaceae* (4,04%) te *Mycobacteriaceae* (3,23%). Postotak ostalog obuhvaća sve one bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 11).



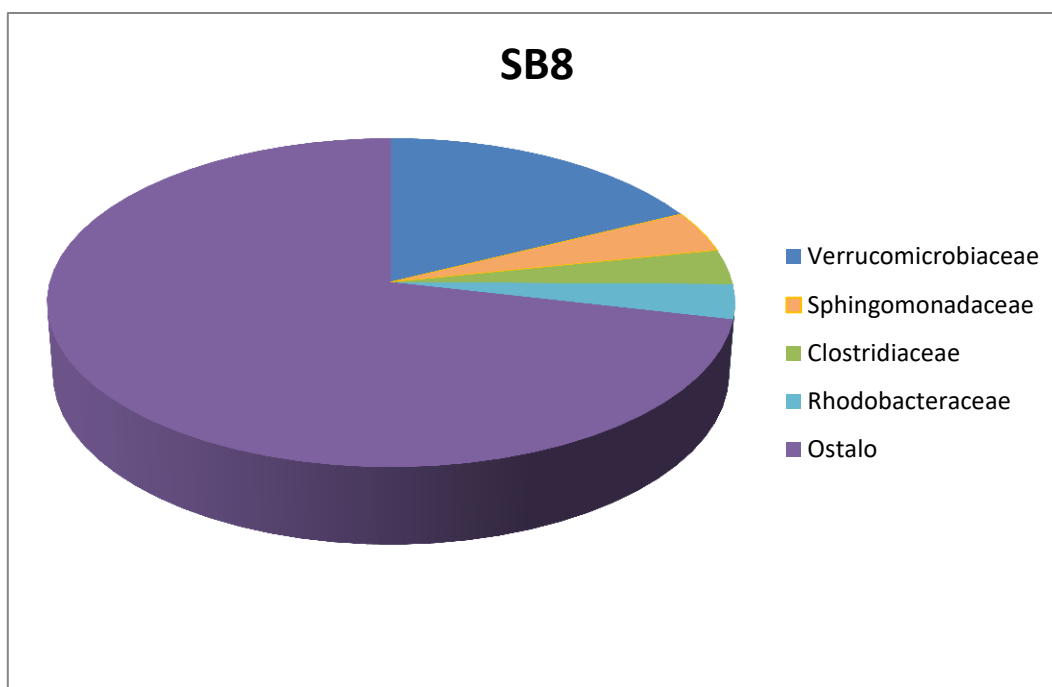
Slika 11. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB6**.

Porodica *Verrucomicrobiaceae* i u sedmom uzorku (SB7) čini najzastupljeniju porodicu bakterija s udjelom sekvenci od 15,46%. Prema postotku nukleotidnih sljedova, iza nje se nalaze *Zoogloeaceae* (13,94%), *Bryobacteraceae* (9,49%), *Sphingomonadaceae* (12,99%), *Leptolyngbyaceae* (3,41%) te porodica *Sinobacteraceae* (3,01%). Postotak ostalog obuhvaća sve one bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 12).



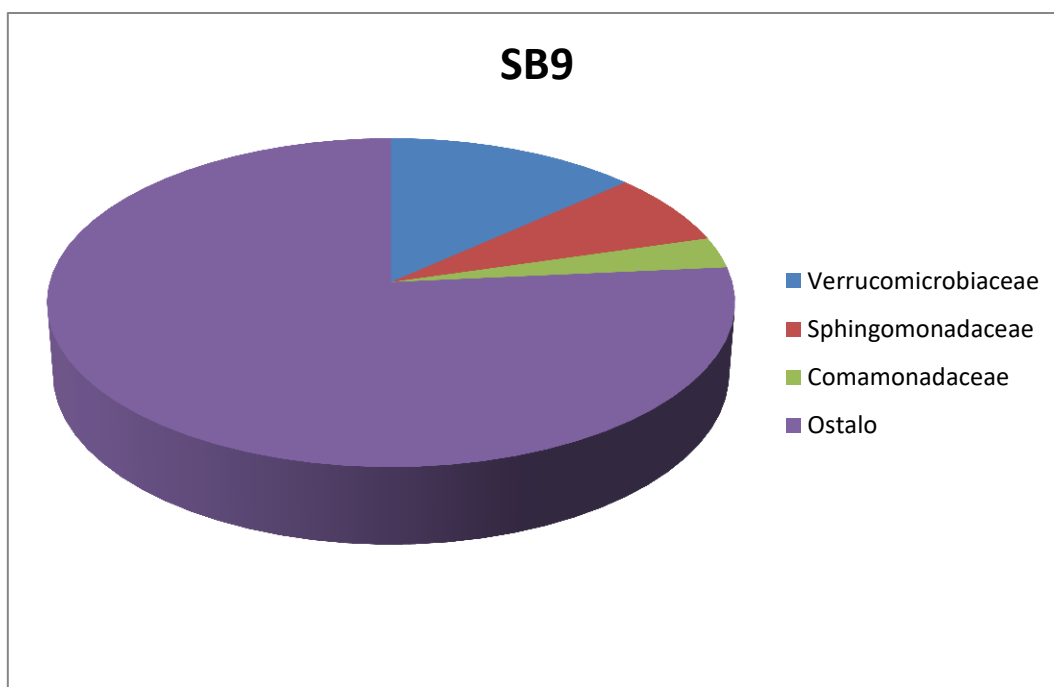
Slika 12. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB7**.

U osmom uzorku tla (SB8) najzastupljenija bakterijska porodica je *Verrucomicrobiaceae* s udjelom sekvenci od 17,71%. Prema postotku nukleotidnih sljedova, u manjem udjelu javljaju se *Sphingomonadaceae* (4,07%), *Clostridiaceae* (3,42%) te *Rhodobacteraceae* (3,40%) . Postotak ostalog obuhvaća sve one bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 13).



