

Ekologija i struktura bakterijskih zajednica u jezerima Nacionalnog parka Plitvička jezera

Matić, Adriana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:793242>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Adriana Matić

**Ekologija i struktura bakterijskih zajednica
u jezerima Nacionalnog parka Plitvička
jezera**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Adriana Matic

**Ecology and bacterial community structure
in the lakes of the Plitvice lakes National
park**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za procese taloženja na zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom višeg znanstvenog suradnika, dr. sc. Sandi Orlića, te neposrednim voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Marije Gligore Udovič. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

Hvala dr. sc. Sandiju Orliću na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i razumijevanju tijekom izrade ovog diplomskog rada

Hvala izv. prof. dr. sc. Mariji Gligora Udovič na ažurnosti, ispravcima i savjetima tijekom pisanja diplomskog rada.

Hvala zaposlenicima Laboratorija za procese taloženja na ugodnoj atmosferi. Hvala doktorandici Maji Mitrović na nesebičnom odvajanju svoga vremena kako bi me provela kroz metodologiju i eksperimente.

Zahvaljujem se svim profesorima, asistentima i djelatnicima Prirodoslovno-Matematičkog fakulteta. Posebno hvala doc.dr.sc. Sunčici Bosak koja mi je otkrila svijet mikrobne ekologije.

Hvala mojoj kolegici i prijateljici Matei, za sve lijepe i one manje lijepe trenutke tijekom studiranja. Hvala ti što si uvijek slušala moje žalopojke i drame. #bitćebolje #čekamobiljedane

Hvala mojim dragim prijateljima, Niki i Tomislavu. Hvala vam za sve divne uspomene i što uvijek nađete vremena za popit kavu kad dođem u Rijeku.

Neizmjerne hvala mojoj obitelji, na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i zagrljajima u sretnim i u teškim trenucima tijekom svih godina studiranja.

Posebno hvala mojim roditeljima koji su mi pružili sigurnu luku iz koje mogu isploviti, ali se i uvijek vratiti. Hvala i bratu Marinu, čiji je znanstveni put uvijek inspiracija.

*Svaka moja pobjeda je i vaša,
i zato ova diploma nije moja nego naša!*

Lastly, my dearest Keith, you will forever be my always. This one is for us!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekologija i struktura bakterijskih zajednica u jezerima Nacionalnog parka Plitvička jezera

Adriana Matić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nacionalni park Plitvička jezera najstariji je nacionalni park u Republici Hrvatskoj, poznat po brojnim jezerima odvojenim sedrenim barijerama. Dio je Dinarskog krškog područja koje je okarakterizirano specifičnim hidrološkim obilježjima te iznimnom biološkom raznolikošću. U slatkovodnim ekosustavima, bakterije predstavljaju raznoliku skupinu mikroorganizama sa ulogom u biogeokemijskim ciklusima, fiksacijom i remineralizacijom hranjivih tvari i u protoku ugljika. Sekvenciranje temeljeno na Illumina pristupu korišteno je za opisivanje bakterijskih zajednica u Nacionalnom parku Plitvička jezera za procjenu utjecaja okolišnih čimbenika na strukturu i raznolikost bakterijskih zajednica tijekom zime. Najzastupljenija koljena bila su *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Verrucomicrobiota*. Na razini porodice, dominirale su *Comamonadaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Sporichthyaceae* i *Corynebacteriaceae*. Spearman-ov test korelacije pokazao je značajne korelacije (negativne i pozitivne) okolišnih čimbenika i abundancije na razini koljena i porodice. Bakterijske zajednice posebno su bile osjetljive na temperaturu, konduktivitet, koncentracije magnezija, kalcija i otopljenog anorganskog ugljik. Permutacijski test za kanonsku analizu korespondencije, pokazao je da su konduktivitet, sulfati i kloridi statistički značajni čimbenici koji utječu na bakterioplankton. Okolišni čimbenici drugačije su utjecali na pojedine taksone što se može povezati s njihovim specifičnim metaboličkim sposobnostima. Ovo je istraživanje među prvima koje opisuje odnose između fizikalno-kemijskih parametara i bakterijskih zajednica unutar slatkovodnog ekosustava Nacionalnog parka Plitvička jezera.

(60 stranica, 17 slika, 6 tablica, 105 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: slatkovodni ekosustavi, taksonomska raznolikost, bakterioplankton, sekvenciranje amplikona 16S rRNA

Voditelj: dr. sc. Sandi Orlić, viši znanstveni suradnik

Suvoditeljica: dr. sc. Marija Gligora Udovič, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Marija Gligora Udovič, izv. prof.

dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

dr.sc. Petar Kružić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 07. listopad 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Ecology and bacterial community structure in the lakes of the Plitvice lakes National park

Adriana Matic

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The Plitvice Lakes National Park is the oldest national park in the Republic of Croatia, famous for its numerous lakes separated by tufa barriers. It is a part of the Dinaric karst area, characterized by specific hydrological traits and biological diversity. In a freshwater ecosystem, bacteria represent a diverse group of microorganisms that play roles in biogeochemical cycles, nutrient fixation, remineralization, and carbon flux. An Illumina-based sequencing approach was used to characterize bacterial communities along the Plitvice Lakes National Park to assess the influence of environmental variables on winter bacterial community structure and diversity. The most abundant bacterial phyla were *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Verrucomicrobiota*. At the family level, *Comamonadaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Sporichthyaceae* and *Corynebacteriaceae* predominated. Spearman's correlation analysis showed significant correlations (negative and positive) between environmental parameters and abundances at phylum and family levels. Bacterial communities were particularly affected by temperature, conductivity, dissolved inorganic carbon, concentration of calcium and magnesium. The permutation test for Canonical correspondence analysis showed that conductivity, sulphate, and chloride were also statistically significant factors affecting bacterioplankton. Each taxon responded differently to the environmental variables, which could be related to their specific metabolic capabilities. This study is one of the first to characterize the relationships between environmental parameters and microbial communities in the Plitvice Lakes freshwater ecosystem.

(60 pages, 17 figures, 6 tables, 105 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: freshwater ecosystem, taxonomic diversity, bacterioplankton, 16S amplicon sequencing

Supervisor: dr. sc. Sandi Orlić, Senior Research Associate

Co-supervisor: dr. sc. Marija Gligora Udovič, Assoc. Prof.

Reviewers: dr. sc. Marija Gligora Udovič, Assoc. Prof.

dr. sc. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

dr. sc. Petar Kružić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 7th October 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Molekularne metode u mikrobiologiji ekosustava	4
1.2. Gen 16S rRNA kao filogenetski marker u karakterizaciji bakterijskih zajednica	4
1.3. Sangerovo sekvenciranje	6
1.4. Strategije sekvenciranja nove generacije	7
1.5. Platforme sekvenciranja nove generacije	7
1.6. Illumina platforma	8
1.7. Uloga bakterijskih zajednica u biogeokemijskom ciklusu ugljika	12
1.8. Bakterijske zajednice slatkovodnih jezera	13
1.9. Bakterijske zajednice Nacionalnog parka Plitvička jezera	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	17
3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA	17
4. MATERIJALI I METODE	20
4.1. Uzorkovanje	20
4.2. Fizikalno – kemijska analiza vode	22
4.3. Izolacija DNA	22
4.4. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA	23
4.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	23
4.6. Elektroforeza na agaroznom gelu	24
4.7. Metoda sekvenciranja nove generacije pri analizi bakterijskih zajednica	25
4.8. Statistička analiza podataka	25
5. REZULTATI	27
5.1. Fizikalno – kemijska analiza vode	27
5.1.1. Analiza glavnih komponenata (PCA)	29
5.2. Struktura, raznolikost i brojnost bakterioplanktonskih zajednica NP Plitvička jezera	31
5.2.1. Alfa raznolikost	35
5.2.2. Beta raznolikost	36
5.3. Utjecaj okolišnih čimbenika na strukturu bakterioplanktonskih zajednica NP Plitvička jezera	40
5.3.1. Kanonska analiza korespondencije (CCA)	44
6. RASPRAVA	46
7. ZAKLJUČAK	50
8. LITERATURA	51
9. ŽIVOTOPIS	59
PRILOZI	60

POPIS KRATICA

ANOVA	Jednosmjerna analiza varijance, <i>One-Way Analysis of Variance</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CCA	Kanonska analiza korespondencije, <i>Canonical Correspondence Analysis</i>
Cfb	Klimatski podtip umjereno tople vlažne klime s toplim ljetom
Df	Klimatski podtip vlažno snježne-šumske klime
DGU	Državna geodetska uprava
ddNTP	Dideoksiribonukleozid-trifosfat, <i>Dideoxynucleotides Triphosphates</i>
DIC	Otopljeni anorganski ugljika, <i>Dissolved Inorganic Carbon</i>
dNTP	Deoksiribonukleotid, <i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i>
DOC	Otopljeni organski ugljik, <i>Dissolved Organic Carbon</i>
DOM	Otopljena organska tvar, <i>Dissolved Organic Matter</i>
dsDNA	Dvolančana DNA, <i>DNA double strand</i> ,
NGS	Sekvenciranje nove generacije, <i>Next Generation Sequencing</i>
OTU	Operacijska taksonomska jedinica, <i>Operational Taxonomic Unit</i>
pb	Parova baza, <i>Base Pair (bp)</i>
PCA	Analiza glavnih komponenta, <i>Principal Component Analysis</i>
PCoA	Analiza glavnih koordinata, <i>Principal Coordinates Analysis</i>
PCR	Lančana reakcija polimerazom, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PERMANOVA	Permutacijska analiza varijance, <i>Permutational Multivariate Analysis of Variance</i>
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
SBS	Sekvenciranje sintezom, <i>Sequencing by Synthesis</i>
ssDNA	Jednolančana DNA, <i>DNA single strand</i>
TAE	Tris-acetat EDTA puffer

1. UVOD

Mikroorganizmi nastanjuju gotovo cijelu biosferu uključujući i ekstremne ekosustave (Head, Saunders i Pickup 1998). Razlog iznimne biološke raznolikosti je njihova prilagodljivost, mikroskopska veličina te genetska varijabilnost (Forney, Zhou i Brown 2004). Ključna uloga mikroorganizama u ekosustavima je to što sudjeluju u kruženju biogenih elemenata poput ugljika, dušika, sumpora, fosfata i ostalih važnih elemenata (Paerl i Pickney 1996). Uz to, mogu biti indikatori za procjenu stanja ekosustava jer su osjetljivi na promjene u okolišu. (Yadav i sur. 2019).

Značajan korak u identifikaciji mikroorganizama bio je uzgoj u čistoj kulturi (Edwards 2000). Iako ova metoda pruža detaljne informacije o identifikaciji mikroorganizama na razini vrste te omogućuje razumijevanje njihove uloge u okolišnim procesima, pretpostavljeno je da se <1% mikroorganizama može uzgojiti u laboratorijskim uvjetima (Rappé i Giovannoni 2003). Samim time ova metoda daje nepotpunu informaciju o prisutnosti mikroorganizama u ekosustavima (Alain i Querellou 2009).

Razvojem novih molekularnih metoda omogućena je identifikacija mikroorganizama koji se ne mogu kultivirati. Metagenomika je omogućila analizu DNA u uzorku iz okoliša. Uz to, korištenje gena 16S rRNA kao filogenetskog markera te razvitak metoda sekvenciranja nove generacije (*Next Generation Sequencing*, NGS) bio je temelj za razvitak moderne mikrobne ekologije (De Mandal i Panda 2015). Cilj mikrobne ekologije je razumijevanje strukture, funkcije i raznolikost mikroorganizama, te razumijevanje međusobne interakcije i dinamike mikrobnih zajednica s okolišem (Forney, Zhou i Brown 2004).

Metoda NGS se odnosi na masivno paralelno sekvenciranje velikog broja molekula DNA, istodobno u jednoj reakciji. Metoda NGS omogućuje karakterizaciju mikrobnih zajednica iz okoliša, kvalitetno određivanje slijeda nukleotida te brzo i učinkovito sekvenciranje DNA. Najčešće korištena NGS je Illumina platforma, čiji je princip rada temeljen na reverzibilnom zaustavljanju sinteze DNA (De Mandal i Panda 2015). Metode sekvenciranja nove generacije uspješno se koriste za analizu bakterijskih zajednica različitih ekosustava, uključujući i slatkovodne ekosustave (Nakatsu i sur. 2019).

Bakterijske zajednice u slatkovodnim ekosustavima (lokve, bare, ribnjake, močvare, jezera, potoke i rijeke) predstavljaju raznoliku skupinu mikroorganizama. Bakterijske zajednice u slatkovodnim jezerima imaju važnu ulogu u biogeokemijskim ciklusima, fiksaciji i remineralizaciji

hranjivih tvari, regulaciji anorganskih tvari te u protoku ugljika (*carbon flux*) (Amon i Benner 1996). U slatkovodnim jezerima i rijekama pronalazimo različite funkcionalne skupine poput primarnih proizvođača, fotoheterotrofa, heterotrofa, fiksatora dušika, nitrifikatora i denitrifikatora (Gasol i Kirchman 2018). Globalno rasprostranjene zajednice bakterija u slatkovodnim jezerima uglavnom se sastoje od koljena - *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota* (Yadav i sur. 2019, Newton i sur. 2011).

Bakterijske zajednice osjetljive su na promjene u okolišu stoga je, uz strukturu i brojnost bakterijskih zajednica, nužno uzeti u obzir i okolišne čimbenike ekosustava (Hanson 2012). Na zajednice bakterija mogu utjecati razni okolišni čimbenici uključujući organsku tvar (Logue i sur. 2012), dušik, fosfor (Nakatsu i sur. 2019), pH i temperaturu (Lindström, Kamst-Van Agterveld i Zwart, 2005) i dr..

Istraživanja bakterijskih zajednica pridonose razumijevanju evolucije, funkcionalne uloge te genetske varijabilnost bakterijskih zajednica (Joshi 2016). Uz to, omogućuju određivanje utjecaja okolišnih čimbenika na sastav, raznolikost i rasprostranjenost bakterijskih zajednica te povezanost pojedinih skupina s određenim uvjetima okoliša. (Joshi 2016, Yadav i sur. 2019). Iz navedenih razloga, složeni slatkovodni ekosustavi poput Nacionalnog parka Plitvička jezera pogodni su za procjenu utjecaja okolišnih čimbenika na sastav bakterijskih zajednica.

Nacionalni park Plitvička jezera nalazi se u središnjem dijelu Dinarskog krša te je jedan od najpoznatijih jezerskih ekosustava u Hrvatskoj. Sastoji se od 16 većih i manjih jezera podijeljenih na Gornja (12) i Donja (4) jezera koja su kaskadno poredana te su odijeljena sedrenim barijerama. Osim samih jezera, sustavu Plitvičkih jezera pripada i niz rijeka, potoka i izvora (Stilinović i Božičević 1998). Nacionalni Park Plitvička jezera odlikuje se iznimnom bioraznolikošću. Biološka istraživanja vodenog ekosustava Plitvičkih jezera orijentirana su na makrozoobentoske (Ivković i sur. 2012, Previšić i sur. 2010) i fitoplantonske zajednice (Žutinić i sur. 2009, Habdija i Sertić Perić 2011). Istraživanja bakterioplanktonskih zajednica provedena su u Prošćanskom jezeru, dok istraživanja ostalog vodenog ekosustava NP Plitvička jezera izostaju (Vurnek i sur. 2016, Pjevac i sur. 2018).



Slika 1. Nacionalni Park Plitvička jezera tijekom zimskih mjeseci (preuzeto s www.np-plitvicka-jezera.hr)

1.1. Molekularne metode u mikrobiologiji ekosustava

U prošlosti, najčešće metode u mikrobiologiji temeljile su se na opisivanju morfologije koristeći mikroskopiju, izolaciju i uzgoj mikroorganizama u čistim kulturama; te biokemijskim testovima (Edwards 2000, Rappé i Giovannoni 2003).

Identifikacija mikroorganizama na temelju morfologije je gotovo nemoguća jer je poznato minimalno morfoloških karakteristika što onemogućava značajnu usporedbu (Edwards 2000). Značajan korak u identifikaciji mikroorganizama bio je uzgoj u čistoj kulturi. Čista kultura je kultura nastala umnožavanjem jedne stanice koja je izolirana unutar sterilne hranjive mikrobiološke podloge. Prvi tekući umjetni medij za uzgoj u kulturi razvio je Louis Pasteur 1860 godine. Revolucionarni korak u ovoj metodi je razvitak prvog krutog medija koji je razvio Robert Koch. Hranjiva mikrobiološka podloga sa krutim medijem omogućuje umnožavanje te pročišćavanje bakterijskih kolonija. Selektivnost krutih i tekućih hranjivih podloga te uvjeti kultivacije često favoriziraju samo određenu frakciju bakterijske zajednice. Stoga, glavno ograničenje ove klasične metode je podcjenjivanje brojnosti i strukture bakterijskih zajednica u promatranim uzorcima (Bonnet i sur. 2020). Daljnjim istraživanjima procijenjeno je da se <1% mikroorganizama može uzgojiti na standardnim mikrobiološkim podlogama. Ostali čimbenici koji određuju bioraznolikost mikroorganizama poput interakcije između mikroorganizama, utjecaj fizikalno – kemijskih uvjeta te evolucijske promjene mikroorganizama nemoguće je odrediti u laboratorijskim uvjetima (Rappé i Giovannoni 2003).

Razvojem molekularnih metoda omogućeno je istraživanje nekultiviranih mikroorganizama iz okoliša. Metodu za određivanje slijeda nukleotida odnosno prvu generaciju sekvenciranja DNA razvili su Sanger i sur. (Sanger i sur. 1977). Danas je Sangerovo sekvenciranje unaprijeđeno i automatizirano (Hunkapille i sur. 1991, Huang i sur. 1992). te se koristi za projekte gdje je moguće nisko do srednje propusno sekvenciranje (Iaconelli i sur. 2017).

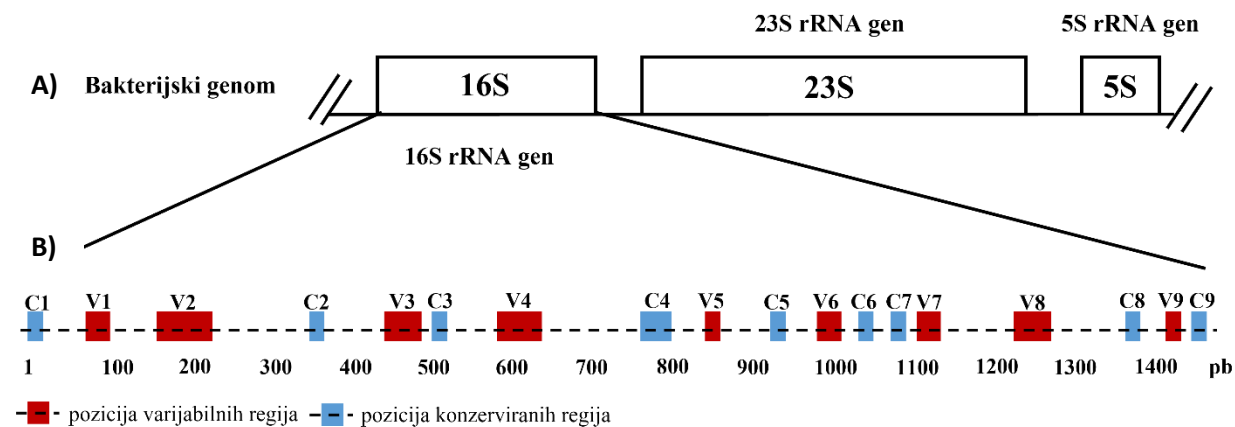
U mikrobnoj ekologiji danas se najčešće koristi gen 16S rRNA kao filogenetski marker i metode nove generacije sekvenciranja za detaljnu analizu bakterijskih zajednica (Forney, Zhou i Brown 2004, Buermans i den Dunnen 2014, De Mandal i Panda. 2015).

1.2. Gen 16S rRNA kao filogenetski marker u karakterizaciji bakterijskih zajednica

Gen 16S rRNA prisutan je u svim bakterijama, a homologni oblik javlja se u svim stanicama, uključujući i stanice eukariota. Gen 16S rRNA kodira dio RNA koji čini funkcionalni

dio bakterijskog ribosoma. Osim što je generalno prisutan u organizmima, strukturna i funkcionalna konzerviranost te varijabilne (*variable regions*) i konzervirane regije (očuvane regije, *conserved regions*) omogućuju njegovu široku primjenu u ekološkim istraživanjima. Osim toga, veliki broj sekvenci gena 16S rRNA je dostupan u bazama podataka koje omogućuje dobru usporedbu podataka te određivanje filogenetske pripadnosti i taksonomsku klasifikaciju bakterija (Bukin i sur. 2019).