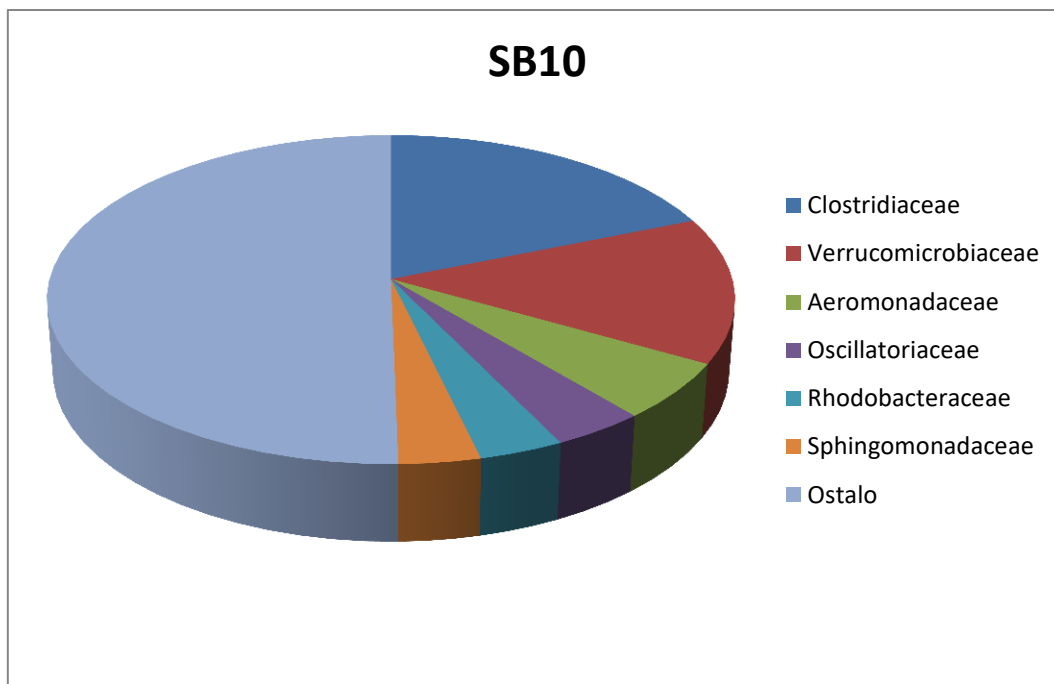
Slika 13.. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB8**.

Najzastupljeniju porodicu bakteriju u devetom uzorku (SB9) čini ponovno porodica *Verrucomicrobiaceae* s udjelom sekvenci od 13,36%. Prema postotku nukleotidnih sljedova, u manjem udjelu javljaju se još i *Sphingomonadaceae* (7,13%) i *Comamonadaceae* (3,04%). Postotak ostalog obuhvaća sve one bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 14).



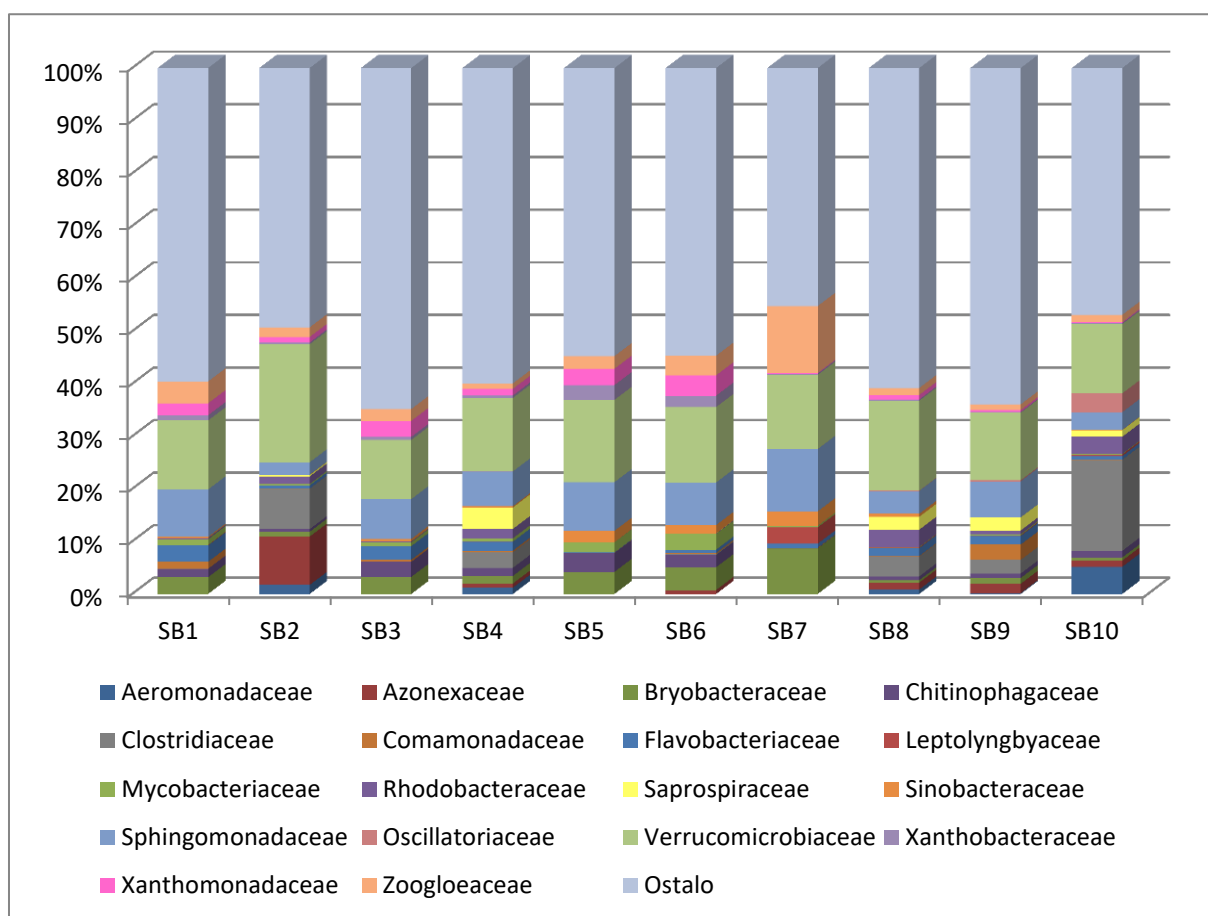
Slika 14. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB9**.