Gen 16S rRNA prosječno je dugačak 1550 pb (parova baza, *Base Pair (bp)*). Struktura gena 16S rRNA sastoji se od nekoliko konzerviranih regija između kojih se nalaze devet varijabilnih regija nazvane od 1 do 9 (V1-V9) (Slika 2) koje su uključene u sekundarnu strukturu male ribosomske jedinice. Konzervirane regije ključne su za ispravnu strukturu i funkciju ribosoma te omogućavaju filogenetsku analizu. To su neovisne evolucijske regije koje imaju niski stopu mutacija. Za razliku od njih, varijabilne regije imaju veću stopu mutacija te omogućuju razlikovanje bakterijskih zajednica (Bukin i sur. 2019).



Slika 2. Položaj varijabilnih i konzerviranih regija u bakterijskom 16S rRNA genu. **A)** Bakterijski genom **B)** pozicija varijabilnih (V1-9 ■) i konzerviranih (C1-9 ■) regija u tipičnom bakterijskom 16S rRNA genu (napravljeno i prilagođeno prema Ram i sur.2011; Fukuda i sur. 2016)

Važno je izabrati odgovarajuće varijabilnije regije gena 16S rRNA za analizu mikrobnih zajednica zbog odstupanja početnica i ograničenja u dužini očitavanja sekvenciranja. Najčešće se koriste varijabilne regije V3, V4 i V6 regije gena 16S rRNA (Nguyen, i sur. 2016) Regija V4 pokazala se najboljom za filogenetske studije, posebno na taksonomskom nivou koljena, te je pogodna za istraživanje bakterijskih zajednica slatkovodnih okoliša (Yang i sur. 2016a).

1.3. Sangerovo sekvenciranje

Sangerovo sekvenciranje prva je generacija sekvenciranja koja se i danas široko koristi (Hunkapille i sur. 1991, Buermans i den Dunnen 2014). Sangerovo sekvenciranje naziva se i terminacija sinteze lanca (*Chain Termination Method*) ili enzimatska dideoksi-metoda (Sanger i sur. 1977). Osnovni princip Sangerove metode sekvenciranja je upotreba kemijskih analoga deoksiribonukleotida (dNTP), dideoksiribonukleozid-trifosfata (ddNTP).

DdNTP-ovima nedostaje 3' hidroksilna (-OH) skupina koja je potrebna za elongaciju DNA lanaca. To onemogućuje vezanje 5' fosfata sljedećeg dNTP odnosno formiranje fosfodiesterske veze. DNA polimeraze, enzimi koji sintetiziraju DNA, u rastući lanac ugrađuju ddNTP te dolazi do terminacije sinteze 5' → 3' polinukleotidnog lanca DNA. Sangerovo sekvenciranje je modificirano i unapređeno primjenom termostabilne DNA polimeraze i razvojem PCR-a. Inicijalni korak Sangerovog sekvenciranja je izolacija nukleinskih kiselina. Sljedeći korak je amplifikaciju sekvenci lančanom reakcijom polimeraze (PCR, *Polymerase chain reaction*) (Mullis i sur. 1986, Saiki i sur. 1988). Nadalje, dobivene sekvence razdvajaju se elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Najveći nedostaci elektroforeze su priprema gela, nanošenje uzoraka na gel, te očuvanje gela nakon elektroforeze (Swerdlow i sur. 1992). Vrste elektroforeze koje se koriste u području mikrobne ekologije za analizu okolišnih uzoraka i kod određivanja mikrobiološke raznolikosti su: (a) gel elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa (DGGE) (Muyzer i sur. 1993), (b) polimorfizam veličine restrikcijskih fragmenata (RFLP) koja služi za detekciju prisutnost fragmenata DNA različite duljine nakon tretiranja DNA molekule restrikcijskim endonukleazama (Cancilla i sur. 1992). Fluoroscento obilježeni ddNTP-ovi, laserska detekcija signala te obrađivanje podataka pomoću računala omogućila je automatizaciju Sangerovog sekvenciranja (Hunkapille i sur. 1991). Uz to, automatsko sekvenciranje unaprijeđeno je paralelnom kapilarnom elektroforezom (*Capillary Array Electrophoresis, CAE*) (Huang i sur. 1992).

Sangerovo sekvenciranje je zlatni standard sekvenciranja jer ima mogućnost očitavanja dugih sekvenci sa visokom preciznošću. Sporo sekvenciranje i visoka cijena Sangerovog sekvenciranja kada su u pitanju veliki projekti dovodi do razvitka nove generacije sekvenciranja. U odnosu na Sangerovo sekvenciranje, ove metode omogućavaju brzo i učinkovito sekvenciranje DNA te kvalitetno određivanje slijeda nukleotida (Buermans i den Dunnen 2014).

1.4. Strategije sekvenciranja nove generacije

Masivno paralelno sekvenciranje odnosno sekvenciranje nove generacije (NGS, *Next generation sequencing*) omogućuje dobivanje nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća nukleotidnih sljedova i istovremeno sekvenciranje nekoliko desetaka uzoraka u jednoj reakciji.

Primjena metoda sekvenciranja nove generacije omogućuje detaljniju analizu nekultiviranih bakterijskih zajednica. Opća metoda sekvenciranja sljedeće generacije u analizi bakterijskih zajednica uključuje: **(1)** ekstrakciju i pročišćavanje DNA bakterija u uzorku, **(2)** fragmentaciju DNA, odabir početnica za amplifikaciju i sekvenciranje, **(3)** amplifikaciju jednolančanih fragmenata DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR), **(4)** paralelno sekvenciranje odabranom platformom NGS-a, **(5)** dobivanje kontinuirane genomske sekvence sastavljanjem preklapajućih fragmenata ili uspoređivanjem dobivenih fragmenata s referentnim genomima iz dostupnih baza (De Mandal i Panda. 2015).

Razlikujem dvije glavne strategije sekvenciranja sljedeće generacije: **(a)** sekvenciranje cijelog genoma (*Whole genome sequencing*, WGS) i **(b)** sekvenciranje određenih skupina gena (sekvenciranje amplikona, ciljano sekvenciranje). Sekvenciranje cijelog genoma (*Whole genome sequencing*, WGS) je metoda koja omogućuje detaljnu analizu cijelih genoma, uključujući egzone, nekodirajuće regije i strukturne varijante. Metoda koristi nasumično kidanje/usitnjavanje (*shredding*) genoma u manje fragmente i potom sekvenciranje metodama NGS-a. S obzirom na to da WGS ne zahtjeva prethodno poznavanje genoma omogućava istraživanje bakterijskih genoma bez prethodnog poznavanja bakterijske zajednice. Nedostatak WGS je veliki trošak te izazovna bioinformatička analiza koja se temelji na rekonstrukciji bakterijskog sastava zajednice iz slučajnog skupa DNA sekvenci (Quince i sur. 2017).

Sekvenciranje amplikona ili ciljano sekvenciranje omogućuje analizu pojedinačnih gena ili genomskih regija. U odnosu na WGS, sekvenciranje amplikona omogućilo je smanjenje ukupnih troškova sekvenciranja te pojednostavilo analizu podataka. Sekvenciranje amplikona za gen 16S rRNA je najčešće korištena molekularna analiza bakterija do razine vrste (Chakravorty i sur. 2007).

1.5. Platforme sekvenciranja nove generacije

Kao što je prethodno opisano prva generacija sekvenciranja je Sangerovo sekvenciranje. Osim Sangerovog sekvenciranja, razvijene su i različite komercijalne platforme koje koriste metodu sekvenciranja nove generacije (De Mandal i Panda. 2015).

Razlikujemo nekoliko platformi NGS druge generacije - *Roche 454 Genome Sequencer* (<http://sequencing.roche.com>), *Illumina* (<https://www.illumina.com>), *AB SOLiD™* (<https://www.ab-solid.eu>) i *Ion Personal Genome Machine* (<https://www.biocompare.com>), te treće generacije – *PacBio RS* (<https://www.pacb.com>) i *MinION* (<https://nanoporetech.com>).

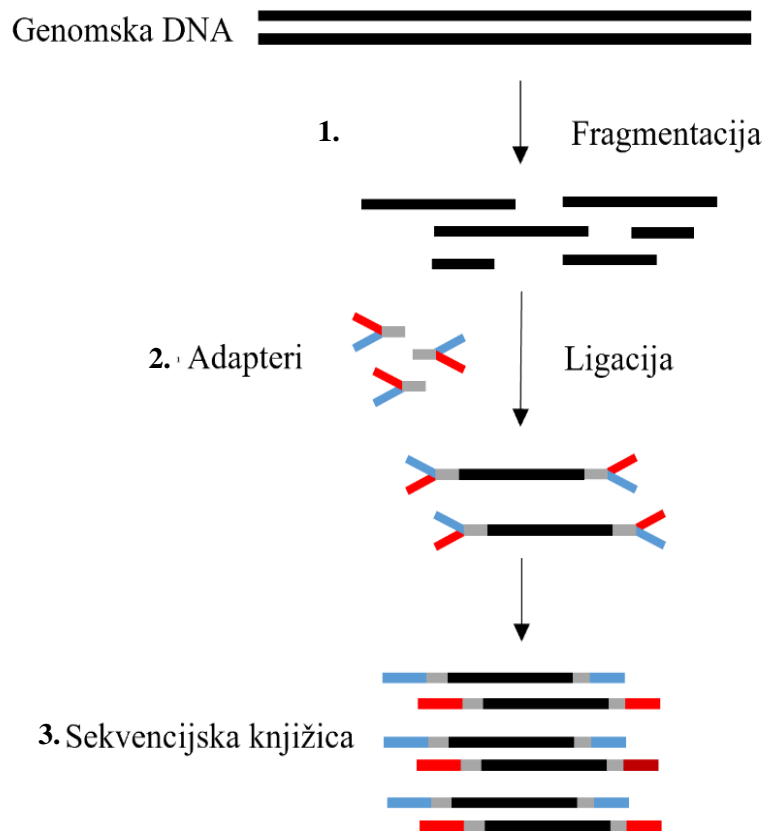
Platforme sekvenciranja nove generacije mogu se kategorizirati prema specifičnom načinu pripreme knjižica (*library*), a to su: (a) klonska amplifikacija PCR-om (platforme *Roche 454 Genome Sequencer*, *Illumina*, *SOLiD™ System* i *Ion Personal Genome Machine*) i (b) bez amplifikacije PCR-om (platforme *PacBio RS* i *MinION*). Uz to, platforme se mogu kategorizirati i prema metodi sekvenciranja - (a) sekvenciranje sintezom (*Sequencing by Synthesis*, SBS) koju koristi platforma *Illumina*, (b) sekvenciranje ligacijom koju koristi platforma *AB SOLiD™* te (c) sekvenciranje u stvarnom vremenu (*Single Molecule, Real-Time*, SMRT) koje koriste platforme *PacBio* i *MinION*. Platforme razlikujemo i prema načinu detekcije nukleotida, a to su: (a) detekcija otpuštenih pirofosfata (pirosekvenciranje, *pyrosequencing*) - *Roche 454 Genome Sequencer*, (b) detekcija otpuštenih protona (*ion semiconductor sequencing technology*) - *Ion Personal Genome Machine*, (c) fluorescencijom istovremenog određivanja dvaju nukleotida (*di-base probes*) - *AB SOLiD™*, fluorescencijom reverzibilnih terminatora - *Ion Personal Genome Machine* ili fluorescencijom nukleotida koji su obilježeni na γ -fosfatu (*phospholinked nucleotides*) - *PacBio*, te platforma *MinION* koja koristi tehnologiju nanosenzora. (Levy i Myers 2016).

U mikrobnjoj ekologiji različitih okoliša, uključujući i slatkovodne ekosustave, uz 454 pirosekvenciranje (Danza i sur. 2018, Zhao i sur. 2017) najčešće se koristi platforma *Illumina* (Wan i sur. 2017, Kurilkina i sur. 2016, Staley i sur. 2013) koja će u nastavku biti detaljno opisana jer je korištena u izradi ovog diplomskog rada.

1.6. Illumina platforma

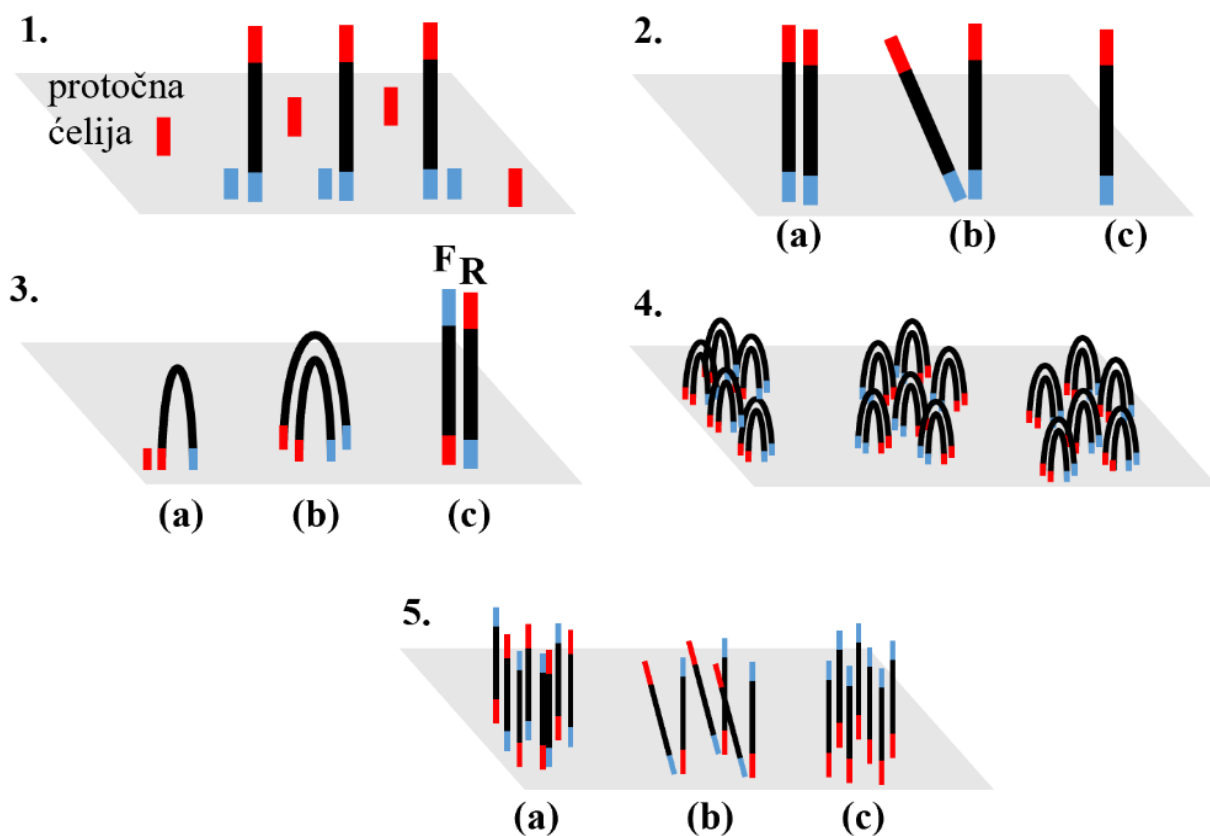
Illumina platforma se temelji na umnažanju fragmenata DNA i sekvenciranju sintezom (*sequencing by synthesis*, SBS). Metoda uključuje (1) pripremu knjižica (Slika 3) (2) amplifikacija/umnožavanje klastera (*bridge amplification*) (Slika 4), (3) sekvenciranje sintezom (Slika 5) (4) obradu podataka.

Priprema knjižica započinje fragmentacijom DNA. Sljedeći korak je ligacija adaptera na 5' i 3' kraju svakog fragmenta DNA. Adapteri su komplementarni oligonukleotidima koji su fiksiran na čvrstoj površini protočne ćelije (*flow cell*) (Slika 3) (Kchouk i sur. 2017).



Slika 3. Priprema knjižica .Glavni koraci su fragmentacijom DNA (1.) i ligacija adaptera (2.) koji omogućuju formiranje sekvencijske knjižice (3.) (napravljeno i prilagođeno prema Young i Gillung, 2019).

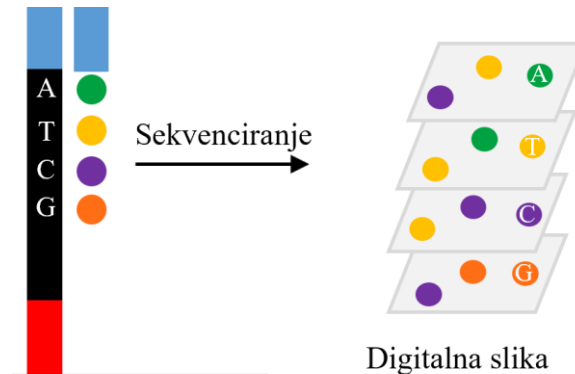
Nanošenjem knjižice na čvrstu površinu protočne ćelije, adapteri se vežu (*annealing*) uzvodne (*forward* (F)) ili nizvodne (*reverse* (R)) oligonukleotidne početnice. Nakon prvog ciklusa umnažanja, inicijalne molekule knjižice (*inicial library molecules*) se ispiru, a fragmentni pričvršćeni na protočne ćelije generiraju klonalne klastere od koji svaki sadrži tisuću kopija početne molekule DNA. Generiranje klastera provodi se *bridge amplification-om* odnosno dolazi do hibridizacije adaptera na komplementarne oligonukleotide početice pri čemu se formira struktura mosta (*bridge*). Posljednji korak je uklanjanje/cijepanje jednog lanca identičnih dvolančanih molekula DNA (*DNA double strand, dsDNA*) te dobivanje jednolančanih molekula DNA (*DNA single strand, ssDNA*) (Slika 4) (Kchouk i sur. 2017, Young i Gillung, 2019).



Slika 4. Umnožavanje klastera na protočnoj ćeliji. **(1.)** Nanošenje sekvencijske knjižice na čvrstu površinu protočne ćelije te vezanje adaptera na komplementarne oligonukleotidne početnice. **(2) a.** Sinteza nizvodnog (R) lanac DNA fragmenta, **b.** denaturacija dsDNA i **c.** ispiranje inicijalne molekule knjižica. **(3) a.** hibridizacije adaptera na slobodnu komplementarnu oligonukleotidnu početnicu, **b.** Sinteza komplementarnog DNA lanca pri čemu se formira struktura mosta (bridge) i **c.** denaturacija strukture mosta te formiranje dva ssDNA lanca. **(4)** ponavljanje procesa 1.-3. kojim se generiraju klonalni klasteri. **(5)** Nakon amplifikacije **(a)** dsDNA se denaturira, **(b)** nizvodni (R) lanci DNA se ispiru i **(c)** zaostaju samo uzvodnih (F) lanci (napravljeno i prilagođeno prema Young i Gillung, 2019).

Slijedi sekvenciranje sintezom (*sequencing by synthesis*, SBS) (Slika 5). U sekvenciranju se koriste reverzibilni terminacijski deoksiribonukleotidi (dNTP odnosno (A, C, T, G) dNTP). Nukleotidi su fluorescentno obilježeni jedinstvenom fluorescentnom molekulom (fluorofor) te su kemijski modificirani. Kemijska modifikacija gdje je 3'-OH skupina zamijenjena 3'-O α -azidometil skupinom omogućava ugradnju samo jedne baze po svakom ciklusu. U svakom ciklusu DNA polimeraza simultano ugrađuje četiri deoksiribonukleotida (dATPs, dTTPs, dGTPs, dCTPs). Nakon ugradnje jednog dNTP, slijedi pobuđivanje i detekcija fluorofora te se očitava signal (boja) na svakom klasteru. Slijedi uklanjanje azidne skupina, ostavljajući slobodnu 3'-OH skupinu te

uklanjanje fluoroforom na priloženom dNTP-u. S time je omogućena ugradnja sljedećeg dNTP na fragment DNA te započinje novi ciklus (Kchouk i sur. 2017, Lu i sur. 2016).



Slika 5. Sekvenciranje sintezom (sequencing by synthesis, SBS) (napravljeno i prilagođeno prema Lu i sur. 2016).

Nedostatak ove tehnologije je ograničena duljina očitanih sljedova zbog *dephasing* -a (pozadinski šum postaje prejak nakon određenog broja ciklusa te nije moguće očitati signal). Samim time, ukupna pogreška Illumina tehnologije je ~1%. Neovisno o tome, velika prednosti Illumine tehnologije je mogućnost sekvenciranja velike količine DNA u kratkom vremenu, relativno visoka preciznost sekvenciranja te niska cijena. Osim toga, Illuminina tehnologija na raspolaganju ima različite sustave koji se mogu prilagoditi ovisno o potrebama istraživanja (Kchouk i sur. 2017).