U desetom uzorku tla (SB10) najzastupljeniju porodicu bakterija čini porodica *Clostridiaceae* s udjelom sekvenci 18,84%. Prema postotku zastupljenosti sekvenci, odmah iza nje nalazi se porodica *Verrucomicrobiaceae* (14,36%), a slijede ih *Aeromonadaceae* (5,64%), *Oscillatoriaceae* (3,89%), *Rhodobacteriaceae* (3,55%) te porodica *Sphingomonadaceae* (3,42%). Postotak ostalog obuhvaća sve one bakterijske porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 15).



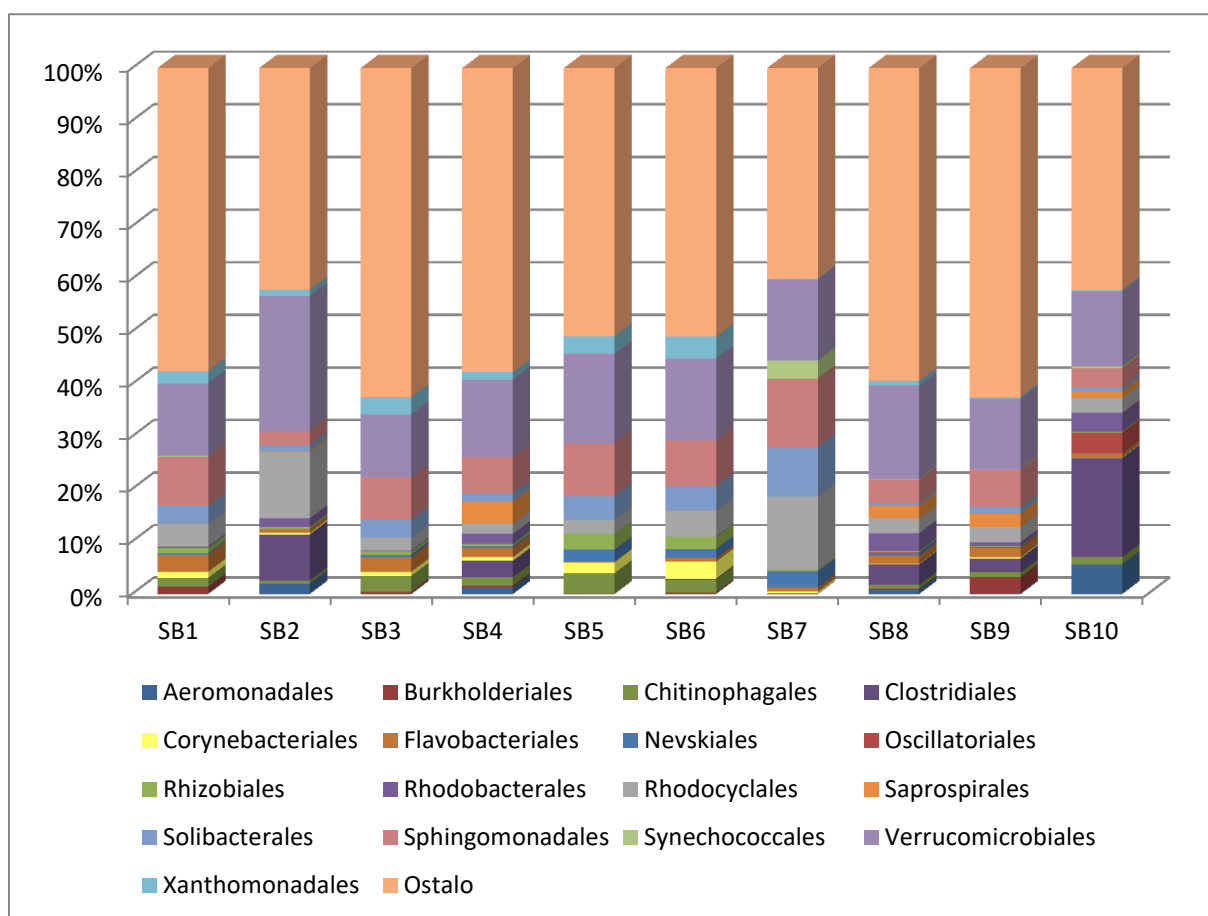
Slika 15. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih porodica bakterija u **uzorku SB10**.

Na Slici 16 nalazi se zbirni grafički prikaz zastupljenosti bakterijskih porodica u analiziranim uzorcima (SB1 – SB10). Na ovaj način prikazana su preklapanja bakterijskih rodova u uzorcima kao i postotak sekvenci pojedinih bakterijskih rodova u pojedinom uzorku.