U ovom diplomskom radu korišten je MiSeq sustav koji koristi sekvenciranje uparenih krajeva (*paired-end sequencing*) te sekvencira 301 pb sa svakog kraja amplicona 16S rRNA. Tijekom obrade podataka dva očitavanja se spajaju na preklapajućim krajevima kako bi se dobila maksimalna dužina od oko 600 pb. U nekoliko ciklusa dobivaju se velike količine nukleotidnih sljedova koji se potom analiziraju (<https://www.illumina.com>).

Za obradu podataka koriste se bioinformatički računalni programi. Najpopularniji su QIIME (Caporaso i sur. 2010), MOTHUR (Kozich i sur. 2013) i UPARSE (Edgar 2013). Analiza podataka dobivenih *MiSeq* Illumina platformom sastoji se od (1) filtriranja očitavanja (reads) prema kvaliteti (Karst i sur. 2016), (2) uparivanja očitavanja te stvaranje jednog kontinuiranog slijeda gena 16S rRNA, (3) identifikacije i uklanjanja himeričnih (umjetnih) sljedova koji se sastoje od višestrukih različitih gena 16S rRNA (Quince i sur. 2011, Edgar 2013),

(4) grupiranja (*clustering*) OTU (operativna taksonomska jedinica, *Operational Taxonomic Unit*) na temelju sličnosti (veća ili jednaka 97%) (Janda i sur. 2007) (5) taksonomske klasifikacije OTU (Karst i sur. 2016), te (6) statistička analiza koja uključuje alfa i beta raznolikost te multivarijantnih analiza.

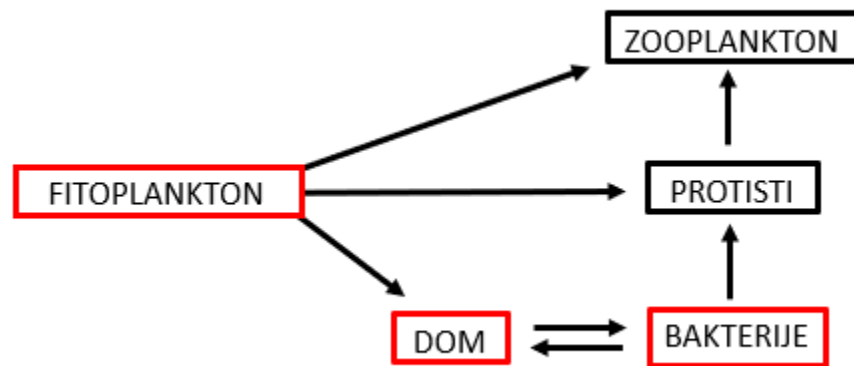
1.7. Uloga bakterijskih zajednica u biogeokemijskom ciklusu ugljika

Bakterijske zajednice slatkovodnih jezera su temeljna komponenta jezerskih ekosustava te imaju važnu ulogu u biogeokemijskom ciklusu ugljika (Newton i sur. 2011). Organski ugljik u vodenim ekosustavima važna je komponenta u biogeokemijskom ciklusu ugljika i hranidbenom lancu (Butman i Raymond 2011).

U slatkovodnim jezerima glavnina ukupnog organskog ugljika (*total organic carbon*, TOC) otpada na otopljeni organski ugljik (*dissolved organic carbon*, DOC) (Kortelainen i sur. 1999). Razlikujemo dva izvora organske tvari (a) autohtoni izvori koji imaju podrijetlo nastanka unutar samog jezerskog ekosustava te (b) alohtoni izvori koji imaju podrijetlo nastanka izvan jezerskog ekosustava (Yang i sur. 2016b). Autohtoni izvori nastaju primarnom proizvodnjom fitoplanktona i ostalih fotosintetskih organizama uključujući i cijanobakterije. Tim procesima nastaju polisaharidi i proteini koji su iznimno bioaktivni i pogodni za heterotrofnu razgradnju. Nadalje, alohtoni izvori su terestričkog (pedogenog i antropogenog) podrijetla te ulaze u površinske vode ispiranjem tla. Alohtona organska tvari sve se više oslobađa iz biomase algi ili makrofita zbog eutrofikacije i cvjetanja cijanobakterija što ima značajan utjecaj na kvalitetu i reaktivnost organske tvari u jezerima (Zhou i sur., 2018). Koncentracija i reaktivnost organske tvari u slatkovodnom ekosustavima ovisi o karakteristikama slivnog područja, godišnjim promjenama temperature i padalina te aktivnosti mikroorganizama (Kawasaki i sur. 2013).

Važnu ulogu u biogeokemijskom ciklusu ugljika imaju heterotrofni mikroorganizmi koji većinom pripadaju koljenima (*phylum*) u domeni Bacteria i Archaea (Rappé i Giovannoni 2003). Heterotrofne bakterije provode mineralizaciju i razgradnju otopljene organske tvari (*dissolved organic matter*, DOM) u vodenim ekosustavima (Amon i Benner 1996) te značajno utječu na sudbinu DOM-a u vodenim ekosustavima (Chróst 1990). Sastavni su dio mikrobne petlje (*microbial loop*) (Slika 6) u kojoj asimiliraju otopljenu organsku tvar (DOM) i pridonose sekundarnoj proizvodnji. Glavni koncept mikrobne petlje je da se energija oslobođena kao DOM vraća u glavni hranidbeni lanac, a glavne komponente su fitoplankton - DOM – heterotrofne bakterije – protisti – zooplankton (Azam i sur. 1983) (Slika 6). Fitoplankton oslobađa DOM kao

međuprodukt fotosinteze (Riemann i Søndergaard 1986). Oslobođeni DOM se koristi se za rast heterotrofnih bakterija, nakon čega slijedi predacija od protista (*grazing (protistan grazing)*) na bakterijama. Nadalje, protiste konzumira zooplankton (Kawabata i Nakanishi 1996). Interakcija između fitoplanktona i heterotrofnih bakterija rezultira učinkovitom remineralizacijom fotosintetizirane organske tvari stvarajući CO₂ i anorganske hranjive tvari. Ovi se remineralizirani spojevi mogu ponovno upotrijebiti u svrhe fotosinteze ako su zadovoljeni potrebni uvjeti, a time heterotrofne bakterije održavaju ciklus ugljika. (Azam i sur. 1983).



Slika 6. Koncept mikrobne petlje (microbial loop). Odnos fitoplanktona i heterotrofnih bakterija () (napravljeno i prilagođeno prema Azam i sur. 1983 i Okuda i sur. 2014)

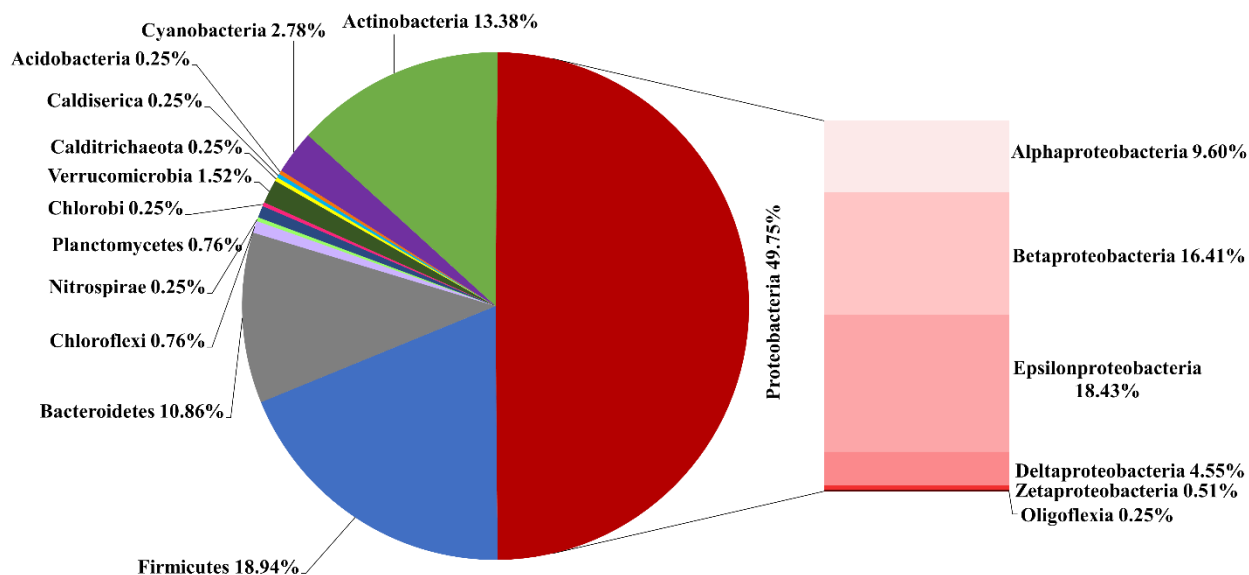
Razumijevanje međusobne interakcije fitoplanktona i heterotrofnih bakterija od iznimne je važnosti kako bi se predvidio protok energije i organske tvari kroz slatkovodne ekosustave (Amon i Benner 1996). Utjecaj i važnost heterotrofnih mikroorganizama za protok organske tvari i energije u oligotrofnim (niska produkcija) ekosustavima viši je nego u eutrofičnim (visoka produkcija) ekosustavima. Za razliku od eutorfnih, oligotrofni ekosustavi imaju nisku koncentraciju hranjivih tvari, s visokim udjelima otopljenih hranjivih tvari u organskom obliku što favorizira heterotrofe u odnosu na fitoplanktone. Uz to, interakcije između autotrofa i heterotrofa usko su povezane, jer su dominantni heterotrofi slične veličine i brzine rasta kao dominantni autotrofi (Cotner i Biddanda, 2002).

1.8. Bakterijske zajednice slatkovodnih jezera

Bakterijske zajednice slatkovodnih jezera razlikuju se obzirom na trofički status jezera i geografski položaj (Gilbert i sur. 2012). Osim toga, na zajednice bakterija mogu utjecati razni fizikalno - kemijski parametri vode uključujući pH, temperaturu (Lindström, Kamst-Van Agterveld

i Zwart, 2005, Yannarell i Triplett, 2005) organsku tvar (Logue i sur. 2012), dušik i fosfor (Nakatsu i sur. 2019). Uz to, na bakterijske zajednice utječe i biomasa drugih planktonskih skupina (Lindstrom 2000, Muylaert i sur. 2002), primarna produktivnost (Horner-Devine i sur. 2003) te interakcije hranidbene mreže (Kent i sur. 2006, Smith 2007). S obzirom na različite okolišne uvjete unutar samog jezera razlikujemo bakterijske zajednice koje su jedinstvene za staništa jezerskog sedimenta i vode (Yang i sur. 2013). U usporedbi sa jezerskim sedimentnim, vodena staništa imaju nižu bioraznolikost bakterijskih taksi zbog manje heterogenosti staništa (Chao i sur. 2006).

Globalno rasprostranjene zajednice bakterija u slatkovodnim jezerima uglavnom se sastoje od koljena (*phyla*): **Actinobacteria** (*Nocardioidea*, *Rhodoluna*, *Sphingobium*), **Bacteroidota** (*Algoriphagus*, *Chryseobacterium*, *Cloacibacterium*, *Flavobacterium*, *Hymenobacter*, *Mucilaginibacter*, *Pedobacter*), **Proteobacteria** (*Acidocella*, *Chitinivorax*, *Dexia*, *Desulfovibrio*, *Ferribacterium*, *Formosimonas*, *Kinneretia*, *Labrys*, *Lacibacterium*, *Limnobacter*, *Limnohabitans*, *Lysobacter*, *Mizugakiibacter*, *Polynucleobacter*, *Rheinheimera*, *Rhodoligotrophos*, *Roseomonas*, *Sandarakinorhabdus*, *Sphingomonas*, *Sulfuricella*, *Sulfurirhabdus*, *Sulfurisoma*, *Sulfuritalea*, *Thiobaca*, *Tolumonas*, *Undibacterium*), **Cyanobacteria** (*Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Synechococcus*, *Cyanothece*) i **Verrucomicrobiota** (Slika 7) (Newman i sur. 2011, Yadav i sur. 2019).



Slika 7. Globalno rasprostranjene zajednice bakterija u slatkovodnim jezerima (napravljeno i prilagođeno prema Yadav i sur. 2019)

Koljeno *Actinobacteria* je najrasprostranjenije u slatkovodnim jezerskim ekosustavima (Newton i sur. 2011, Salcher i sur. 2013). Ovo koljeno se sastoji od gram-pozitivnih bakterija koje imaju pigment rhodopsin. To su planktonski prokarioti koji mogu biti fototrofi ili heterotrofi. Koljeno *Actinobacteria* podijeljeno je u devet široko definiranih kladova - acI, acTH1, acSTL, Luna1, acIII, Luna3, acTH2, acIV, and acV. Kladovi acI i acIV su dominantni, a klad acI ima kozmopolitsku distribuciju u epilimniju slatkovodnih jezera (Newton i sur. 2011). Određene karakteristike koljena *Actinobacteria* poput mogućnosti fotosinteze, pigment rhodopsina te rezistencija na UV omogućavaju njihovu dominaciju u slatkovodnim jezerima (Sharma i sur. 2008, Warnecke 2005).

Bakterije koljena *Bacteroidota* su gram-negativni bacili. To su kemoorganotrofne bakterije s fototrofnom sposobnošću (Newton i sur. 2011). Pronalazimo ih u epilimniju slatkovodnih jezera gdje imaju ulogu u razgradnji složenih biopolimera (Kirchman, 2002). Uz to, zabilježena je i jaka korelacija bakterija ovog koljena s DOC-om (Eiler, i sur. 2003) Za razliku od ostalih rasprostranjenih koljena, *Bacteroidota* nemaju sezonski obrazac pojavljivanja. Pretpostavlja se da je to povezano s njihovom potrebom za visokim koncentracijama DOC-a. Uz to, povezanost koljena *Bacteroidota* i *grazing pressure* upućuje na njihovu ulogu u slatkovodnim jezerima (Newman i sur. 2011).

Koljeno *Proteobacteria* je drugo najrasprostranjenije u slatkovodnim jezerskim ekosustavima. Bakterije ovog koljena su gram-negative sa šest različitih razreda: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, i *Zetaproteobacteria*. Razred *Alphaproteobacteria* je pronađen u gotovo svim staništima te poakzuje veliku plastičnost genoma zbog svojeg načina života. Imaju glavnu ulogu u biogeokemijskom ciklusu dušika jer simbiotski članovi koljena olakšavaju fiksaciju dušika u biljkama. Rezistentne su na *grazing* te su dominantne kada je koncentracija hranjivih tvari niska. Razred *Betaproteobacteria* su prisutne u jezerima koji imaju visoku koncentraciju hranjivih tvari koje im omogućavaju brzi rast. Bakterije ovog koljena su heterotrofi koji su najrasprostranjeniji u gornjim slojevima slatkovodnih jezera. Razredu *Gammaproteobacteria* pripada vrsta *Escherichia coli*. Prisutna je u slatkovodnim jezerima, ali se smatra privremenim članom zajednice s obzirom da potječe iz antropogenih izvora te se najčešće ne identificiraju pomoću gena za 16s RNA.

Koljeno *Cyanobacteria* su fotoautotrofnih organizmi s mogućnosti oksidativne fotosinteze koristeći klorofil, a i skup fikobilina. S obzirom na građu talusa cijanobakterije mogu biti

jednostanične, kolonijalne ili višestanične (Newton i sur. 2011). Cijanobakterije imaju ulogu u kruženju hranjivih tvari u slatkovodnim jezerskim ekosustavima jer fiksiraju dušik. Neke vrste cijanobakterija sadrže posebne stanice čija je uloga isključivo fiksiranje dušika (heterociste). U plitkim eutrofnim jezerima porast temperature i koncentracije hranjivih tvari pozitivno koreliraju s rastom cijanobakterija (O'neil i sur. 2012). U dubokim mezotrofnim i oligotrofnim jezerima, temperaturna stratifikacija onemogućuje protok hranjivih tvari te negativno korelira s rastom cijanobakterija (Anneville, i sur 2015).

Koljeno *Verrucomicrobiota* – vrste ovog koljena identificirane su u jezerima, tlu, oceanima. Pripadnici koljena *Verrucomicrobiota* nisu iznimno rasprostranjene u jezerima te se malo zna o njihovoj ekološkoj ulozi u okolišu (Newton i sur. 2011).

1.9. Bakterijske zajednice Nacionalnog parka Plitvička jezera

Karakterizacija i struktura bakterijskih zajednica u NP Plitvička jezera slabo je istražena. Opisane su indikatorske bakterije fekalne kontaminacije (fekalni koliformi (FC), fekalni streptokoki (FS), *Pseudomonas aeruginosa* (PS) i *Clostridium perfringens* (CP)). Mjesto uzorkovanja Bijela rijeka ispod sela imalo je najviše vrijednosti određenih indikatorskih bakterija fekalne kontaminacije što ukazuje na Plitvički Ljeskovac kao glavni izvor fekalnog zagađenja. Postojale su sezonske razlike u TC i FC. Na mjestu uzorkovanja ušća rijeke Matice u Prošćanskom jezeru uočena je povećana gustoća TC i FC bakterija u usporedbi s drugim nalazištima i dubinama, vjerojatno zbog utjecaja izvorišta i uvjeta raslojavanja (Vurnek i sur. 2016).

Nadalje, opisane su bakterijske zajednice Prošćanskog jezera. Koljeno *Actinobacteria* nije bilo dominantno. Porodice *Comamonadaceae* i *Burkholderiaceae* (razred *Betaproteobacteria*) javljale su se u sličnim frekvencijama. Zabilježeni su snažni pomaci u dominirajućim članovima zajednice što upućuje na manje stabilnu mikrobnu strukturu zajednice (Pjevac i sur. 2018).

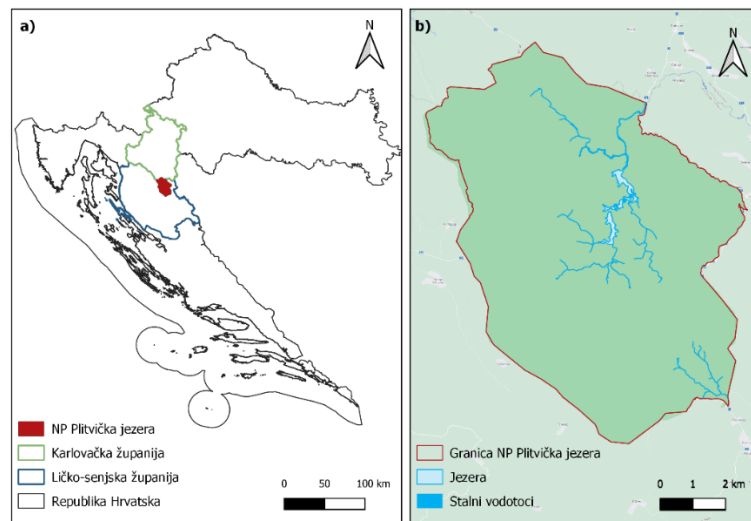
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Molekularna karakterizacija bakterioplanktonskih zajednica te utjecaj okolišnih čimbenika na sastav bakterioplanktonske zajednice u zimskom razdoblju do sada nije istražena na području Plitvičkih jezera. Stoga su ciljevi ovog diplomskog rada, primjenom metode sekvenciranja nove generacije na Illumina MiSeq platformi:

- (1) opisati strukturu, raznolikost i brojnost bakterioplanktonskih zajednica s prostornom dinamikom u Plitvičkim jezerima u zimskom razdoblju,
- (2) istražiti utjecaj fizikalno-kemijskih čimbenika na promjene u strukturi i brojnosti bakterioplanktonskih zajednica u zimskom razdoblju, u Plitvičkim jezerima.

3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Nacionalni park Plitvička jezera smješten je u gorskoj Hrvatskoj između planinskog lanca Male Kapele i Ličke Plješivice (Slika 8) (Stilinović i Božičević, 1998). Prema Köppenovoj klasifikaciji u Parku prevladava umjereno topla vlažna klima s toplim ljetom (klimatski podtip Cfb). Područja Parka iznad 1200 m n/v prema Köppenovoj klasifikaciji imaju vlažnu snježno-šumsku klimu (klimatski podtip Df) (Šegota i Filipčić 2003). Područje Parka dio je Dinarskog krškog područja sa specifičnim geološkim, geomorfološkim i hidrološkim karakteristikama (Riđanović i Božičević 1996, Stilinović i Božičević, 1998, Meaški i sur. 2016).

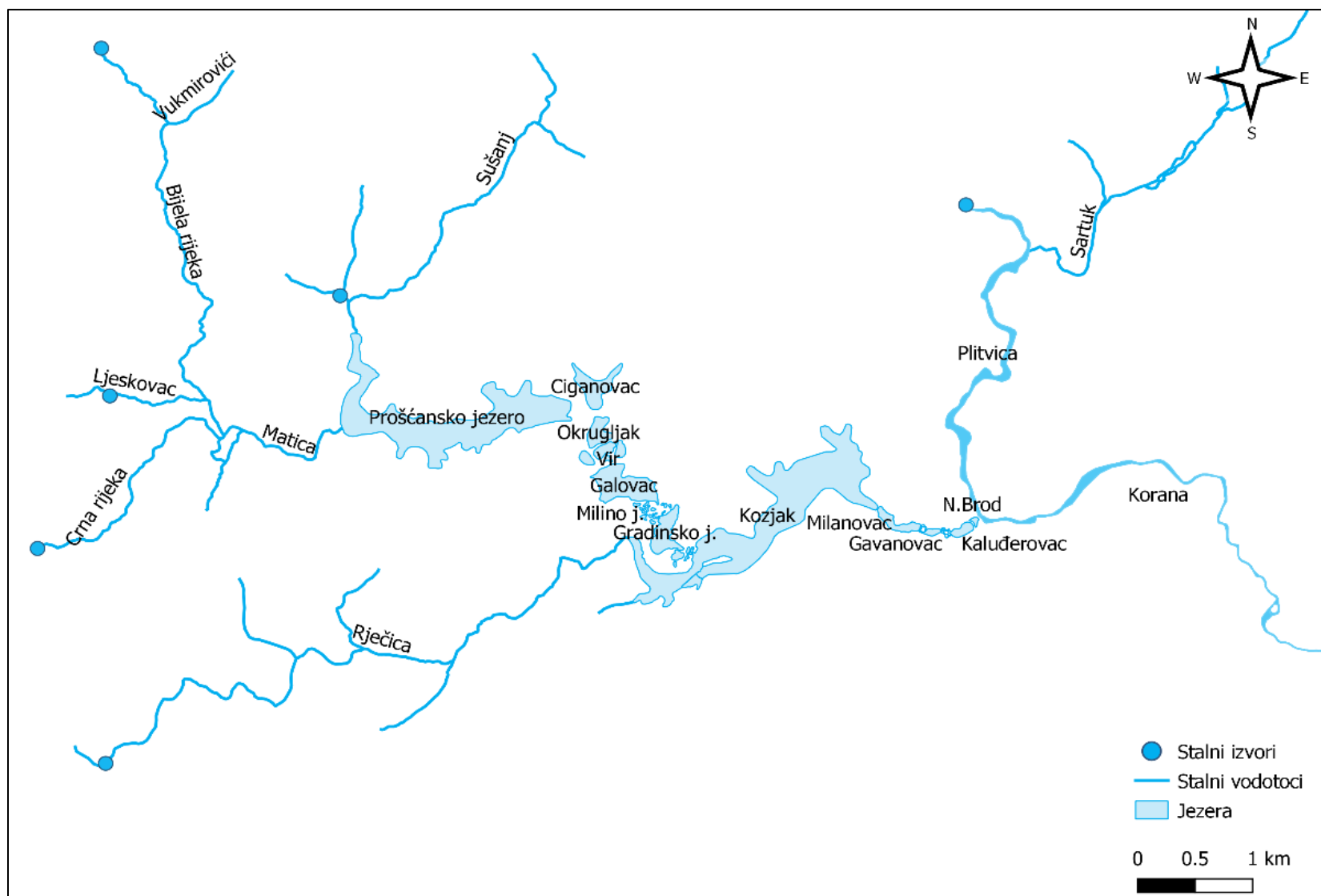


Slika 8. Geografski položaj (a) i administrativna granica (b) Nacionalnog Parka Plitvička jezera (napravljeno prema topografskoj karti, izdanje DGU, izvorno mjerilo 1:25000 HTRS96/TM.(www.geoportal.hr)).

Na osnovu fiziografskih karakteristika Plitvička jezera pripadaju krškim baražnim jezerima kaskadnog tipa. U hidrosustav Plitvičkih jezera uključene su 64 stajačice od čega 16 većih jezera. Kaskadni jezerski sustav od šesnaest većih i manjih oligotrofnih jezera nastao je biodinamičkim, neprekinutim procesom stvaranja sedri (Stilinović i Božičević, 1998).

Jezerski sustav podijeljen je na Gornja te Donja jezera (Slika 9). Gornja jezera čini dvanaest jezera koja su formirana na dolomitnim stijenama trijasko starosti stoga su prostranija te razvedenijih i blaže nagnutih obala. Gornja jezera obuhvaćaju Prošćansko jezero, Ciginovac, Batinovac, Okrugljak, Veliko jezero, Malo jezero, Vir, Galovac, Milino jezero, Gradinsko jezero, Veliki Burget i jezero Kozjak. Donja jezera formirana su kanjonskim urezivanjem u vapnenačke naslage kredne starosti. Obale su im ravne i strme te su površinom znatno manja od Gornjih. Sustav Donjih jezera čine četiri jezera Milanovac, Gavanovac, Kaluđerovac i Novakovića brod.

Osim samih jezera, sustavu Plitvičkih jezera pripada i niz rijeka, potoka i izvora (Slika 9). Najznačajniji krški izvori koji formiraju površinske tokove su izvori Crne rijeke i Bijele rijeke. Tokovi Crne rijeke i Bijele rijeke spajaju se u mjestu Plitvički Ljeskovac i formiraju vodotok Maticu. Vodotok Matica se ulijeva u Prošćansko jezero. U Prošćansko jezero ulijeva se manji vodotok Sušanj na području Liman drage. Voda se iz Prošćanskog jezera prelijeva preko Labudovačke barijere u sustav Gornjih jezera sve do slapova Burgeta preko kojih se ulijeva u jezero Kozjak. Osim vode iz sustava Gornjih jezera, u jezero Kozjak ulijeva se izravno voda vodotoka Rječica te nekoliko manjih povremenih vodotoka. Preko izlazne barijere Kozjačkih mostova voda se ulijeva u sustav Donjih jezera sve do jezera Novakovića broda (Riđanović i Božičević 1996). Vodotok Plitvica, kojem je najznačajniji pritek, potok Sartuk, prelijeva se niz liticu formirajući Veliki slap. Vode iz vodotoka Plitvice i jezerskog sustava Plitvičkih jezera spajaju u depresiju Sastavci, što je ujedno i izvorišno područje rijeke Korane koja se kod Karlovca ulijeva u Kupu (Meaški i sur. 2016).



Slika 9. Šesnaest plitvičkih jezera i glavni pritoci (napravljeno prema Meaški i sur. 2016 te prema topografskoj karti, izdanje DGU, izvorno mjerilo 1:25000 HTRS96/TM.(www.geoportal.hr))

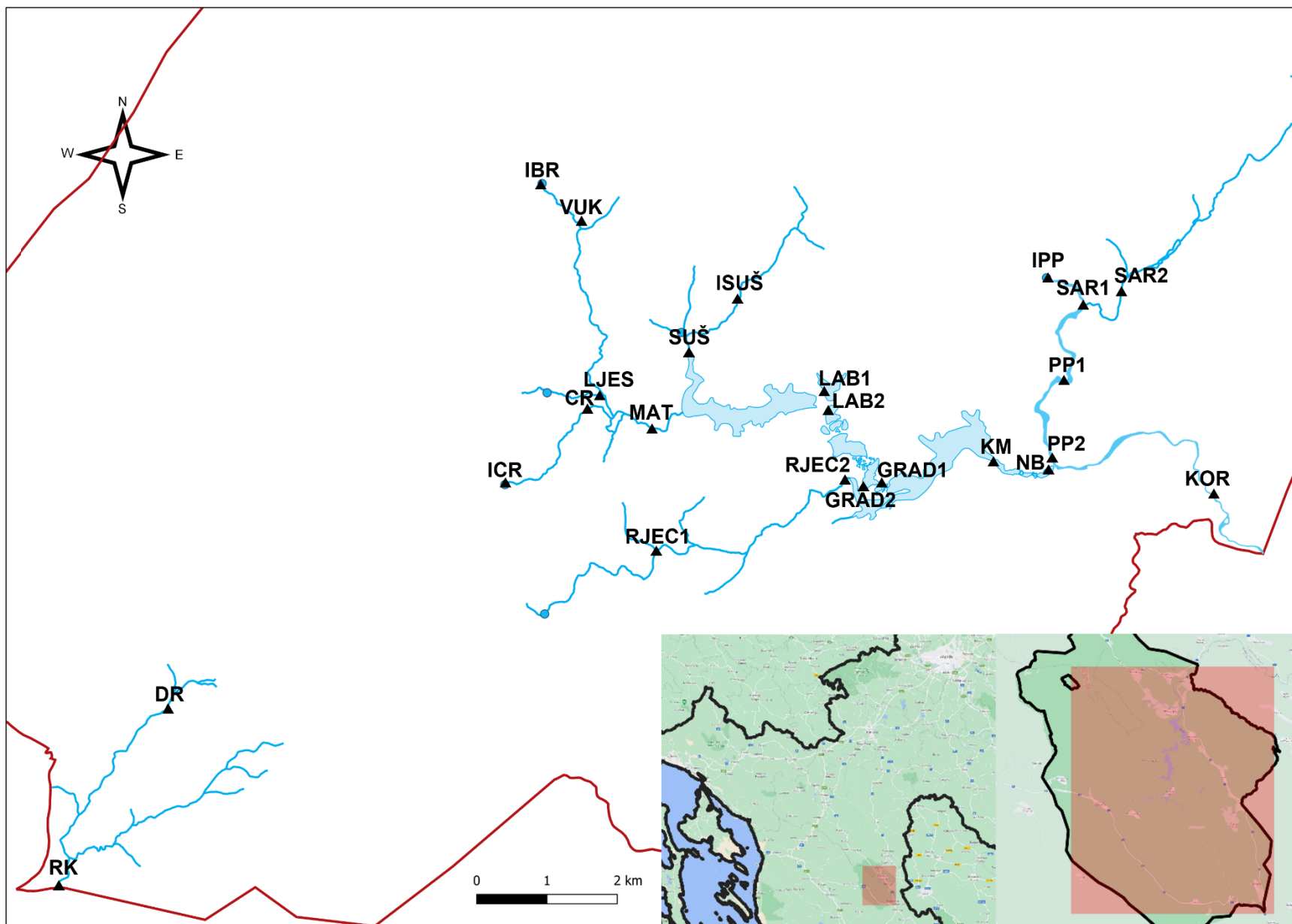
4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je provedeno na 24 različitih lokacija u Nacionalnom parku Plitvička jezera 25. veljače 2020. (Slika 10) standardnim postupkom uzimanja uzoraka pomoću crpca (KC Denmark A/C). Uzorkovanje je obavljeno od strane djelatnika Instituta Ruđer Bošković.

Tablica 1. Geografskog položaj i opis lokacija uzorkovanja u Nacionalnom parku Plitvička jezera.

Lokacija	Oznaka uzorka	Geografski položaj		Opis lokacije uzorkovanja
Plitvica	IPP	44°54'05.3"N	15°34'26.5"E	izvor Plitvica
	PP1	44°54'13.8"N	15°35'36.9"E	kod Hajdukovića mlina
	PP2	44°54'08.4"N	15°36'30.0"E	kod Velikog slapa
Sartuk	SAR	44°54'40.9"N	15°34'35.1"E	kod limnigrafa
	SAR1	44°54'22.6"N	15°34'44.8"E	prije utoka u Plitvicu, kod Karabaje
Korana	KOR	44°55'26.6"N	15°36'53.1"E	kod limnigrafa
Bijela rijeka	IBR	44°49'59.6"N	15°33'26.7"E	izvor Bijele rijeke
Vukomirovići	VUK	44°50'19.4"N	15°33'52.9"E	prije utoka u Bijelu rijeku
Ljeskovac	LJES	44°50'29.4"N	15°35'49.6"E	prije utoka u Bijelu rijeku
Crna rijeka	ICR	44°49'43.9"N	15°36'50.3"E	izvor Crne rijeke
	CR	44°50'23.2"N	15°36'00.0"E	kod limnigrafa
Matica	MAT	44°50'54.7"N	15°36'11.3"E	kod limnigrafa
Sušanj	ISUŠ	44°51'35.2"N	15°34'43.9"E	najuzvodniji dio izvora Sušanj
	SUŠ	44°51'12.1"N	15°35'20.8"E	prije utoka u Proščansko jezero
Ciganovac	LAB1	44°52'17.6"N	15°35'46.5"E	kanal uz jezero Ciginovac na Labudovačkoj barijeri
Okrugljak	LAB2	44°52'19.8"N	15°35'57.1"E	kanal iznad Labudovačkog slapa
Gradinsko jezero	GRAD1	44°52'45.7"N	15°36'48.3"E	izlazna barijera Gradinskog jezera (lijeva strana)
	GRAD2	44°52'37.1"N	15°36'48.9"E	desna obala Gradinskog jezera; nekadašnja pokusna ploha uklanjanja makrovegetacije
Rječica	RJEC1	44°50'57.4"N	15°37'34.5"E	kod mosta u Mirić Štropini
	RJEC2	44°52'28.4"N	15°36'45.5"E	kod mosta prije utoka u Kozjak
Kozjak	KM	44°53'39.9"N	15°36'32.9"E	lijevi odvodni kanal na Kozjačkim mostovima
Novaković Brod	NB	44°54'06.6"N	15°36'36.3"E	ulazna barijera u Novaković Brod jezero, lijeva obala uz mostić
Korenička rijeka	RK	44°46'09.7"N	15°41'27.7"E	poslije mosta preko DC1
	DR	44°47'01.8"N	15°39'25.4"E	potok ispod naselja Drakulić Rijeka



Slika 10. Karta lokacija uzorkovanja u Nacionalnom Parku Plitvička jezera.

4.2. Fizikalno – kemijska analiza vode

Mjerenja fizikalno–kemijskih parametra vode provedena su *in situ* neposredno prije uzorkovanja bakterioplanktona. Temperatura ($T / ^\circ\text{C}$), otopljeni kisik (ODO/ (mg/L)), pH , salinitet (PSU) i konduktivitet ($\mu\text{S}/\text{cm}$) mjereni su multiparametarskom sondom.

Koncentracije otopljenog anorganskog ugljika (*dissolved inorganic carbon*, DIC) i DOC-a su određene metodom katalitičke oksidacije ugljika pri visokoj temperaturi (*High-Temperature Catalytic Oxidation*, HTCO) koristeći analizator ukupnog organskog ugljika (*Total Organic Carbon*, TOC) TOC-VCPH-5000 (Shimadzu, Japan) .

Otopljeni anioni klorida, sulfata, nitrata (Cl^- / mM , $\text{SO}_4^{2-} / \text{mM}$, $\text{NO}_3^- / \text{mM}$) i kationi kalcija, magnezija i natrija ($\text{Ca}^{2+} / \text{mM}$, $\text{Mg}^{2+} / \text{mM}$, Na^+ / mM) u vodi određeni su metodom ionske kromatografije prema HRN EN ISO 10304 -1:2009 odnosno prema HRN EN ISO 14911:2001 Metoda je postavljena na instrumentu za ionsku kromatografiju ICS1000 i ICS1100 (Dionex), a detekcija je rađena uz konduktometrijski detektor sa supresijom. Fizikalno – kemijska analiza vode provedena je od strane djelatnika Instituta Ruđer Bošković.

Fizikalno kemijski parametri vode koji se nisu mogli izmjeriti, procijenjeni su koristeći FSC (*fully conditional specification*) metodu koja se temelji na multinominalnoj distribuciji. Za procjenu vrijednosti korišten je programski paket programa R „*mice*“ (van Buuren i Groothuis-Oudshoorn 2011).

4.3. Izolacija DNA

Uzorci vode (2L) filtrirani su kroz *nucleopore* polikarbonatni filtar (Whatman, UK) veličine pore 0,2 μm koristeći peristaltičku crpku. Filtri su pohranjeni u tubice na -80°C .

Za izolaciju DNA bakterija korišten je komercijalni set reagensa *DNeasy[®] PowerWater[®] kit* (Qiagen). Postupak izolacije DNA proveden je prema uputama proizvođača.

Sterilnom pincetom polovica filtra prebačena je u tubicu (*PowerWater DNA Bead Tube*) te je dodan 1 mL otopine *PWI*. Uzorak je inkubiran na 65°C tijekom 10 minuta na uređaju SWB:D (*digital water bath*, Stuart). Nakon inkubacije, uzorak je promiješan na vrtložnoj miješalici (*vortex*) 10 minuta te centrifugiran 1 minutu na $\geq 4000 \times g$.

U sljedećem koraku, supernatant je prebačen u mikroeprevetu (*Collection Tube*) te je centrifugiran 1 minutu na $\geq 6500 \times g$.

Supernatant je izdvojen u novu mikroepripruvenu te je dodano 200 μL otopine *IRS*. Uzorak je promiješan na vrtložnoj miješalici 10 sekundi kako bi se homogenizirao. Uzorak je inkubiran na 4°C tijekom 5 minuta. Nakon inkubacije, provedena je centrifugira uzorka 1 minutu na 13 000 x g

Nadalje, supernatant je izdvojen u novu mikroepripruvenu te je dodano 650 μL otopine *PW3*. Uzorak promiješan na vrtložnoj miješalici 10 sekundi kako bi se homogenizirao. Dodatkom *PW3* otopine uzorak je pripremljen za vezanje DNA na kolonicu sa silikatnom gel membranom (*MB Spin Column*).

Supernatant je prebačen u kolonicu koja je prethodno uklopljena u mikroepripruvenu i centrifugiran 1 minutu na 13 000 x g. Dobiveni filtrat je odbačen. Korak je ponovljen sve dok sav volumen supernatanta nije bio obrađen.

Nakon toga je kolonica prebačena u novu mikroepripruvenu te je isprana s 650 μL otopine *PW*. Uzorak je centrifugiran 1 minutu na 13 000 x g.

U kolonicu je dodano 650 μL etanola te je uzorak promiješan na vrtložnoj miješalici 10sekundi. Uzorak je centrifugiran 1 minutu na 13 000 x g. Dobiveni filtrat je odbačen te je provedena centrifuga 2 minute na 13 000 x g.

Nakon toga je kolonica prebačena u novu mikroepripruvenu te je dodano 45 μL *DNase/RNase-Free Distilled Water*. Uzorak je centrifugiran 1 minutu na 13 000 x g. Kolonica je odbačena.

Izolirana genomska DNA pohranjena je na -20 °C.

4.4. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Koncentracija i kvaliteta izolirane genomske DNA određena je spektrofotometrijski koristeći *NanoDrop™ 2000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Mjerena je apsorbancija DNA pri valnim duljinama od 260nm (apsorpcijski maksimum nukleinskih kiselina) i 280nm (apsorpcija aromatskih aminokiselina proteina i peptida, te svih spojeva s aromatskim prstenom). Uzorak izolirane DNA uzorka služio DNA je zadovoljavajuće čistoće ako je omjer A_{260}/A_{280} oko 1,8 (*NanoDrop-2000-User-Manual-EN*).

4.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Amplifikacija gena 16S rDNA provedena je metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Lančana reakcija polimerazom je biokemijska metoda s ciljem amplifikacije (višestrukog umnožavanja) određenih regija ili regije DNA *in vitro*. Kroz nekoliko ciklusa generiraju se milijuni

istovjetnih kopija određene sekvence/regije DNA koje su točno određene početnicama (Baker i sur. 2003).

Lančana reakcija polimeraze sastoji se od tri koraka ponovljena u 25-35 ciklusa. Amplifikacijski ciklus započinje inicijalnim korakom aktivacije polimeraze na temperaturi od 94 °C – 96 °C. Prvi korak je denaturacija dvolančane DNA (*DNA double strand, dsDNA*) u jednolačanu DNA (*DNA single strand, ssDNA*). Drugi korak je vezanje (*annealing*) uzvodne ili nizvodne oligonukleotide početnica na komplementarni lanac ssDNA pri temperaturi od 55 °C. Treći korak je elongacija odnosno termostabilna DNA polimeraza (*Taq polymerase*) katalizira produljenje vezanih početnica duž lanaca ssDNA pri čemu se sintetiziraju dvije molekule dsDNA na temperaturi 72 °C.

Za amplifikaciju V3- V4 hipervarijabilne regije 16S rRNA gena korišten je 515F/806R par oligonukleotidnih početnica (Tablica 2) (Caporaso i sur. 2011). Reakcijska smjesa konačnog volumena (25.00µL) sadržavala je 13.00µL sterilne H₂O, 10.0µL Master Mix-a , 0.5 µL početnice 515F, 0.5 µL početnice 806R te 1.0µL molekule DNA. PCR reakcija provedena je u 30 ciklusa prema uvjetima navedenima u tablici 3.

Tablica 2. Nukleotidni slijed početnica korištenih za umnažanje hipervarijabilne V3-4 16S rRNA regije.

Regija	Početnica	Sekvenca 5'-3'	Veličina [pb]
V3-4 16S rRNA	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	250pb*2
	806R	GGACTACHVHHHTWTCTAAT	(~468 pb)

Tablica 3 Uvjeti pri kojima je provedena lančana reakcija polimeraze (PCR).