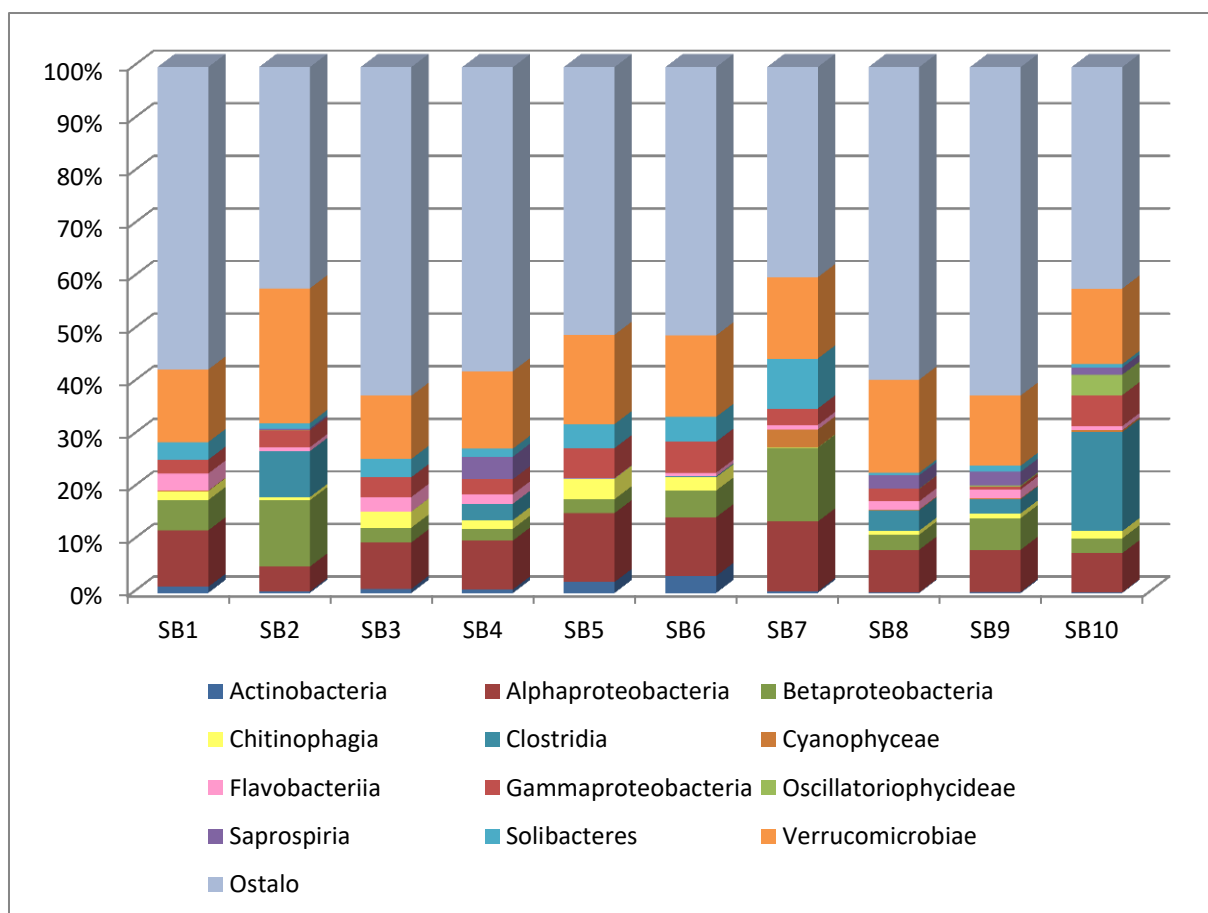
Slika 16. Postotak sekvenci bakterijskih porodica determiniranih u analiziranim uzorcima (SB1 – SB10).

Za sve analizirane uzorke, izračunati su i postoci nukleotidnih sljedova pojedinih bakterijskih redova te su rezultati prikazani na Slici 17.



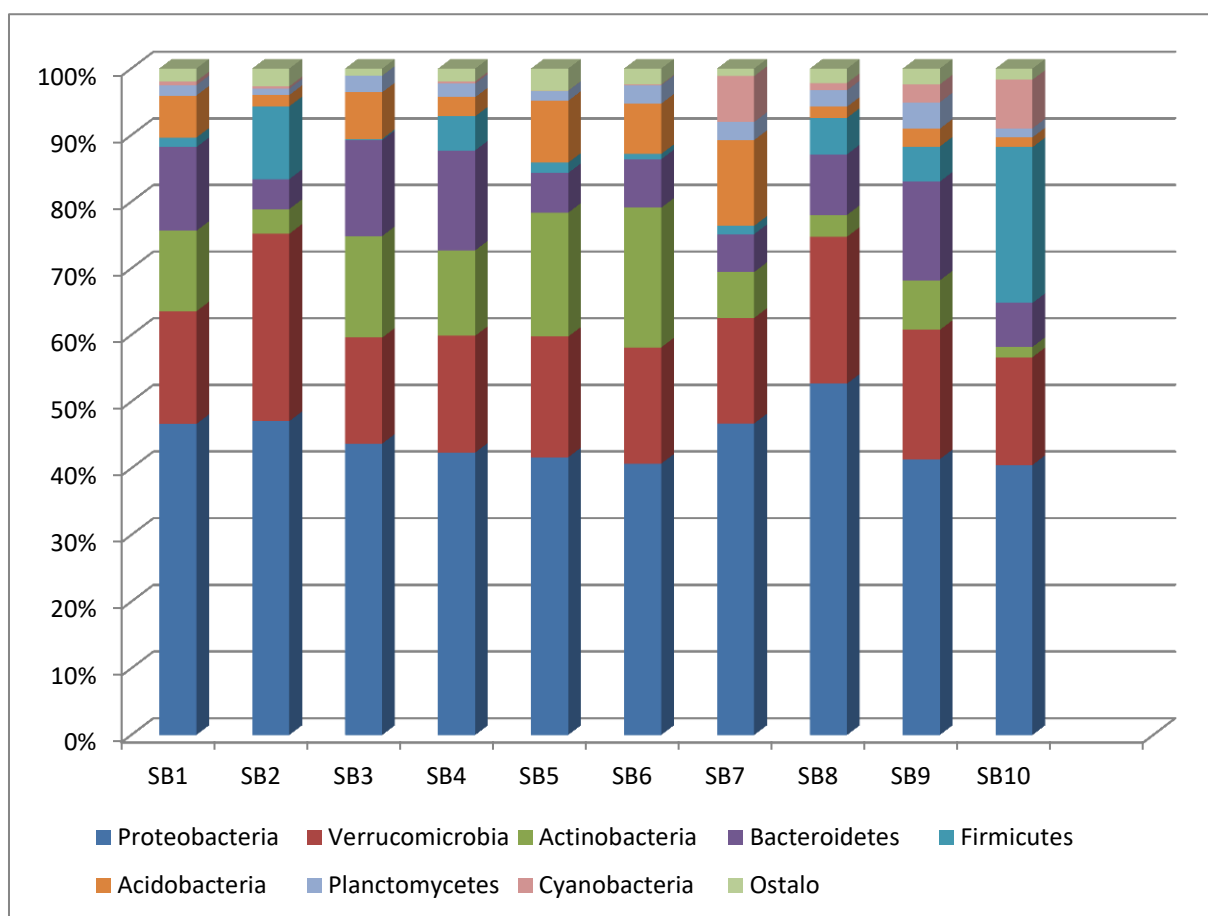
Slika 17. Postotak sekvenci bakterijskih redova determiniranih u analiziranim uzorcima (SB1 – SB10).