	Temperatura (°C)	Vrijeme
Aktivacija polimeraze	94 °C	3 min
Denaturacija	94 °C	45 sec
Vezanje početnica	50 °C	60 sec
Elongacija	72 °C	90 sec
Završno produženje	72 °C	10 min

4.6. Elektroforeza na agaroznom gelu

Uspješnost amplifikacije 16S rDNA provjerena je metodom elektroforeze na agaroznom gelu. Elektroforeza na agaroznom gelu metoda je razdvajanja i vizualizacije DNA fragmenata

veličine od 100 do 25 000pb. Linearni fragmenti DNA razdvajaju se na temelju razlike u molekularnoj masi korištenjem vanjskog električnog polja. Agarozni gel služi kao molekularno sito kojim se osigurava da se veće molekule gibaju sporije (Lee i sur. 2012).

Agarozni gel (1% w/V agaroz) pripremljen je otapanjem 1g agaroze u 100mL pufera TAE ($c(\text{Tris}) = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$, titrirana očetnom kiselinom do pH= 8,0). Prije nanošenja na gel, za vizualizaciju pod UV svjetlom dodano je 10 μL fluorescirajuće boje SYBR Safe na 100 mL gela. Elektroforeza je napravljena u puferu TAE pri naponu od 100 V na sobnoj temperaturi koristeći uređaj za elektroforezu. Kao standard veličine korišten je. Koristeći UV transiluminator promotreni su rezultati nakon 50-60 min.

4.7. Metoda sekvenciranja nove generacije pri analizi bakterijskih zajednica

Uzorci DNA za analizu ukupnih bakterijskih zajednica sekvencirani su metodom visoke propusnosti na Illumina MiSeq platformi u Beču (*University of Vienna, Centre for Microbiology and Environmental Systems Science*).

Bioinformatička obrada podataka provedena je na Institutu Ruđer Bošković. Provjera kvalitete dobivenih sekvenci provedena je u FastQC programu. Obrada sekvenci provedena je sravnavanjem dobivenih fragmenata korištenjem QIIME pipeline programa (Caporaso i sur. 2010). Sljedovi svakog uzorka su grupirani u OTU sa minimalnom pokrivenošću od 97% i minimalnom identičnošću od 97% korištenjem R paketa verzija 4.0.0 (R Core Team, 2020). Reprezentativni nukleotidni slijed za svaki OTU je identificiran pomoću baze podataka GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) pomoću algoritma BLAST (eng. Basic Local Alignment Search Tool).

4.8. Statistička analiza podataka

Statistička analiza provedena je korištenjem R programa verzija 4.0.4 (R Core Team, 2020). Analize su provedene samo za dominantne taksonomske razine, odnosno one čiji je udio u barem jednom uzorku bio $>1\%$. Multivarijantnom analizom glavnih komponenata (*principal component analysis*, PCA) analizirani su fizikalno – kemijski čimbenici. PCA je određena koristeći funkciju „*prcomp*“ unutar paketa „*vegan*“, a vizualizacija je provedena koristeći paket „*factoextra*“.

Bogatstvo OTU-a, Chao1 i ACE procjenitelji; Simpson i Shannon indeksi raznolikosti; te pokrivenost (*Coverage*) izračunati su za procjenu bogatstva vrsta unutar pojedino uzorka odnosno

alfa raznolikosti. Provedena je jednosmjerna analiza varijance (*One-Way Analysis of Variance*, ANOVA) kako bi se provjerila postoji li statistička značajnost između alfa raznolikosti i uzorkovanih lokacija (paket „*vegan*“). Beta raznolikost bakterijske zajednice određena je na temelju matrica udaljenosti koristeći *Bray-Curtis dissimilarity distance*. Beta raznolikost je vizualizirana analizom glavnih koordinata (*principal coordinates analysis*, PCoA). Grupiranje uzoraka provedeno je hijerarhijskom analizom klastera koristeći *Ward* – ovu metodu minimalne varijance koristeći *Bray-Curtis dissimilarity distance*. Kako bi se provjerilo postoje li značajne razlike između grupiranih klastera provedena je permutacijska analiza varijance (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*, PERMANOVA) na taksonomskoj razini OTU-a i porodice.

Spearman-ovim testom korelacije određen je stupanj ovisnosti između okolišnih čimbenička i bakterijskih zajednica na taksonomskoj razini koljena i porodice. *Spearman*-ov test korelacije određen je koristeći funkciju „*rcorr*” unutar paketa „*Hmisc*”. FDR (*false discovery rate*) algoritmom korigirana je *p* vrijednost. Vizualizacija korelacijske matrice provedena je koristeći paket „*ggplot2*“. Kanoničkom analizom korespondencije (*Canonical Correspondence Analysis*, CCA) utvrđen je utjecaj okolišnih parametara na strukturu bakterijske zajednice. Funkcija „*envft*“ unutar paketa "*vegan*" primijenjen je na rezultate analize CCA. Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se ustvrdila statistička značajnost pojedinog okolišnog parametra (paket „*vegan*“).

5. REZULTATI

5.1. Fizikalno – kemijska analiza vode

U Tablici 4 prikazani su rezultati mjerenja fizikalno-kemijskih parametara vode na lokacijama u Nacionalnom parku Plitvička jezera. Prosječne, maksimalne i minimalne vrijednosti kao i standardna devijacija pojedinog fizikalnog - kemijskog parametra prikazana je u Prilogu 1.

Udio parametara koji se nije mogao izmjeriti iznosio je 29.20 %. Salinitet i koncentracija otopljenog kisika imale su najviši postotak nemogućnosti mjerenja (20.80 %) odnosno u osam uzoraka nisu izmjereni. Uz to, konduktivitet, salinitet i temperatura nisu izmjereni u uzorku GRAD1, dok DIC i DOC nisu izmjereni u uzorku GRAD2. Vrijednosti koje su procijenjene koristeći programski paket „*mice*“ prikazane su u Tablici 1 s oznakom *.

U istraživanom području konduktivitet je izmjeren u rasponu od 203.06 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Korana, KOR) do 511,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$. (Rječica, RJEC2). Na svim postajama zabilježene su relativno visoke koncentracije otopljenog kisika (ODO) s prosječnom vrijednosti 11.05 mg/L. Osim u uzorku ISUŠ (Sušanj) gdje je koncentracija otopljenog kisika iznosila 9.33 mg/L. Niske vrijednosti saliniteta zabilježene su u svim uzorcima. Najniži salinitet izmjeren je u rijeci Korani (KOR) s vrijednošću od 0.15PSU. Prosječna vrijednost saliniteta iznosila je 0.22PSU. Uzorkovana voda blago je alkalna (pH 7.52- 8.57). Najniža pH vrijednost izmjerena je u Koreničkoj rijeci (DR) te na izvoru Crne rijeke (ICR) (pH 7.52). Na svim lokacijama izmjerene su relativno niske temperature vode. U jezerima Novaković Brod i Kozjak izmjerena je najniža temperatura koja je iznosila 5.10 °C. Najviša temperatura izmjerena je u uzorku DK odnosno u Koreničkoj rijeci (8.37 °C).

Vrijednosti DIC – a zabilježene su u rasponu od 12.48 mg/L (LAB1, Ciganovac) do 17.87 mg/L (RJEC1, Rječica). Najniža vrijednost otopljenog organskog ugljika zabilježena je na lokaciji Korenička rijeka (DR) gdje je iznosila 0.45 mg/L, a najviša u jezeru Okrugljak (LAB2) gdje je iznosila 2.63 mg/L.

U svim uzorcima zabilježene su relativno ujednačene koncentracije otopljenog kalcija s prosječnom vrijednosti od 1.72 mM. Najviša vrijednost izmjerena je u uzorku RJEC1(Rječica) gdje je iznosila 2.23 mM. Koncentracija otopljenog magnezija izmjerena je u rasponu od 0.69 mM do 1.04 mM. Koncentracije otopljenih iona natrija, klorida, sulfata i nitrata nisu prelazile vrijednosti ≥ 0.10 mM. Izuzev uzorka DR (Korenička rijeka) gdje je koncentracija natrija iznosila 0.88 mM, a koncentracija klorida 1.03 mM.

Tablica 4. Fizikalno-kemijska analiza vode na u uzorcima odnosno na lokacijama Nacionalnog parka Plitvička jezera.

Lokacija	Oznaka uzorka	Konduktivitet $\mu\text{S/cm}$	ODO (mg/L)	Salinitet (PSU)	pH	T ($^{\circ}\text{C}$)	DIC (mg/L)	DOC (mg/L)	[Ca ²⁺] (mM)	[Mg ²⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)	[Cl ⁻] (mM)	[SO ₄ ²⁻] (mM)	[NO ₃ ⁻] (mM)
Plitvica	IPP	291.23	10.33	0.21	7.64	7.43	15.84	0.58	1.80	1.082	0.03	0.03	0.05	0.10
	PP1	284.37	11.83	0.21	8.38	7.27	15.43	0.72	1.74	1.066	0.01	0.03	0.05	0.09
	PP2	267.32	11.81	0.20	8.45	6.55	14.76	0.96	1.68	1.084	0.02	0.03	0.05	0.08
Sartuk	SAR	272.96	12.06	0.21	8.51	5.48	15.45	1.94	1.73	1.328	0.02	0.02	0.04	0.07
	SAR1	269.29	12.12	0.21	8.57	5.59	15.20	2.17	1.59	1.304	0.02	0.02	0.04	0.06
Korana	KOR	203.06	12.06	0.15	8.40	5.90	13.94	0.93	1.39	0.916	0.04	0.05	0.04	0.05
Bijela rijeka	IBR	306.36	10.96	0.22	7.80	7.48	15.32	0.54	1.70	1.254	0.07	0.09	0.04	0.08
Vukomirovići	VUK	320.02	11.24	0.23	8.30	7.23	16.57	0.70	1.82	1.438	0.03	0.03	0.05	0.10
Ljeskovac	LJES	282.52	11.97	0.21	8.31	6.84	14.84	0.56	1.77	0.91	0.03	0.03	0.03	0.08
Crna rijeka	ICR	270.35	10.22	0.19	7.52	7.94	14.44	0.67	1.80	0.692	0.05	0.06	0.04	0.05
	CR	271.49	11.32	0.20	8.16	7.78	14.28	0.99	1.85	0.76	0.05	0.06	0.04	0.05
Matica	MAT	278.36	11.29	0.20	8.21	7.12	14.62	0.57	1.80	0.92	0.05	0.06	0.04	0.06
Sušanj	ISUŠ	276.75	11.17	0.21	8.12	6.41	14.88	0.80	1.67	1.056	0.03	0.03	0.05	0.08
	SUŠ	310.74	9.33	0.22	7.66	7.68	15.74	0.73	1.81	1.33	0.03	0.03	0.05	0.08
Ciganovac	LAB1	436.00	10.22*	0.22*	8.12	5.50	12.48	0.99	1.70	0.83	0.04	0.05	0.04	0.05
Okrugljak	LAB2	435.00	11.26*	0.23*	8.19	5.60	15.24	2.63	1.69	0.812	0.04	0.05	0.04	0.05
Gradinsko jezero	GRAD1	397.00*	11.24*	0.22*	8.4*	5.59*	12.52	1.38	1.57	0.812	0.04	0.05	0.04	0.05
	GRAD2	397.00	11.15*	0.26*	8.17	6.00	13.71*	0.56*	1.51	0.788	0.05	0.06	0.04	0.05
Rječica	RJEC1	344.96	11.26	0.26	8.29	6.84	17.87	1.43	2.08	1.634	0.03	0.02	0.05	0.06
	RJEC2	511.00	10.22*	0.23*	8.06	6.90	13.44	1.13	1.60	1.418	0.03	0.03	0.04	0.07
Kozjak	KM	404.00	10.96*	0.26*	8.22	5.10	12.61	1.10	1.47	0.882	0.04	0.05	0.04	0.05
Novaković Brod	NB	395.00	10.33*	0.27*	8.28	5.10	13.71	1.12	1.48	0.89	0.04	0.05	0.04	0.05
Korenička rijeka	RK	300.30	11.37	0.22	8.29	7.28	15.58	1.21	1.85	1.02	0.11	0.10	0.03	0.03
	DR	371.99	11.22	0.27	7.52	8.37	15.75	0.45	2.23	0.83	0.88	1.03	0.03	0.01

* vrijednosti određene koristeći programski paket „mice“

5.1.1. Analiza glavnih komponenta (PCA)

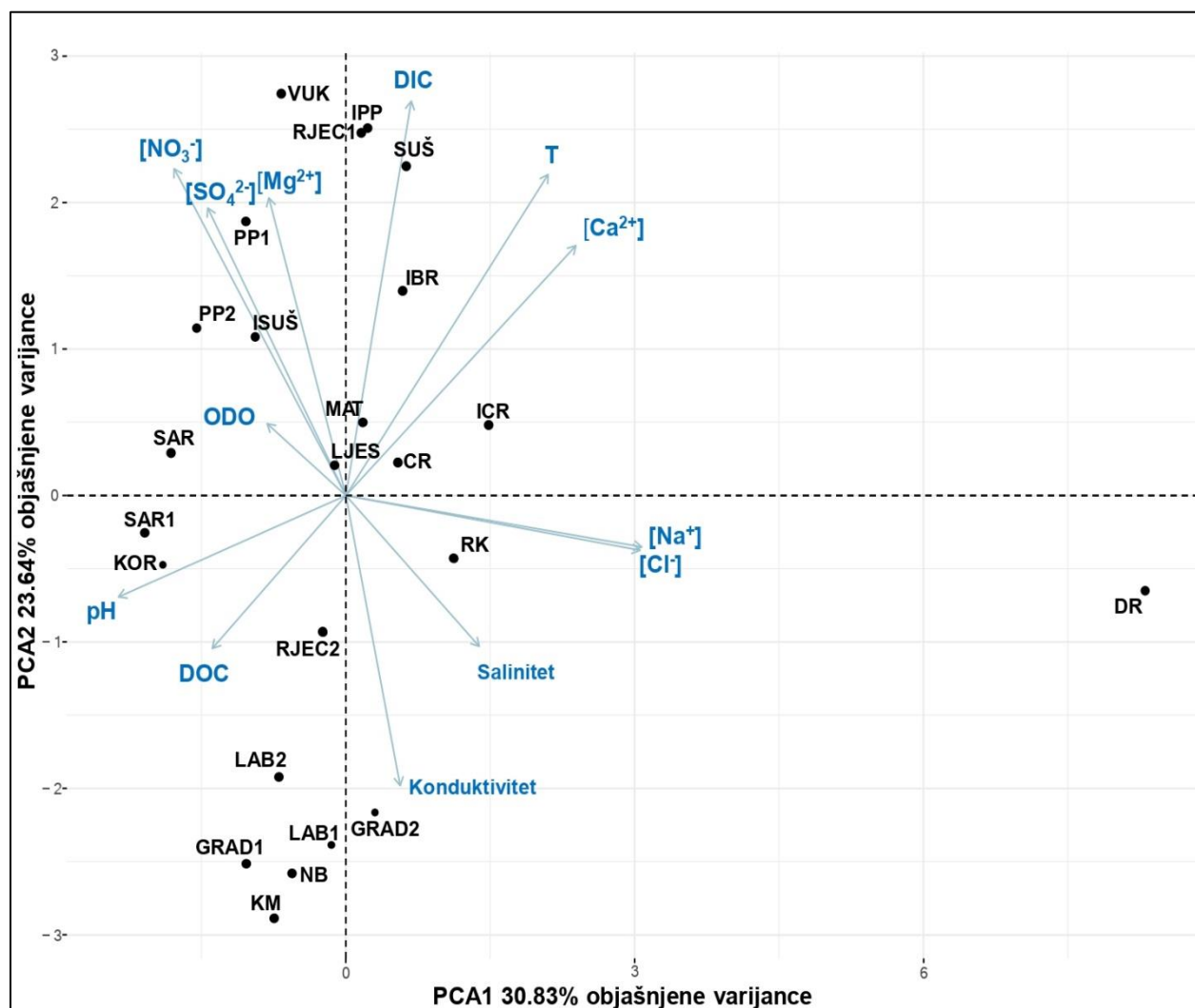
Multivarijantna analiza glavnih komponenta (PCA) za 13 okolišnih čimbenika opisuje 54.47% varijabilnosti za prve dvije osi. PC1 os opisuje 30.83% varijabilnosti, a PC2 os opisuje 23.64%. Pregled korelacije između okolišnih čimbenika i uzoraka prikazani su u tablici 4. PC1 os najbolje opisuje varijabla otopljenog natrija (0.454889). Slijede varijable – otopljeni klorid (0.452207) i otopljeni kalcij (0.353596). PC2 os najbolje opisuje varijabilnosti DIC-a (0.455208), otopljenih nitrata (0.377297) te temperature (0.370583) (Tablica 5).

Tablica 5. Statistički pregled analize glavnih komponenta (PCA) za prve dvije os. Prikazani su koeficijenti linearne kombinacije za 13 okolišnih čimbenika za istraživano područje.

	PCA1	PCA2
Svojtvena vrijednost	4.007392	3.072491
% varijacije	30.83%	23.64%
Kumulativna varijacija	30.83%	54.46%
Standardna devijacija (σ)	2.001847	1.752852
<i>Koeficijenti linearne kombinacije</i>		
Varijabla	PCA1	PCA2
Konduktivitet ($\mu\text{S/cm}$)	0.083412	-0.334810
ODO (mg/L)	-0.121130	0.082985
Salinitet (PSU)	0.204954	-0.174130
pH	-0.349600	-0.117090
T ($^{\circ}\text{C}$)	0.310807	0.370583
DIC (mg/L)	0.100454	0.455208
DOC (mg/L)	-0.205370	-0.176480
[Ca²⁺] (mM)	0.353596	0.288427
[Mg²⁺] (mM)	-0.118430	0.343528
[Na⁺] (mM)	0.454889	-0.059400
[Cl⁻] (mM)	0.452207	-0.063220
[SO₄²⁻] (mM)	-0.212420	0.331989
[NO₃⁻] (mM)	-0.263970	0.377297

Distribucija uzoraka u prostoru glavnih komponenti jasno pokazuje odvajanje uzorka DR (Korenička rijeka) gdje su izmjerene maksimalne vrijednosti otopljenih iona natrija i klorida. Vidljivo je i odvajanje uzorka VUK (Vukomirović) koji je okarakteriziran varijablom otopljenog magnezija te odvajanje uzorka KOR (Korana) na temelju pH. Također, može se primijetiti

grupiranje većeg broja uzoraka (LAB1, LAB2, GRAD1, GRAD2, NB, KM, RJEC2) u odnosu na parametre – konduktivitet i DOC. Različiti parametri oblikuju uzorke izmjerene na lokaciji Plitvica. Uzorak PP1 okarakteriziran je varijablom otopljenog sulfata i magnezija, uzorak PP2 odvaja se na temelju otopljenog kisika i nitrata, dok je uzorak IPP najbolje okarakteriziran s parametrom DIC. Nadalje, vidljivo je razdvajanje uzoraka na lokaciji Sušanj gdje je uzorak SUŠ opisan s varijablom DIC, a ISUŠ varijablom otopljenog nitrata (Slika 11).

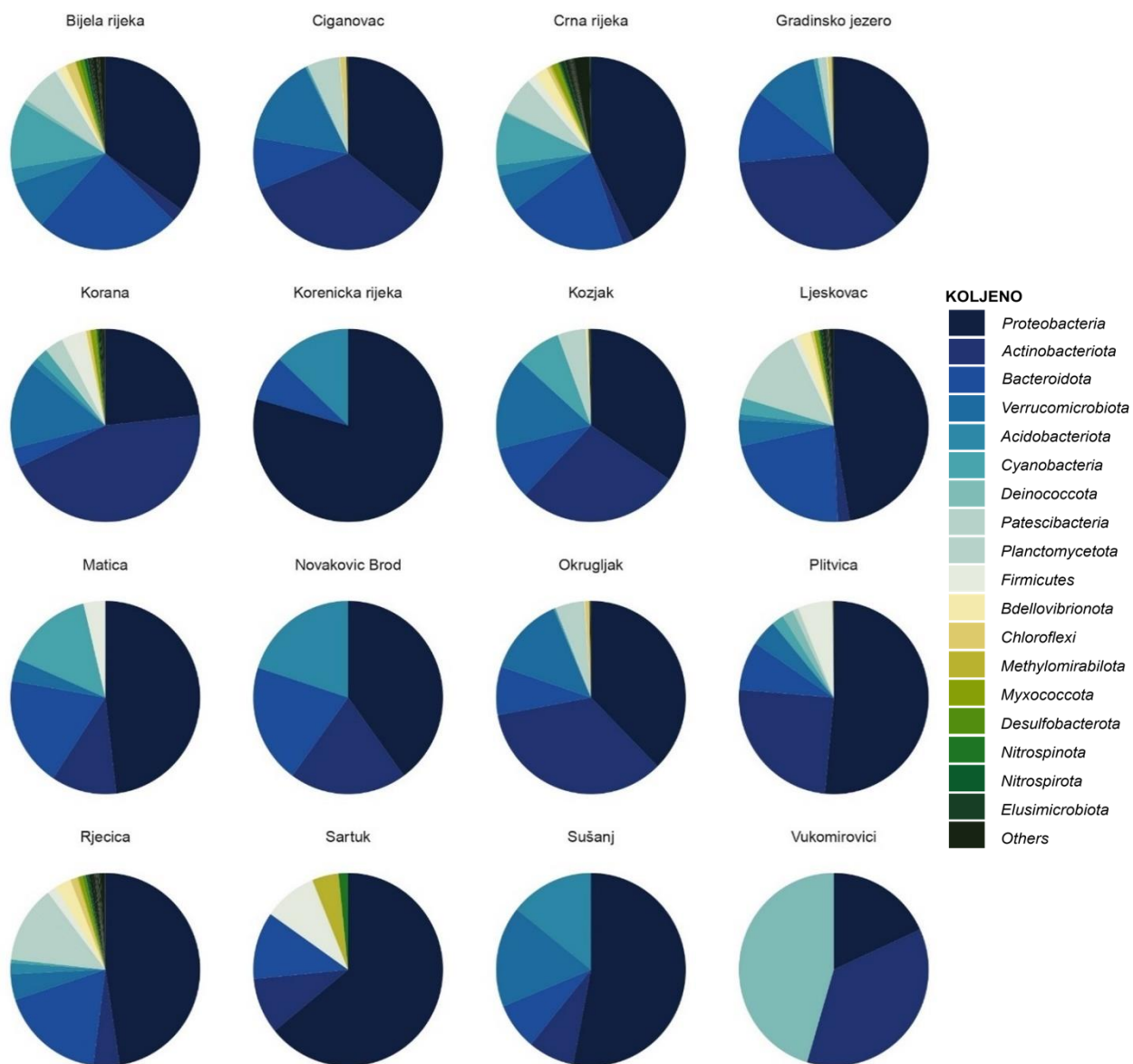


Slika 11. Ordinacijski dijagram analize glavnih komponentata (PCA) za 13 okolišnih čimbenika izmjerenih za istraživano područje

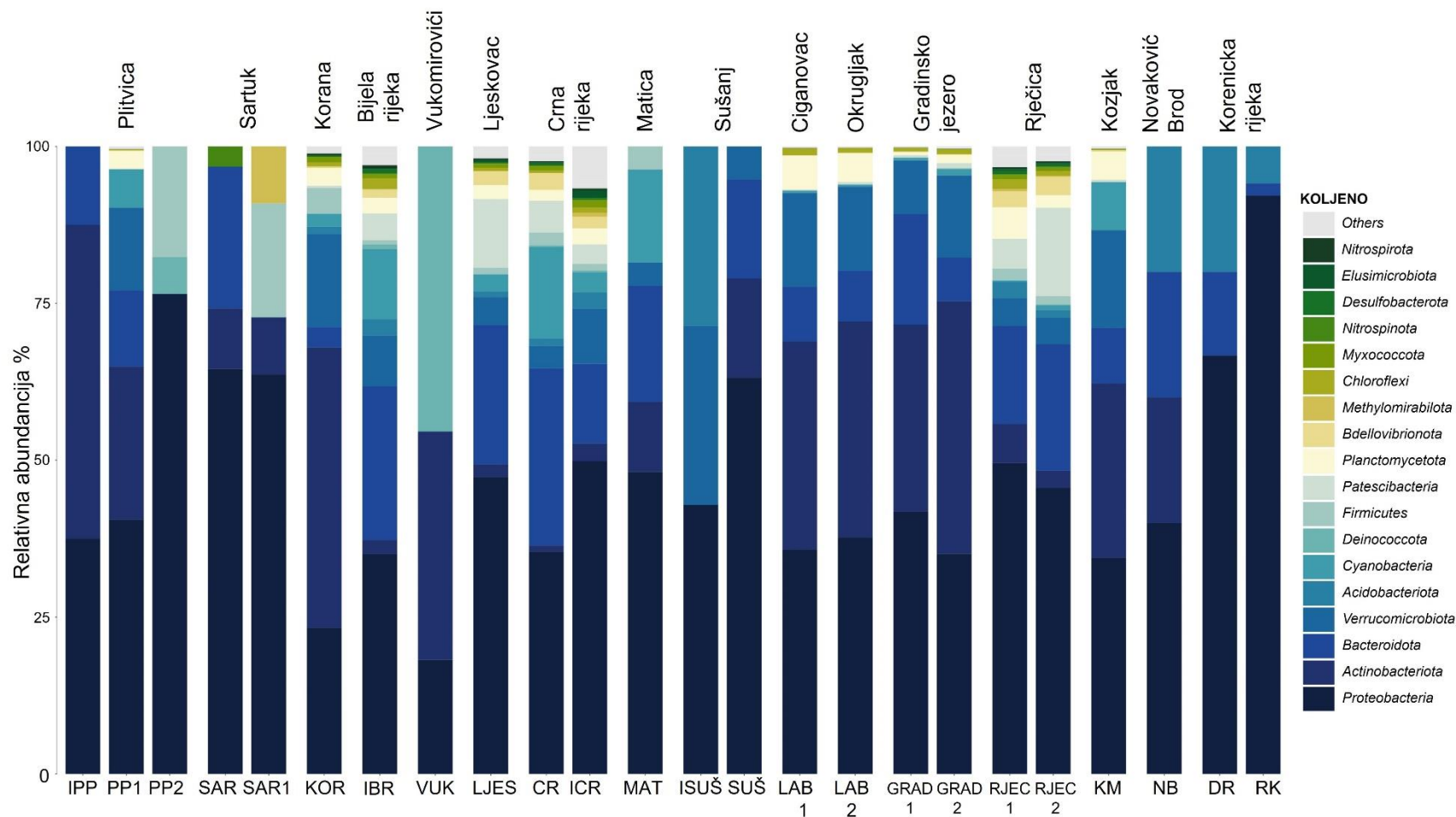
5.2. Struktura, raznolikost i brojnost bakterioplanktonskih zajednica NP Plitvička jezera

U bakterioplanktonskim zajednicama NP Plitvička jezera identificirano je 42 koljena, 100 razreda, 213 redova, 279 porodica te 447 rodova. Od kojih je, 18 koljena, 27 razreda, 64 redova, 89 porodica i 134 rodova prisutno s relativnom abundancijom >1% barem u jednom uzorku odnosno lokaciji. U cjelokupnoj bakterijskoj zajednici, najzastupljenije je koljeno *Proteobacteria* (razredi *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria*) s 39.35% prosječne relativne abundancije. Slijede koljena, *Actinobacteriota* (23.47%), *Bacteroidota* (13.43%) i *Verrucomicrobiota* (10.51%). Identificirana su i koljena *Planctomycetota* (2.85%), *Cyanobacteria* (2.82%) i *Patescibacteria* (2.41%). Koljena *Chloroflexi*, *Bdellovibrionota*, *Acidobacteriota*, *Zunknownk*, *Myxococcota*, *Desulfobacterota*, *Elusimicrobiota*, *Dependentiae*, *Armatimonadota*, *Nitrospirota* zastupljena su s <1% prosječne relativne abundancije u cjelokupnoj bakterijskoj zajednici.

Bakterijske zajednice čija je relativna abundancija iznosila >1% na taksonomskoj razini koljena za 16 lokacija odnosno 24 uzorka prikazane su na slici 11 a) i b).



Slika12. a) Relativna abundancija bakterijskih zajednica na taksonomskoj razini koljena za 16 lokacija. Prikazano je 18 koljena čija je relativna abundancija iznosila (≥ 0.01). Neklasificirane bakterijske zajednice i koljena s relativnom abundancijom < 0.01 grupirani su pod nazivom “Others”.



Slika 12. b) Relativna abundancija bakterijskih zajednica na taksonomskoj razini koljena za 24 uzorka za istraživano područje. Prikazano je 18 koljena čija je relativna abundancija iznosila ≥ 0.01 . Neklasificirane bakterijske zajednice i koljena s relativnom abundancijom < 0.01 grupirani su pod nazivom "Others"

Najzastupljenije koljeno identificirano u svim uzorcima je koljeno *Proteobacteria* s rasponom relativne abundancije od 18% (VUK) do 67%(RK). Navedeno koljeno, predstavljeno je s razredima *Alphaproteobacteria* (11%-53%), *Betaproteobacteria* (6%-67%) i *Gammaproteobacteria* (1%-20%). Razred *Alphaproteobacteria* identificiran je u svih 24 uzoraka, a najveću zastupljenost ima uzorak PP2 (53%). Slijede uzorci ISUŠ(43%), IPP(38%), DR(33%), ICR(33%), SAR(32%), SUŠ(32%). Razred *Betaproteobacteria* najzastupljeniji je u uzorku RK (67%), SAR1(36%), SUŠ(32%), LJES(23%), MAT(22%) te s 20% u uzorcima NB, RJEC1, RJEC2. Razred *Betaproteobacteria* nije identificiran u uzorcima ISUŠ, IPP i VUK. Razred Relativna abundancija razreda *Gammaproteobacteria* najveća je u uzorcima DR(20%), SAR(19%) i PP2(18%). U velikom broju nije identificiran (GRAD1, SUŠ, MAT, NB, ISUŠ, IPP, VUK).

Ostala najzastupljenija koljena s njihovim relativnim abundancijama u pojedinim uzorcima su : *Actinobacteriota* (1% - 50%), *Bacteroidota* (3% - 29%), *Verrucomicrobiota* (4% - 29%) Koljeno *Actinobacteriota* najzastupljenije je u uzorcima IPP(50.00%), KOR(44.72%), GRAD2(40.25%) i VUK(36.36%). Koljeno *Bacteroidota* najzastupljenije je u uzorcima CR (28.25%), IBR (24.52%), SAR (22.58%), LJES(22.21%), RJEC2(20.13%), NB(20.00%). Nadalje, relativna abundancija koljena *Verrucomicrobiota* najviša je u uzorku ISUŠ. Važno je istaknuti koljeno *Deinococcota* čija je relativna abundancija u uzorku VUK iznosila 45.45% te u uzorku PP2 5.88%. U ostalim uzorcima relativna abundancija ovog koljena iznosila je <1%. Uz to, vidljivo je da uzorci SAR (18.18%) i PP2 (17.65%) imaju veliki postotak relativne abundancije koljena *Firmicutes*, za razliku od ostalih uzoraka. Isto je uočljivo i za koljeno *Cyanobacteria* koje se pojavljuje u uzorcima MAT (14.81%), CR (14.61%), IBR(11.21%) dok je u ostalim uzorcima prisutno u niskim relativnim abundancijama (Slika 12a i b).

Dodatnim uvidom u taksonomsku analizu, najveću relativnu abundanciju imaju porodice *Comamonadaceae* (razred *Betaproteobacteria*), *Thermaceae* (koljeno *Deinococcota*), *Xanthobacteraceae* i *Sphingomonadaceae* (razred *Alphaproteobacteria*) te *Sporichthyaceae* i *Corynebacteriaceae* (koljeno *Actinobacteriota*) (Slika 15).

Vidljivo je grupiranje porodica *Comamonadaceae* i *Sphingomonadaceae* koje su najviše zastupljene u uzorcima RK (63.75%), SAR1 (36.38%), (SUŠ 21.05%) odnosno u uzorcima DR (33.34%), SUŠ(26.32%), NB(20.01%). Porodica *Thermaceae* grupirala se s porodicom *Nocardiodaceae* (koljeno *Actinobacteriota*) s najvećom relativnom abundancijom u uzorku VUK (45.45%, odnosno 18.18%). U uzorcima ISUŠ (42.28%), VUK (18.18%) i SAR1(18.18%) uočena

je najveća relativna abundancija *Xanthobacteraceae*. Uz to, vidljivo je grupiranje navedene porodice s *Chthoniobacteraceae* (koljeno *Verrucomicrobiota*) gdje je uzorak ISUŠ, također imao najveću relativnu abundanciju (28.57%). Nadalje, vidljivo je međusobno grupiranje porodica *Rubritaleaceae* (koljeno *Verrucomicrobiota*), *Clade III* (koljeno *Proteobacteria*) i *Sporichthyaceae* (koljeno *Actinobacteriota*) čija je relativna abundancija u uzorcima KOR, PP1, KM, GRAD1, GRAD2, LAB1,LAB2 (klaster 1) iznosila maksimalno 31%, a minimalno 4%. Najveću relativnu abundanciju porodice *Rubritaleaceae* ima uzorak KM (13%), dok uzorak GRAD1 ima najveću relativnu abundanciju (24%) porodice *Clade III*. U uzorku LAB1 uočena je najveća relativna abundancija (27%) porodice *Sporichthyaceae* (Slika 15).

5.2.1. Alfa raznolikost

Alfa raznolikost, odnosno bioraznolikost pojedinog uzorka procijenjena je indeksima raznolikosti Shannon i Simpson, procjeniteljima Chao1 i ACE te bogatstvom OTU-a i pokrivenosti (%) (Tablica 6).

Tablica 6 Prikaz rezultata alfa raznolikosti (bogatstvo OTU-a ,indeksi raznolikosti Shannon i Simpson, procjenitelji Chao1 i ACE te pokrivenosti (%)(f))za istraživano razdoblje.

Lokacija	Oznaka uzorka	Bogatstvo OTU	Shannon	Simpson	ACE	Chao1	Pokrivenost (%)
Plitvica	IPP	6.00	1.67	0.78	25.52	16.00	38%
	PP1	319.00	4.03	0.94	564.64	540.69	98%
	PP2	13.00	2.51	0.91	27.63	20.20	47%
Sartuk	SAR	19.00	2.82	0.93	30.76	28.17	65%
	SAR1	7.00	1.85	0.83	11.00	9.00	64%
Korana	KOR	432.00	4.67	0.97	639.02	595.60	94%
Bijela rijeka	IBR	1340.00	6.18	0.99	2231.32	2203.73	89%
Vukomirovići	VUK	5.00	1.41	0.71	6.93	5.33	82%
Ljeskovac	LJES	1426.00	6.39	1.00	2551.41	2294.46	87%
Crna rijeka	ICR	1139.00	5.72	0.98	1730.24	1654.64	90%
	CR	1050.00	6.25	0.99	1838.08	1794.92	83%
Matica	MAT	19.00	2.83	0.93	40.36	32.00	52%
Sušanj	ISUŠ	3.00	1.08	0.65	3.00	3.00	97%
	SUŠ	16.00	2.73	0.93	50.67	35.50	32%
Ciganovac	LAB1	502.00	4.28	0.96	1014.58	939.55	98%
Okrugljak	LAB2	419.00	4.30	0.96	714.80	642.62	98%
Gradinsko	GRAD1	431.00	3.87	0.93	1091.05	1124.03	98%

jezero	GRAD2	718.00	4.46	0.97	1532.46	1539.33	97%
Rječica	RJEC1	1395.00	6.61	1.00	2044.20	1980.03	88%
	RJEC2	1151.00	6.50	1.00	2252.47	2212.56	78%
Kozjak	KM	262.00	4.08	0.96	473.55	528.80	97%
Novaković Brod	NB	5.00	1.61	0.80	-	15.00	-
Korenička rijeka	RK	19.00	2.01	0.71	40.27	34.60	75%
	DR	11.00	2.30	0.89	25.67	20.33	47%

Bogatstvo OTU izmjereno je u rasponu od 3 (ISUŠ) do 1426(LJES). Uzorci gdje je bogatstvo OTU-a > 1000 su: LJES (1426), RJEC1(1395), IBR (1340), RJEC2 (1151), ICR (1139) te CR (1050). Nadalje, bogatstvo OTU-a s minimalnim vrijednostima (<20) izmjereno je u uzorcima RK, SAR i MAT (19); PP2 (13), DR (11), SAR1(7), IPP (6), VUK i NB (5) te ISUŠ(3). Sukladno s bogatstvom OTU-a, procjenitelji Chao1 i ACE pokazuju maksimalne vrijednosti (Chao1 = 2294.464; ACE=2551.414) u uzorku LJES te minimalne vrijednosti (Chao1 = 3; ACE=3) u uzorku ISUŠ. Za uzorak NB nije bilo moguće izmjeriti vrijednost Chao1. Indeksi raznolikosti Shannon i Simpson prate jednaki obrazac odnosno maksimalna vrijednost izmjerena je u uzorku RJEC1 (Shannon=6.60, Simpson=0.997053), a slijede uzorci - RJEC 2 (Shannon=6.49, Simpson=0.997017) i LJES (Shannon=6.39, Simpson=0.995806). Minimalna vrijednost indeksa raznolikosti Shannon i Simpson izmjerena je u uzorku ISUŠ. Broj uzoraka čija je pokrivenost iznosila > 70 % je 16, ostatak uzoraka (8) imao je nižu pokrivenost (<70 %) (Tablica 6).

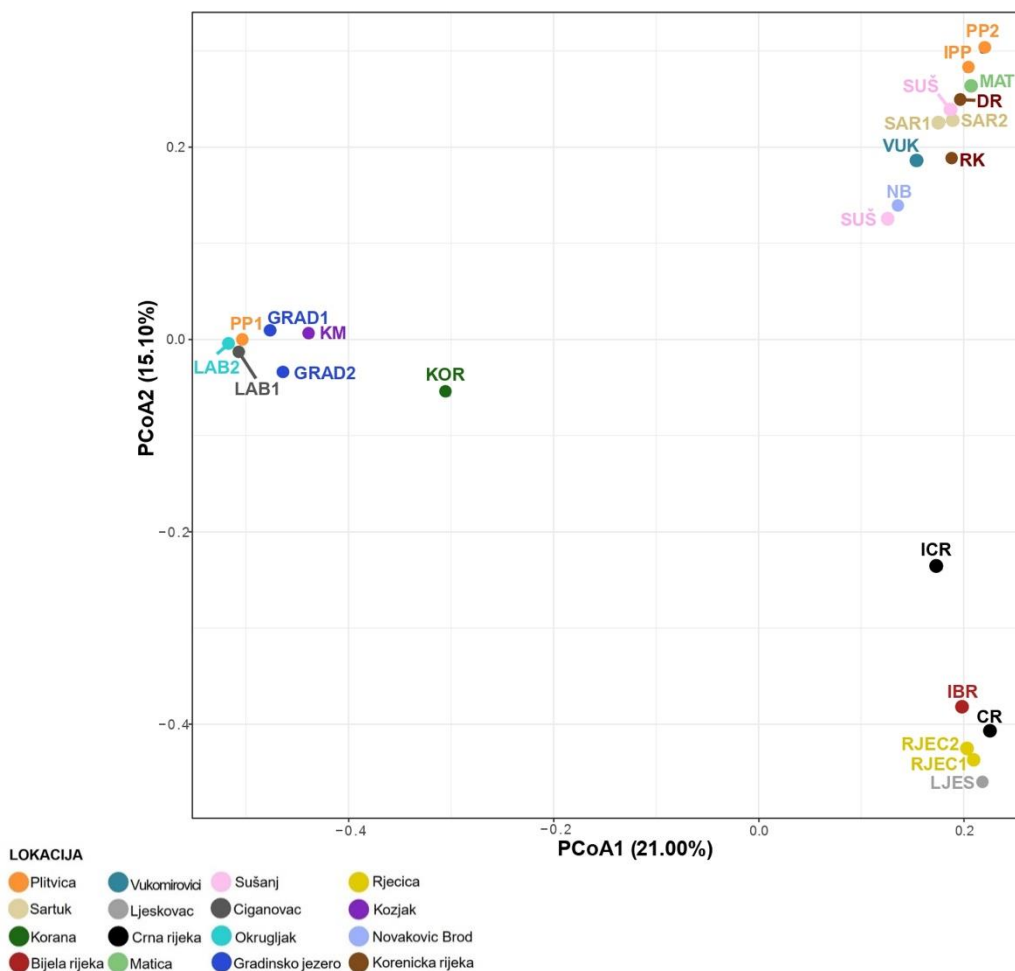
Za utvrđivanje statističke razlike između alfa raznolikosti i istraživanih lokacija, provedena je analiza varijance (ANOVA) (Prilog 2). Jednosmjerna analiza varijance pokazala je statističku značajnu razliku s bogatstvom OTU-a ($F = 23.3, p < 0.001$), indeksom raznolikosti Shannon ($F = 7.41, p < 0.01$) te procjeniteljima ACE ($F = 30.84, p < 0.001$) i Chao1 ($F = 28.83, p < 0.001$). Nije uočena statistička značajna razlika s indeksom raznolikosti Simpson te pokrivenošću.