Nadalje, za sve su analizirane uzorke izračunati te grafički prikazani postoci nukleotidnih sljedova pojedinih bakterijskih razreda (Slika 18).



Slika 18. Postotak sekvenci bakterijskih razreda determiniranih u pojedinom uzorku (SB1 – SB10).

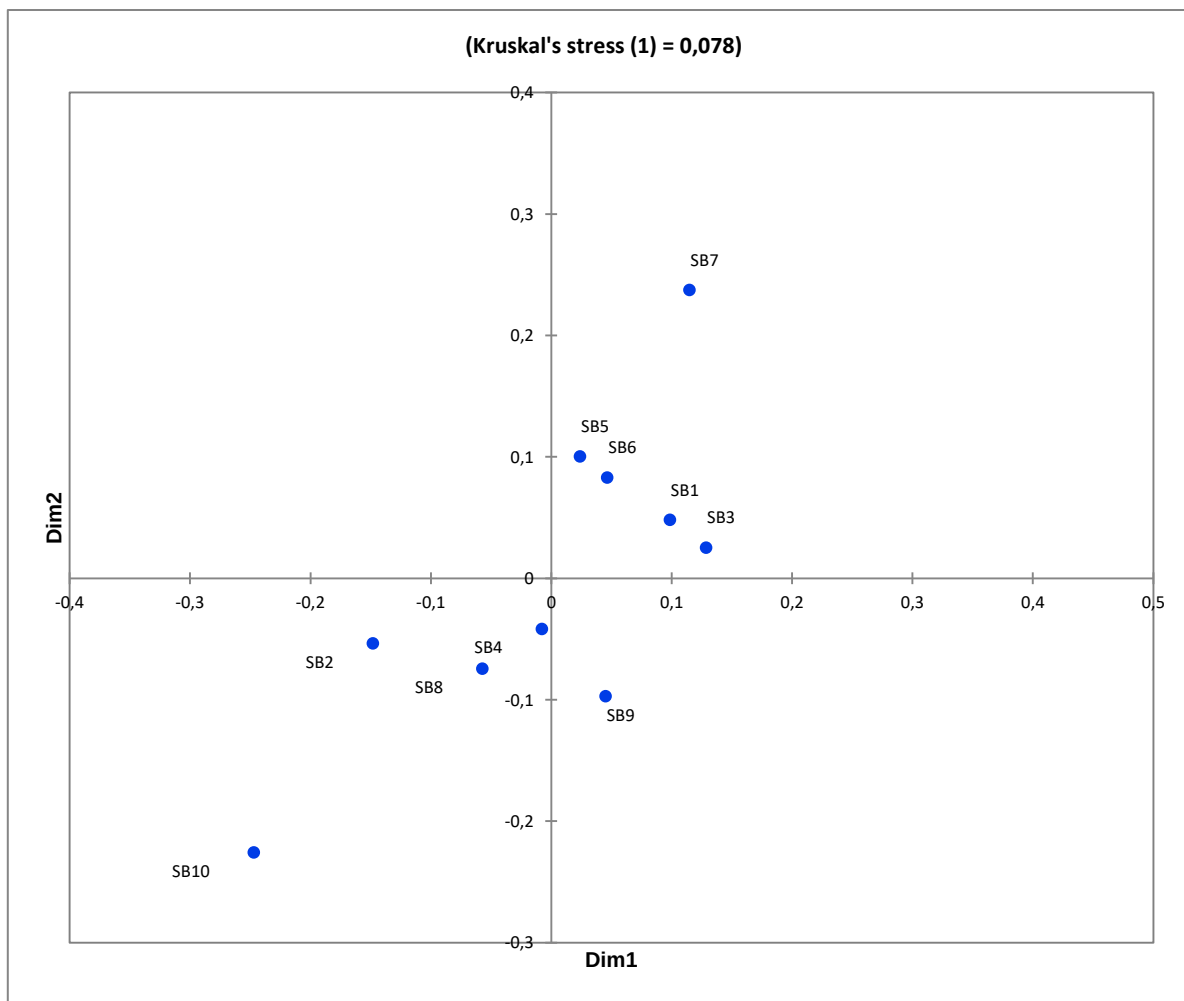
Izračunati su i grafički prikazani postoci nukleotidnih sljedova pojedinih bakterijskih koljena zastupljenih u analiziranim uzorcima (Slika 19).



Slika 19. Postotak sekvenci bakterijskih koljena determiniranih u analiziranim uzorcima (SB1 – SB10).

4.3. Multidimenzionalno skaliranje - analiza glavnih koordinata (MDS)

Na Slici 20 prikazna je struktura skupa podataka gdje su uzorci SB1 – SB10 označeni plavim točkama čija međusobna udaljenost prikazana u dvije dimenzije predstavlja sličnosti odnosno razlike dobivenih sekvenci u uzorcima. Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako su se uzorci grupirali pa se tako uzorci SB1, SB3, SB5 i SB6 čine jednu skupinu sličnih uzoraka, dok uzorci SB2, SB4, SB8 i SB9 čine drugu skupinu sličnih uzoraka. Uzorci SB7 i SB10 međusobno su najudaljeniji, a istovremeno udaljeni su i od ostalih uzoraka što ukazuje na najmanju sličnost tih uzoraka s ostalima.



Slika 20. Multidimenzionalno skaliranje uzoraka SB1 – SB10.

5. RASPRAVA

Korištenjem opisanih materijala i metoda, provedeno je istraživanje na deset različitih uzoraka tla s lokaliteta Skradinski buk te su sekvenciranjem regije gena za 16S rRNA bakterijskog genoma dobiveni rezultati pomoću kojih su determinirane bakterijske populacije u tim uzorcima. Ovaj postupak omogućio je pouzdano određivanje raznolikosti bakterijske zajednice do razine porodice. Determinacija bakterija do razine roda u ovom istraživanju nije bilo dovoljno pouzdano, iako metode sekvenciranja nove generacije u pravilu to omogućuju. Manje je bilo pouzdano određivanje bakterijskih vrsta zbog visoke homologije gena kod nekih bakterijskih vrsta što bi rezultiralo mogućim češćim pogreškama u determinaciji. Za daljnje određivanje prisutnih vrsta u skupljenim uzorcima tla bilo bi potrebno upotrijebiti dodatne metode poput metode određivanja gvanin – citozin parova baza; fluorescentne *in situ* hibridizacije i dr. (Stefanis i sur. 2012).

Dobivene sekvence gena za 16S rRNA bile su uspoređene s bazom podataka u kojoj su pohranjene sekvence gena za 16S rRNA te se usporedbom dobivenih sekvenci s onima iz baze radi taksonomska karakterizacija bakterijskih populacija (Stefanis i sur. 2012)

Nakon determinacije bakterijskih zajednica u istraživanim tlima, napravljene su grafičke usporedbe zastupljenosti pojedinih koljena, razreda, redova i porodica u svih deset ispitanih uzoraka. Slika 18 prikazuje najviše zastupljena koljena bakterija u svakom od deset uzoraka i ono što se može zaključiti je da je koljeno *Proteobacteria* najviše zastupljeno u svim ispitanim uzorcima tla. S obzirom da se radi o koljenu koji obuhvaća velik broj bakterijskih s različitim biološkim ulogama prisutnih na gotovo svim staništima, ovakav rezultat je očekivan (Itävaara i sur. 2016). Osim *Proteobacteria*, u svim uzorcima podjednako je prisutno i koljeno bakterija *Verrucomicrobia* za koje je poznato da čine mali dio ukupne bakterijske zajednice, no s vrlo važnom ulogom, a to je da značajno doprinose razgradnji organske tvari putem fermentativnih procesa (Čanković 2018). U svim uzorcima su detektirane i bakterije iz koljena *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* te *Planctomycetes*. Prisutnost bakterijskih vrsta koje pripadaju navedenim koljenima u skladu su s činjenicom da imaju važnu biokemijsku ulogu u razgradnji organskih tvari (Freitas i sur. 2012) te na taj način sudjeluju u procesu kruženja biogenih elemenata u prirodi. Koljeno *Cyanobacteria* javlja se u znatnijem udjelu u uzorcima SB7, SB9 i SB10 koji predstavljaju uzorke novonastale sedre što je u skladu s činjenicom da su cijanobakterije sudjeluju u procesu nastajanja sedre i sedrenih barijera (Skinner i Jahren 2007.).

Analizom determiniranih bakterijskih porodica iz uzoraka tla uočava se da se pojedine porodice javljaju u svim uzorcima u podjednakim udjelima. To su porodice *Verrucomicrobiaceae*, kao najzastupljenija u svakom uzorku, te *Sphingomonadaceae*, *Bryobacteraceae* i *Zoogloeaceae* u manjem udjelu. Osim njih, u vrlo malom udjelu javljaju se bakterije iz porodica *Aeromonadaceae*, *Azonexaceae*, *Chitinophagaceae*, *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Leptolyngbyaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Saprospiraceae*, *Sinobacteraceae*, *Oscillatoriaceae*, *Xanthobacteraceae* te *Xanthomonadaceae*.

Usporedba udjela pojedinih determiniranih bakterijskih porodica u deset ispitanih uzoraka tla, prikazana je na Slici 15. gdje se može vidjeti kako je najzastupljenija porodica u svim uzorcima *Verrucomicrobiaceae*, a radi se o, u tlu, vrlo zastupljenoj porodici bakterija. Kao što je već spomenuto, radi se o skupini bakterija s važnom ulogom u procesu razgradnje tvari u tlu što objašnjava njihovu prisutnost u svakom od uzoraka tla. Veću zastupljenost zabilježena je u uzorku SB2 koji je uzet u blizini tada presušenog jezera okruženog vegetacijom. U skladu s time, veća zastupljenost ove porodice može se tumačiti činjenicom da su bakterije ove porodice prisutnije u tlima bogatim vegetacijom, kao što su travnjaci, zbog veće međusobne interakcije s eukariotskim organizmima. Istraživanje o rasprostranjenosti bakterija iz reda *Verrucomicrobia* pokazalo je kako se radi o bakterijama koje su zastupljene u svim ekološkim nišama, ali tek nekoliko specifičnih vrsta nastanjuje sediment (Freitas i sur. 2012).