5.2.2. Beta raznolikost

Beta raznolikost odnosno varijacija u sastavu bakterioplanktona za različite lokacije istraživanog područje određena je na temelju *Bray-Curtis dissimilarity distance*. Vizualizacija beta raznolikost provedena je multidimenzionalnim skaliranjem koristeći metodu analize glavnih koordinata (PCoA). Pomoću dvije PCoA dimenzije objašnjeno je ukupno 36.10 % varijacije bakterioplanktonskih zajednica za lokacije istraživanog područja. Dimenzija PCoA1 je opisala najveću varijabilnost (21.00%), a PCoA2 dimenzija - 15.10% varijabilnosti skupa(Slika 13).

PCoA ukazuje na grupiranje uzoraka u tri grupe. Uzorci - GRAD1, GRAD2, LAB1, LAB2, KM, KOR, PP1 svrstali su se na lijevu stranu ordinacijskog dijagrama. Uzorci – ISUŠ, SUŠ, SAR, SAR1, NB, DR, VUK, MAT, IPP, PP2 svrstali su na desnu stranu pri vrhu dijagrama. Ostali uzorci (ICR, CR, IBR, RJEC1, RJEC2, LJES) nalaze se na desnoj strani pri dnu ordinacijskog dijagrama (Slika 13).

Uzorci se grupiraju sukladno lokacijama gdje je provedeno uzorkovanje. Odnosno, uzorci GRAD1 i GRAD2 (Gradinsko Jezero) su se grupirali pretežito na lijevoj strani. Isto je vidljivo i za uzorke SAR i SAR1 (Sartuk), uzorke ŠUŠ i ISUŠ (Sušan) te uzorke DR i KR (Korenička rijeka) grupirane na desnoj strani pri vrhu, odnosno za uzorke ICR i CR (Crna rijeka) i RJEC1 i RJEC2 (Rječica) grupirane na desnoj strani pri dnu. Izuzetak su uzorci lokacije Plitvica (IPP, PP1, PP2) gdje je uzorak PP1 (pretežno lijevo) odvojen od uzoraka PP2 i IPP (desno pri vrhu).

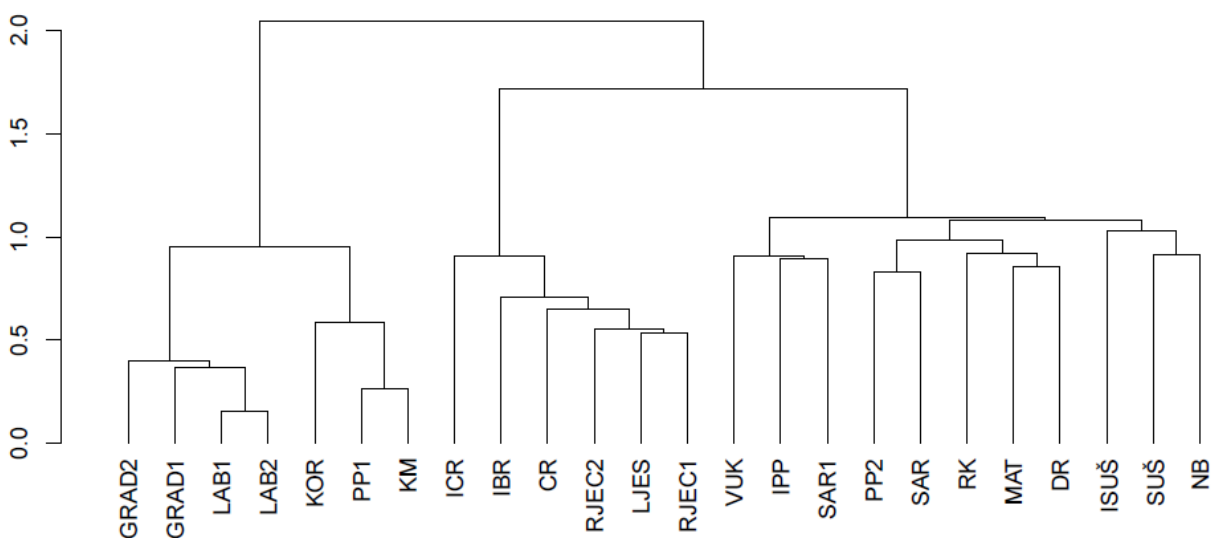


Slika 13. Ordinacijski dijagram analize glavnih koordinata (PCoA) na temelju *Bray-Curtis dissimilarity* distance za istraživano područje. Točke označavaju uzorke, a boja označava lokacije.

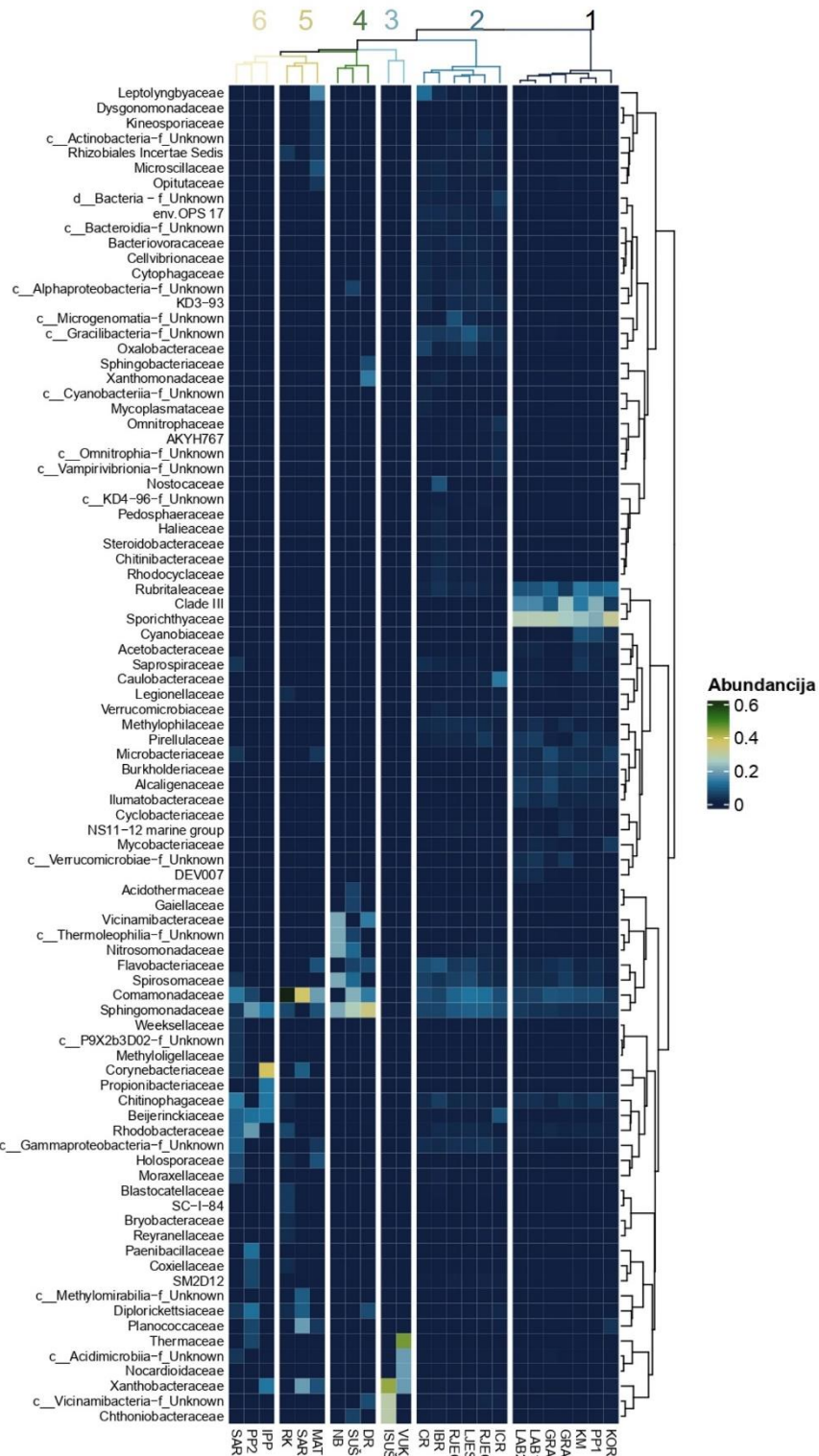
Ward – ovom metodom minimalne varijance provedena je klaster analiza na razini OTU-a i taksonomskoj razini porodice. Hijerarhijsko klasteriranje na temelju *Bray-Curtis* matrice udaljenosti, slično je grupiralo uzorke na razini OTU-a i na taksonomskoj razini porodice (Slika 14, Slika 15). Provedena permutacijska analiza varijance (PERMANOVA) potvrdila je statističku značajnu razliku između pojedinih grupiranih klastera na razini OTU-a ($p < 0.05^*$) odnosno na razini porodice ($p < 0.1$).

Uzorci istraživanog područja grupirali su se u 6 klastera na razini porodice. Vidljivo je grupiranje bakterioplanktonskih zajednica uzorka - LAB1, LAB2, GRAD1, GRAD2, KOR, PP1, KM (1) i grupiranje uzoraka ICR, IBR, CR, RJEC1, RJEC2, LJES (2) što je u skladu s provedenom PCoA analizom. Ujedno, navedeni klasteri grupirali su se jednako na OTU razini. Nadalje, vidljivo je grupiranje uzoraka VUK i ISUŠ (3), grupiranje uzoraka DR, SUŠ i NB (4), grupiranje uzoraka MAT, SAR1 i RK (5) te grupiranje uzoraka IPP, PP2 i SAR (6) na razini porodice (Slika 14).

Daljnjim uvidom u klasterku analizu vidljivo je da nisu svi uzorci grupirani u skladu sa lokacijama gdje su uzrokovani. Vidljivo je da su se uzorci na lokacijama Sušanj, Korenička rijeka, Sartuk i Plitvice grupirali u različite klasterne. Suprotno tome, uzorci Crne rijeke, Gradinskog jezera te Rječice grupirani su zajedno i to u istom klasteru (2) (Slika 15).



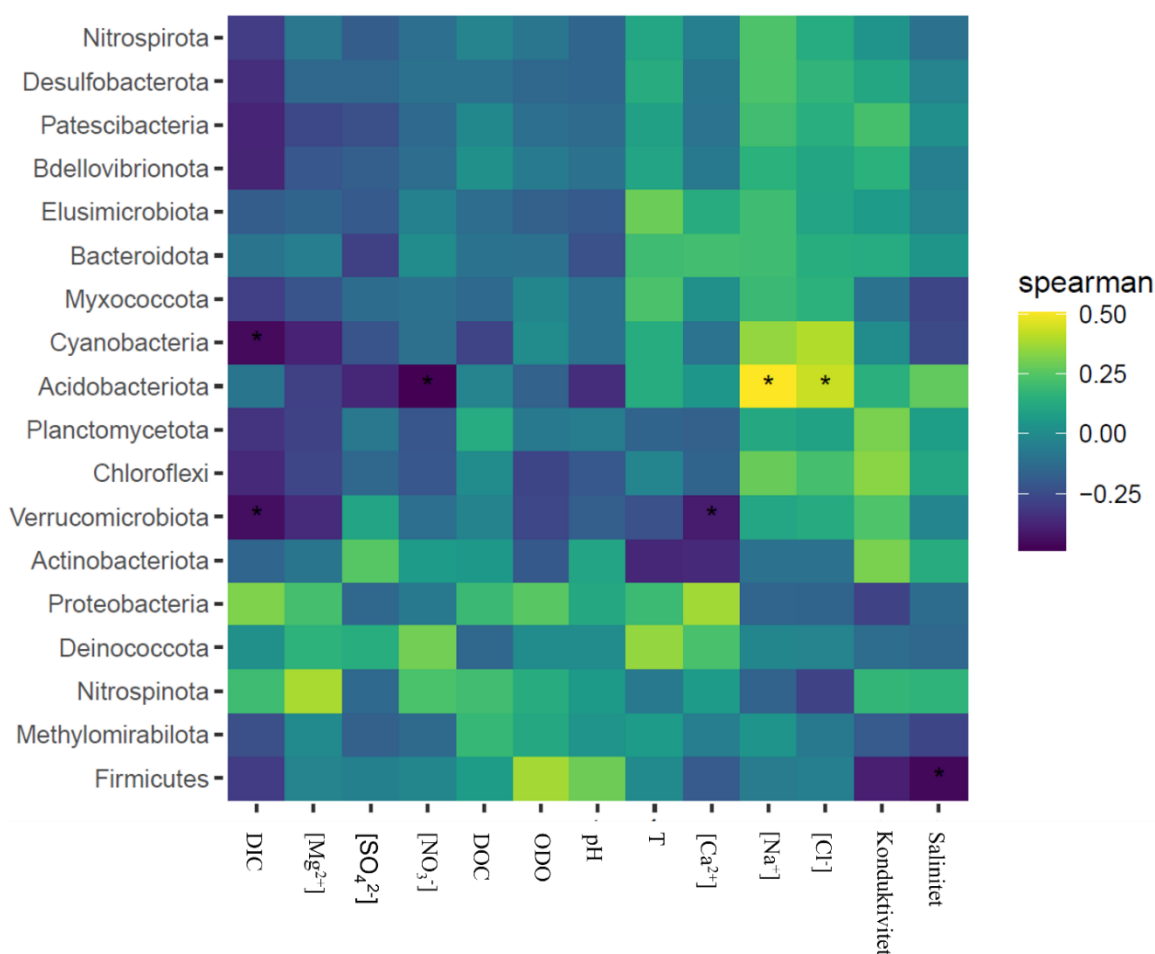
Slika 14. Hijerarhijska analiza klastera na temelju Ward – ove metode koristeći *Bray-Curtis dissimilarity* distance na taksonomskoj razini OTU-a za 24 uzorka istraživanog područja.



Slika 15. Heatmap-a bakterijskih zajednica na taksonomskoj razini porodice čija je relativna abundancija ≥ 0.01 (d__ - domena, c__ - razred, f_Unknown - nepoznata porodica). Prikazana je i hijerarhijska analiza klastera (lijevo) na temelju Ward – ove metode koristeći *Bray–Curtis* udaljenost na taksonomskoj razini porodice za 24 uzorka istraživanog područja.

5.3. Utjecaj okolišnih čimbenika na strukturu bakterioplanktonskih zajednica NP Plitvička jezera

Stupanj međusobne ovisnosti okolišni čimbenika i bakterioplanktonskih zajednica na taksonomskoj razini koljena (Slika 16a) i porodice (Slika 16b) određen je *Spearman*-ovim testom korelacije.



Slika 16a. Spearman-ov test korelacije između relativne abundancije najzastupljenijih koljena (≥ 0.01) i 13 fizikalno – kemijskih čimbenika. Žutom bojom označena je pozitivna korelacija, odnosno plavom bojom označena je negativna korelacija (statistička značajna korelacija $p < 0.05^*$).

Najzastupljenija koljena - *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* i *Verrucomicrobiota* pozitivno su s korelirala konduktivitetom (Slika 16a). Isti trend koji je statistički značajan ($p < 0.05^*$) pokazuju porodice navedenih koljena - *Ilumatobacteraceae* (koljeno *Actinobacteriota*), *NS11-12* i *Cyclobacteriaceae* (koljeno *Bacteroidota*) (Slika 16b). Koljeno *Proteobacteria* pokazuje negativnu korelaciju s konduktivitetom na razini koljena (Slika 16a) odnosno porodica

Methylococcaceae značajno negativno s konduktivitetom ($p < 0.001^{**}$). Međutim, konduktivitet pozitivno značajno korelira s porodicama, *Clade III* i *Acetobacteraceae* (*Alphaproteobacteria*) te *Alcaligenaceae*, *Methylophilaceae* (razred *Betaproteobacteria*) ($p < 0.05^*$). Uz to, manje zastupljeno koljeno *Firmicutes* odnosno porodica *Planococcaceae* pokazuje statističku značajnu negativnu korelaciju s konduktivitetom ($p < 0.01^{**}$)

Najzastupljenija koljena (*Actinobacteriota*, *Bacteroidota* i *Verrucomicrobiota*) negativno su korelirala s otopljenim kisikom. Porodica *Nitrosomonadaceae* (koljeno *Proteobacteria*) statistički negativno korelira s otopljenim kisikom ($< 0.05^*$)

Vidljiva je pozitivna korelacija između temperature i koljena *Proteobacteria* i *Bacteroidota*. Porodice ovih koljena odnosno *Xanthomonadaceae* (razred *Gammaproteobacteria*) te *Flavobacteriaceae* i *Sphingobacteriaceae* pokazuju statističku značajnu korelaciju ($p < 0.05^*$). Temperatura je negativno korelirala s koljenima *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Nitrospinota*, *Planctomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Actinobacteriota*.

Također, porodice *Planococcaceae* (koljeno *Firmicutes*) i *Beijerinckiaceae* (razred *Alphaproteobacteria*) statistički negativno koreliraju sa salinitetom ($p < 0.001^{**}$, $p < 0.05^*$). Dok porodice *Flavobacteriaceae* i *Sphingobacteriaceae* (koljeno *Bacteroidota*) i *Xanthomonadaceae* (razred *Gammaproteobacteria*) statistički negativno koreliraju sa pH ($p < 0.05^*$).

Korelacija između otopljene anorganske tvari (DIC -0.457 do -0.029) za većinu koljena bila je negativna. Porodice koljena *Actinobacteriota* (*Microbacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Ilumatobacteraceae* ($p < 0.05^*$); *Sporichthyaceae* ($p < 0.01^{**}$)) *Proteobacteria* (*Alcaligenaceae*, *Clade III* ($p < 0.01^{**}$)); *Methylophilaceae*, *Burkholderiaceae*, *Acetobacteraceae* ($p < 0.05^*$); *Bacteroidota* (NS11-12, ($p < 0.05^*$)), *Verrucomicrobiota* (*Rubritaleaceae*, ($p < 0.01^{**}$)) te porodica koljena *Cyanobacteria*. (*Cyanobiaceae* ($p < 0.01^{**}$)) pokazuju značajnu negativnu korelaciju s anorganskim otopljenim ugljikom. Pozitivna korelacija s DOC-om utvrđena je za koljena *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes*, i *Nitrospinota*. Suprotno tome porodica *Flavobacteriaceae* koja pripada koljenu *Bacteroidota* pokazuje značajnu negativnu korelaciju s organskim otopljenim ugljikom ($p < 0.05^*$).

Vidljiv je sličan obrazac korelacije porodica s otopljenim ionima magnezija i DIC-a. Utvrđena je negativna statistički značajna korelacija između magnezija i devet različitih porodica. Porodice koljena *Actinobacteriota* (*Mycobacteriaceae*, *Ilumatobacteraceae* ($p < 0.05^*$); *Sporichthyaceae* ($p < 0.01^{**}$)), *Bacteroidota* (*Cyclobacteriaceae* ($p < 0.05^*$)); *Proteobacteria*

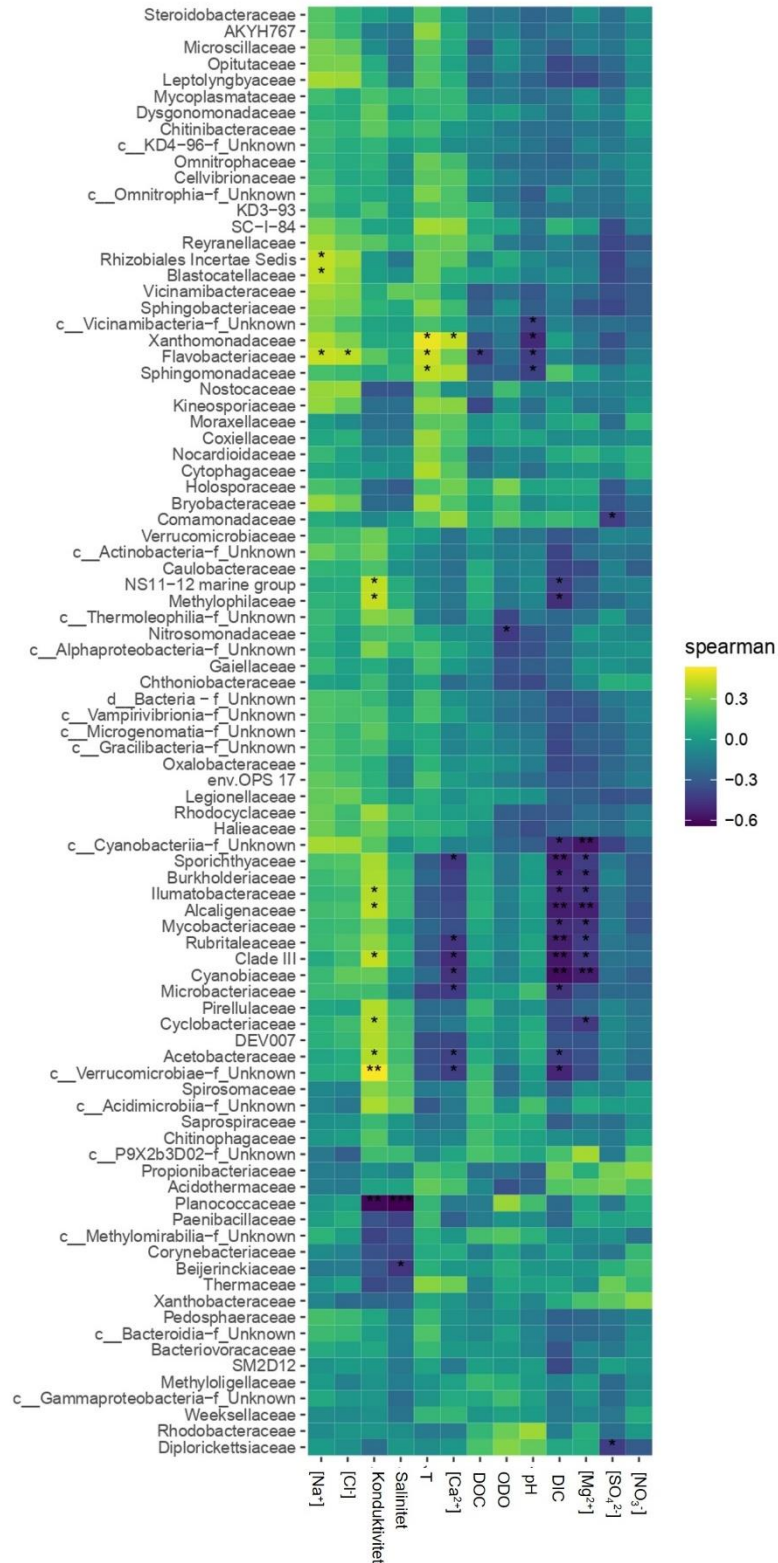
(*Proteobacteria* (*Alcaligenaceae* ($p < 0.01^{**}$), *Clade III*, *Burkholderiaceae*, ($p < 0.05^{*}$)); *Verrucomicrobiota* (*Rubritaleaceae*, ($p < 0.05^{*}$)) te porodica koljena *Cyanobacteria*. (*Cyanobiaceae* ($p < 0.01^{**}$)) pokazuju značajnu negativnu korelaciju s otopljenim ionom magnezija.