Porodica *Sphingomonadaceae* također je podjednako zastupljena u većini ispitanih uzoraka, a manja zastupljenost uočena je u uzorcima SB2, SB8 i SB10. Radi se o skupini bakterija s različitim metaboličkim sposobnostima s naglaskom na bioremediacijske sposobnosti te kao takve nastanjuju razne tipove staništa (Gan i sur. 2014). S obzirom da je njihova manja zastupljenost uočena u različitim uzorcima tla (SB2 uzorak je sedre prikupljen iznad presušenog jezera, SB8 je uzorak novonastale sedre sa starih spala, a SB10 sedra iz vode velikog slapa) potrebno je dodatno istražiti zašto je manja zastupljenost te porodice upravo u navedenim uzorcima. No, na temelju njihove česte pojave na zagađenim područjima i njihovog metaboličkog potencijala, bakterije iz porodice *Sphingomonadaceae* se smatraju snažnim razlagačima policikličkih aromatskih ugljikovodika u tlu (Leys i sur. 2004 i 2005; Alonso-Gutierrez et al. 2009) pa se u skladu s tim može zaključiti kako se u uzorcima SB2, SB4 i SB10 vjerojatno radi o tlu određenog stupnja zagađenosti.

Iz grafičkih prikaza za svaki uzorak pojedinačno vidljivo je kako postoje porodice koje se u pojedinom uzorku javljaju u znatnom većem udjelu nego u ostalim uzorcima. Između uzoraka SB1, SB3, SB5, SB6, SB8 i SB9 nema prevelikih razlika. U tim uzorcima najzastupljenije su porodice *Verrucomicrobiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Bryobacteraceae*, *Zoogloeaceae* te ostale u manjem udjelu kako je prikazano na slikama 5., 7., 8., 10. i 11. Kako je riječ uzorcima sedre ili sedre pomiješane s tlom, veći udio ovih porodica u tlu može se povezati s činjenicom da su karakteristične za sedru te okoliš uz vodene površine.

U uzorku SB2 vrlo visoku zastupljenost pokazuje porodica *Azonexaceae*, a radi se o uzorku tla prikupljenom iznad tad presušenog jezera. Porodica pripada razredu *Betaproteobacteria* čiji su predstavnici uglavnom heterotrofne bakterije ključne u procesima kruženja biogenih elemenata u prirodi. Rezultati istraživanja pokazuju da su pojedince porodice razreda *Betaproteobacteria*, pa među njima i *Azonexaceae*, uključene u procese uklanjanja onečišćenja policikličkim aromatskim ugljikovodicima u tlu (Martin i sur. 2012) što ukazuje na određen stupanj onečišćenja tla.

Uzorak SB7 karakterizira veći udio bakterija iz porodice *Zoogloeaceae* nego što je to slučaj u drugim uzorcima, a radi se o uzorku stare sedre. No, kako spomenuta porodica nije prisutna u tom udjelu u ostalim uzorcima stare sedre, ne može se izravno povezati veći udio bakterija te porodice s tim tipom tla odnosno sedre.

6. ZAKLJUČAK

1. Na temelju dobivenih nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA identificirane su i determinirane bakterijske populacije do razine porodice u deset uzoraka tla s lokaliteta Skradinski buk. Sastav bakterijskih populacija dobiven analizom nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA pokazuje nema velikih odstupanja te da se pojedine porodice javljaju u svim uzorcima u podjednakim udjelima. To su porodice *Verrucomicrobiaceae*, kao najzastupljenija u svakom uzorku, te *Sphingomonadaceae*, *Bryobacteraceae* i *Zoogloeaceae* u manjem udjelu. Najveći postotak od ukupnog broja sekvenci za svaki pojedini uzorak čine one porodice čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% i samim time nisu uzete u obzir prilikom iskazivanja raznolikosti porodica. No, upravo taj postotak koji predstavlja velik broj porodica sa malim brojem predstavnika u populaciji uzorka ukazuje na vrlo visoku raznolikost bakterijske zajednice u analiziranom tlu u Skradinskom buku. Velika raznolikost bakterijskih zajednica u ispitanom tlu u skladu je s činjenicom da se radi o području koje je pod visokim stupnjem zaštite te su ljudske djelatnosti u njemu ograničene te je utjecaj čovjeka minimalan, a visok stupanj raznolikosti bakterijskih zajednica u tlu očuvan.
2. Porodica *Verrucomicrobiaceae* veću zastupljenost pokazuje u uzorku SB2 koji je prikupljen u blizini tad presušnog jezera na tlu na kojem je prisutna biljna vegetacija. U skladu s tom činjenicom, veća zastupljenost te porodicu u ovom uzorku može se tumačiti kao posljedica međusobne veze bakterijskih vrsta i biljne vegetacije odnosno činjenice da su te bakterije prisutnije u tlima bogatim vegetacijom kao što su travnjaci zbog veće međusobne interakcije s eukariotskim organizmima. No, s obzirom da se takav slučaj pojavio samo u jednom od deset ispitanih uzoraka tla, ne može se sa sigurnošću donijeti zaključak o izravnoj povezanosti većeg udjela pojedinih porodica u tlu sa prisustvom biljne vegetacije.

7. LITERATURA

1. Akram A, Maley M, Gosbell I, Nguyen T, Chavada R (2017): Utility of 16S rRNA PCR performed on clinical specimens in patient management, International journal of infectious diseases, 144 – 149
2. Alonso-Gutierrez J, Figueras A, Albaiges J, Jimenez N, Vinas M, Solanas AM, Novoa B (2009): Bacterial communities from shoreline environments (Costa da Morte, Northwestern Spain) affected by the Prestige oil spill. Appl. Environ. Microbiol. 75, 3407 - 3418.
3. Bergmann GT, Bates ST, Eilers KG, Lauber CL, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N (2011): The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities, Soil Biol Biochem 43(7): 1450–1455
4. Bonacci O, Roje – Bonacci T, Andrić I (2017): Hydrological analysis of Skradinski buk tufa waterfall (Krka River +, Dinaric karst, Croatia)
5. Bralić I (2005): Hrvatski nacionalni parkovi, 172-193
6. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK (2010): QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods 7: 335–336
7. DeGroot SH, Claassen VP, Scow KM (2005) Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. Soil Biol Biochem 37(8):1427–1435
8. Doyle E, Muckian L, Hickey AM, Clipson N (2008): Microbial PAH degradation. Adv. Appl. Microbiol. 65, 27 – 66
9. Eme L, Doolittle WF (2015): Archaea, Current Biology, 851 – 855
10. Fenchel T, King GM, Blackburn TH (2012): Bacterial Biogeochemistry (Third edition), 163 – 181

11. Fierer N (2017): Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiomes, *Nat Rev Microbiol* 15(10) 579 – 590
12. Freitas S, Hatosy S, Fuhrman J, Huse S, Welch DM, Sogin ML, Martiny A (2012): Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia, 1499–1505
13. Gan HM, Gan HY, Ahmad NH, Aziz NA, Hudson AO, Savka MA (2014) : Whole genome sequencing and analysis reveal insights into the genetic structure, diversity and evolutionary relatedness of *luxI* and *luxR* homologs in bacteria belonging to the *Sphingomonadaceae* family, *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 188.
14. Gerard JT, Berdell RF, Christine LC (2014): *Microbiology An Introduction* Tortora Funke Case. 11. izdanje, 277-301, 811-835
15. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016); Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies; *Genetics* 17; 333-348.
16. Hall N (2007.) Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J. Exp. Biol.* 210:1518–25
17. Jansson JK, Hofmocek KS (2018): The soil microbiome – from metagenomics to metaphenomics, *Current opinion in Microbiology*, 162 – 168
18. Jay S, Shankar B, George MC, Walter G, Jane R, Jeffery AS, Robert HW (2017): DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* **550**: 345-350
19. Joanne MW, Linda MS, Christoper JW (2014) : *Prescotts Microbiology*. 92-108
20. Ju J, Kim DH, Bi L, Meng Q, Bai X, Li Z, ... & Edwards JR (2006): Fourcolor DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19635-19640
21. Korlević M, Šuprah L, Ljubešić Z, Henderiks J, Ciglencečki I, Dautovć, J, Orlić, S (2016): Bacterial diversity across a strong vertical contrast ecosystem: a salt wedge

karstic estuary. *Systematic and Applied Microbiology* 39: 398-408

22. Korlević M, Zucko J, Najdek Dragić N, Blažina M, Pustijanac E, Vojvoda Zeljko T, Gacesa R, Baranasic D, Starcevic A, Diminic J, Long PF, Cullum J, Hranueli D, Orlić, S (2015): Bacterial diversity of polluted surface sediments in northern Adriatic Sea. *Systematic and Applied Microbiology* 38(3): 189–197.
23. Krajačić M (2010): Bakterije – „novo“ carstvo „starih bakterija“, tekst predavanja
24. Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Wattiau P, Top EM, Verstraete W, Springael D (2005): Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 375 – 388
25. Leys NMEJ, Ryngaert A, Bastiaens L, Verstraete W, Top EM, Springael D (2004): Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1944 – 1955
26. Mah F., Rognes T, Quince C, De Vargas C, Dunthorn M (2015): Swarm v2: highly-scalable and highresolution amplicon clustering. *PeerJ* 3: e1420.
27. 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.
28. Martin F, Torelli S, Paslier D, Barbance A, Laurent FM, Bru D, Geremia R, Blake G, Jouanneau Y (Environmental Pollution (2012): Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene 162, 345 – 353
29. Metzker ML (2010): Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.

30. Peay KG, Kennedy PG, Talbot JM (2106): Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome; *Nature Reviews Microbiology*; 14: 434-447
31. Pham HT, Kim J (2012): Cultivation of unculturable soil bacteria, *Trends in Biotechnology*, 475 – 484
32. Prosser JI (2015): Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of 'omics' in soil microbial ecology; *Nature Reviews Microbiology*; 13: 439–446
33. Ramakrishnan V (2002): Ribosome Structure and the Mechanism of Translation), *Cell*, 557 – 572
34. Rosenberg E (2017): It's in Your DNA From Discovery to Structure, Function and Role in Evolution, Cancer and Aging: Chapter 14 - Origin of Nucleic Acids and the First Cells, 129-138
35. Sanger F, Nicklen S, & Coulson AR (1977): DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463- 5467
36. Skinner HCW, Jahren H (2007): Biomineralization, *Tretise on Geochemistry*, 1 – 69
37. Stefanis C, Alexopoulos A, Voudarou C, Vavias S, Bezirtzoglou E (2012): Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities. *Folia Microbiologica*, 58(1), 61–68
38. Swannack TM, Grant WE (2008): Systems Ecology, *Encyclopedia of Ecology*, 3477-3481
39. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, & Thermes C (2014): Ten years of next generation sequencing technology. *Trends in genetics*, 30(9), 418-426.
40. Veresoglou SD, Halley JM, Rillig MC (2015): Extinction risk of soil biota
doi:10.1038/ncomms9862

41. Wang X, Jordan IK, Mayer LW (2015): A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology, *Molecular Medical Microbiology*, 517 – 536
42. Wiley J, Sherwood L, Woolverton C (2013): Prescott's Microbiology, 9th edition McGraw-Hill, Boston
43. Wiley J, Sherwood L, Woolverton C (2013): Prescott's Microbiology, 8th edition McGraw-Hill, Boston
44. Woese CR (1993): Introduction The archaea: Their history and significance. *New Comprehensive Biochemistry*, 7 – 28
45. 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. USA*, 87, 4576 – 4579

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Adriana Martinović

Mariborska 25, 10360 Sesvete

Datum rođenja: 9. rujna 1994.

Spol: ženski

Državljanstvo: hrvatsko

OBRAZOVANJE:

2013 – 2018 Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije
 Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
 Znanje i vještine vezane uz laboratorijski rad; znanje iz područja biologije i kemije

2009 – 2013 Opća gimnazija, Srednja škola Sesvete, Sesvete

2001 - 2009 Osnovna škola Sesvete, Sesvete