Otopljeni ioni kalcija značajno negativno koreliraju ($p < 0.05^{*}$) s porodicama *Rubritaleaceae* (koljeno *Verrucomicrobiota*); *Sporichthyaceae* i *Microbacteriaceae* (koljeno *Actinobacteriota*); *Cyanobiaceae* (koljeno *Cyanobacteria*) te *Acetobacteraceae* i *Clade III* (koljeno *Proteobacteria*). Suprotno tome, porodica *Xanthomonadaceae* (koljeno *Proteobacteria*) značajno pozitivno korelira ($p < 0.05^{*}$) sa otopljenim ionima kalcija.

Nadalje, porodica *Flavobacteriaceae* koja pripada koljenu *Bacteroidota* pokazuje značajnu pozitivnu korelaciju s ionima klorida i natrija ($p < 0.01^{**}$). Značajna pozitivna korelacija ($p < 0.05^{*}$) uočena je između otopljenih iona natrija i porodice *Blastocatellaceae* (koljeno *Acidobacteriota*). Uz to, *Spearman*-ov test korelacije na razini koljena pokazao je da koljeno *Acidobacteriota* značajno pozitivno korelira s otopljenim ionima klorida ($p < 0.05^{*}$). Uz to, koljeno negativno značajno korelira sa otopljenim ionima nitrata ($p < 0.05^{*}$) (Slika 16a).

Otopljeni ioni sulfata i nitrata negativno koreliraju sa porodicama najzastupljenijeg koljena – *Proteobacteria* (*Diploricettsiaceae*, *Comamonadaceae* ($p < 0.05^{*}$)).

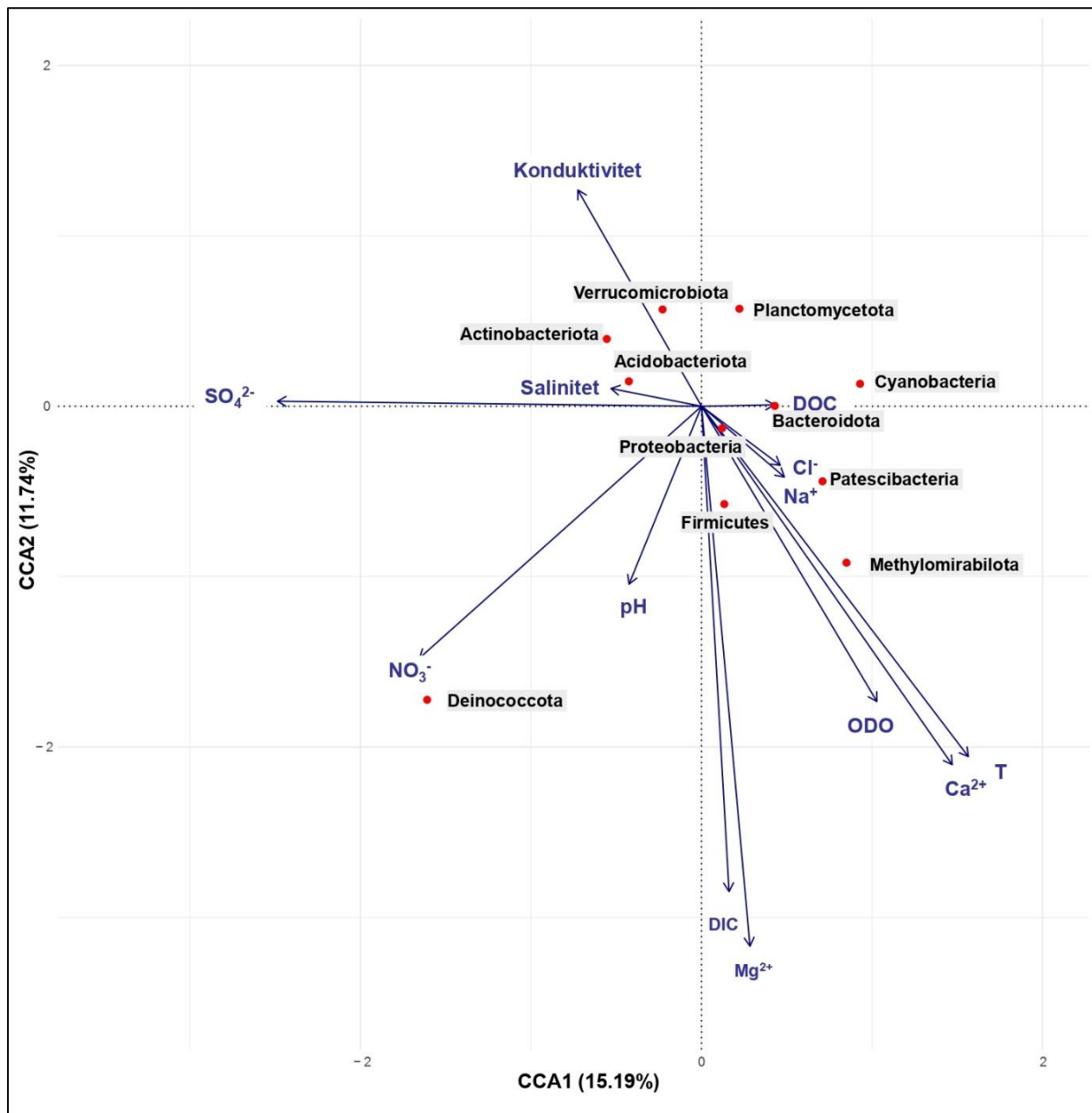
Nadalje, koljena *PAUC34f* (*bacterial candidate phylum*) i *RCP2-54* čija je relativna abundancija bila manja od 1% pokazuju značajnu pozitivnu korelaciju s otopljenim ionima kalcija odnosno magnezija. Uz to, koljeno *Fusobacteria* korelira značajno negativno s DIC-om.



Slika 16b. Spearman- test korelacije između relativne abundancije (≥ 0.01) najzastupljenih porodica.. (d__ - domena, c__ - razred, f_Unknown - nepoznata porodica) i 13 fizikalno – kemijskih čimbenika. Žutom bojom označena je pozitivna korelacija, odnosno plavom bojom označena je negativna korelacija (statistička značajna korelacija (p): < 0.001***; < 0.01 **, * < 0.05).

5.3.1. Kanonska analiza korespondencije (CCA)

Povezanost strukture zajednice i fizikalno – kemijskih čimbenika kanonskom analizom korespondencije (CCA) prikazana je na slici 17.



Slika 17 . Kanonska analiza korespondencije (CCA) strukture bakterijskih zajednica i fizikalno – kemijskih parametara uzoraka za istraživano područje. Crvena točka označava taksonomsku razinu koljena čija je relativna abundancija iznosila $\geq 5\%$.

Kanonskom analiza korespondencije (CCA) objašnjeno je ukupno 26.93 % povezanost strukture bakterioplanktonskih zajednica i fizikalno – kemijskih čimbenika za prve dvije osi. Dimenzija CCA1 je opisala najveću varijabilnost (15.19 %), dok je dimenzija CCA2 opisala 11.74%.

Provedeni permutacijski test ANOVA na razini OTU-a potvrdio je statističko značajnu povezanost strukture bakterijskih zajednica i konduktiviteta te otopljenih iona sulfata i klorida ($p < 0.05^*$). S ostalim fizikalno – kemijskim čimbenicima nije utvrđena statistička značajnost. Na taksonomskoj razini koljena i porodice nije utvrđena statistička značajnost.

6. RASPRAVA

Važno je razumjeti strukturu, brojnost i raznolikost mikroorganizama kako bi se istražila i opisala funkcija te struktura velikog složenog slatkovodnog ekosustava (Shafi i sur. 2017) poput NP Plitvičkih jezera .

Taksonomska raznolikost vodenih tijela NP Plitvičkih jezera bila je visoka sa identificiranih 18 koljena čija je relativna abundancija iznosila >1%, barem u jednom uzorku. Dominantna koljena bakterioplanktona bila su *Proteobacteria*, *Actinobacteriota* *Bacteroidota*, *Verrucomicrobiota*, što je sukladno istraživanjima (primjerice, Lindström, Kamst-Van Agterveld i Zwart, 2005; Kawasaki i sur. 2013; Noboru i sur. 2014; Dai i sur. 2015; Zhou i sur. 2020). Pripadnici navedenih koljena smatraju se globalno rasprostranjenim u slatkovodnim vodenim ekosustavima (Newton i sur. 2011, Yadav i sur. 2019). Uz to, osim koljena *Verrucomicrobiota*, navedena koljena predstavljaju 95% kultiviranih vrsta domene *Bacteria* (Keller i Zengler, 2004).

Glavna komponenta vodenih i sedimentnih bakterijskih zajednica je koljeno *Proteobacteria* (Dai i sur. 2015). To upućuje na važnost ovog koljena u održavanju funkcionalne raznolikost i same stabilnosti bakterijske strukture zajednice (Zhou i sur. 2020). Navedeno je u skladu s ovim istraživanjem, gdje je koljeno *Proteobacteria* identificirano u svim uzorcima. Unutar koljena identificirani su razredi *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria*.

Generalno, razred *Betaproteobacteria* najviše je zastupljen u slatkovodnim vodenim ekosustavima u odnosu na ostale razrede koljena *Proteobacteria* (Zhang i i sur 2019). Iako je u uzorku RK identificirana najviša relativna abundancija razreda *Betaproteobacteria*, isti nije identificiran u svim uzorcima. Nasuprot tome, razred *Alphaproteobacteria* rasprostranjen je u svim uzorcima s visokim relativnim abundancijama. Razlog dominantnosti razreda *Alphaproteobacteria* su uvjeti niske koncentracije hranjivih tvari (Newton i sur. 2011), kao i njihova otpornost na *grazing* (Salcher i sur. 2005). S obzirom da razred *Betaproteobacteria* brzo reagira na promjene u koncentraciji hranjivih tvari (Nelson 2008) velika je mogućnost da u trenutku povišenja koncentracije preuzme dominantnost nad razredom *Alphaproteobacteria*. Neovisno o njihovoj različitoj rasprostranjenosti i relativnoj abundanciji u uzorcima, ovi razredi se smatraju dominantnima u mezo – oligotrofičnim ekosustavima (Haukka i sur. 2006).

Razred *Gammaproteobacteria* rijetko je prisutan u planinskim slatkovodnim jezerima (Power i sur. 2005). Međutim, u ovom istraživanju, relativna abundancija razreda *Gammaproteobacteria* je bila relativno visoka, ali nije prelazila 20% (uzorak DR). Autori

Lindström i Leskinen (2002), predlažu da navedeni razred dospijeva u vodene ekosustave površinskim otjecanjem koje je karakteristično za područje NP Plitvičkih jezera (Stilinović i Božičević, 1998).

Ubikvistima slatkovodnih ekosustava smatraju se i pripadnici koljena *Actinobacteria* (Haukka i sur. 2006.) U gotovo svakom uzorku ovog istraživanja koljeno je bilo rasprostranjeno s visokom relativnom abundancijom. Iako pripadnici ovog koljena nisu brzorastuće bakterije, razlog njihove dominantnosti je iznimna učinkovitost u iskorištavanju hranjivih tvari u oligotrofnim uvjetima (Šimek i sur. 2007).

Rasprostranjenost koljena *Bacteroidota* može se pripisati njihovoj funkcionalnoj plastičnosti koja im omogućuje prilagodljivost neovisno o okolišnim uvjetima i sustavu (Székely i Silke 2014.)

Prethodno se smatralo da koljeno *Verrucomicrobiota* nije ubikvista slatkovodnih ekosustava (Newton i sur. 2011). Međutim, Chiang i sur. (2018) ističu visoku relativnu abundanciju i rasprostranjenost ovog koljena u slatkovodnim jezerima umjerenog pojasa. Sukladno tome je i ovo istraživanje, gdje je koljeno *Verrucomicrobiota* identificirano u 16 uzoraka s relativnom abundancijom od 4% -do 29%.

Rasprostranjenost koljena *Cyanobacteria* gotovo je u svim uzorcima bila niska. Identificirana je porodica *Cyanobiaceae* (*Synechococcaceae*) koja pripada rodu *Synechococcus*. To je kozmopolitski rod cijanobakterija koji je među najrasprostranjenijim autotrofima. Smatra se da se njegova relativna abundancija u slatkovodnim ekosustavima povećava sa nižim trofičkim uvjetima (niža koncentracija fosfora i klorofila *a*) (Callieri i sur. 2007). Obzirom da navedeni parametri nisu mjereni, samo možemo pretpostaviti da je u uzorcima gdje je identificiran ovaj rod niža koncentracija fosfora i klorofila *a*.

Alfa raznolikost pojedinih uzoraka bila je iznimno niska (primjerice uzorci IPP, SAR, VUK). Međutim, u svim uzorcima niske alfa raznolikosti uspješno su identificirana pojedina koljena, a u svim uzorcima identificirano je koljeno *Proteobacteria*. Primjerice, u uzorku VUK identificirano je koljeno *Deinococcota* čija je relativna abundancija iznosila 45.45%. Uz koljeno *Proteobacteria* identificirano je i koljeno *Actinobacteriota*. Razlog iznimne niske raznolikosti može biti dominantnosti koljena *Deinococcota* ili greška prilikom sekvenciranja i/ili bioinformatičke obrade podataka.

Geografska udaljenost pojedinih vodenih tijela može utjecati na sastav bakterijskih zajednica (Zhang i sur. 2019). Nedavno su autori Bai sur.(2020) utvrdili da postoji mogućnost da međusobna povezanost jezera homogenizira bakterijsku zajednicu. Beta raznolikost nije pokazala posebne obrasce za geografsku udaljenost pojedinih uzorkovanih vodenih tijela. Vidljivo je da su se uzorci prema PCoA analizi grupirali sukladno lokacijama gdje je provedeno uzorkovanje. Izuzev uzoraka lokacije Plitvica (IPP, PP1, PP2) gdje je uzorak PP1 odvojen od uzoraka PP2 i IPP. Samim time ne možemo pretpostaviti koliki je utjecaj imala geografska udaljenost pojedinih vodenih tijela na bakterijske zajednice u ovom istraživanju.

Brojna prethodna istraživanja potvrdila su osjetljivost bakterijskih zajednica na promjene u okolišu (primjerice Lindström, Kamst-Van Agterveld i Zwart, 2005, Logue i sur. 2012, Núñez Salazar i sur. 2020).

Temperatura vode regulira razne abiotičke i biotičke čimbenike unutar slatkovodnog ekosustava. Poznato je da fluktuacije temperature utječu na promjene u stratifikaciji, pH, konduktivitetu te na raznolikost i rasprostranjenost bakterijskih, i ostalih organizama u ekosustavu (Radhika, Mini i Gangadevi, 2004). U ovom istraživanju, temperatura je pokazala utjecaj na pojedine bakterijske zajednice. Spearman-ov test korelacije pokazao je da porodice *Sphingomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Flavobacteriaceae* značajno pozitivno koreliraju s temperaturom. Navedena koljena dominantna su unutar bakterijskih zajednica što ukazuje da su prilagođene na niske temperature s rasponom 5.10°C. - 8.37°C . Njihova prilagodljivost im omogućuje brzo razmnožavanje i samim time dominantnost. Suprotno tome, koljeno *Cyanobacteria* je abundantnija pri višim temperaturama (Staley i sur. 2013), što dodatno objašnjava zašto je relativna abundancija ovog koljena bila niska.

Nadalje, unutar razreda *Burkholderiales*, najzastupljenija porodica *Comamonadaceae* pozitivno je korelirala s otopljenim kisikom. Dok je porodica *Nitrosomonadaceae* s niskom relativno abundancijom, negativno korelirala s otopljenim kisikom. Što je sukladno istraživanju autora Yu i sur. (2019), koji predlažu da visoka koncentracija otopljenog kisika može pospješiti rast aerobnih bakterija, a smanjiti rast anaerobnih bakterija. Uz to, poznato je da su pripadnici razreda *Burkholderiales* strogi aerobi ili fakultativni anaerobi (Garrity, Bell i Lilburn, 2015).

Veliki broj istraživanja potvrdio je da gradijent pH ima značajan utjecaj na strukturu bakterijske zajednice (Fujii i sur. 2012.). U ovom istraživanju mali raspon pH (7.52 – 8.52) moguć je razlog za manje značajan utjecaj pH (Lindström, Kamst-Van Agterveld i Zwart, 2005). Ipak,

porodice *Flavobacteriaceae* i *Sphingobacteriaceae* (koljeno *Bacteroidota*) i *Xanthomonadaceae* (koljeno *Proteobacteria*) statistički su negativno korelirale sa pH (Hengy i sur 2017).

Generalno se smatra da su slatkovodni ekosustavi skloni gubitku bioraznolikosti ukoliko dođe do povišenja saliniteta. Yang i sur. (2016b) predlažu da bakterijska raznolikost negativno korelira sa salinitetom. Odnosno, osmotski stres induciran salinitetom eliminira bakterije osjetljive na salinitet i smanjuje raznolikost. U ovom istraživanju, koljeno *Firmicutes* negativno značajno korelira sa salinitetom. Smatra se da je abundancija ovog koljena puno viša u slanijim okolišima, dok u ekstremnim uvjetima ima mogućnost stvaranja spora (Sang i sur. 2018).

Povišeni konduktivitet u slatkovodnim ekosustavima može pospješiti bakterijski rast (Torres i sur. 2008). Ispiranjem tla u ekosustav, organski materijal razgrađuju bakterije što može utjecati na povišenje konduktiviteta (Núñez Salazar i sur. 2020). Sukladno navedenom, veliki broj porodica (primjerice porodice *Ilumatobacteraceae*, *NS11-12* i *Cyclobacteriaceae*) korelirale su pozitivno s konduktivitetom koji je izmjeren u rasponu od 203.06 - 511.00 $\mu\text{S/cm}$.

NP Plitvička jezera smješten je na planinskom području za čije je slatkovodne ekosustave karakteristična niska koncentracija hranjivih tvari. Koncentracije hranjivih tvari s naglaskom na prisutnost ugljika utječe na biomasu i taksonomski sastav heterotrofne bakterijske zajednice u vodi. Asimilacija organskog ugljika heterotrofnim bakterijama ključni je korak u protoku ugljika u slatkovodnim ekosustavima (Fujii i sur., 2012). Međutim, DOC nije značajno korelirao s abundancijom bakterijskih zajednica. Samim time se može pretpostaviti da koncentracija DOC-a ne predviđa strukturne razlike bakterijskih zajednica, već je kvaliteta organskog ugljika značajno povezana sa strukturom bakterijske zajednice u slatkovodnim jezerima (Jones, Newton i McMahon 2009). Nadalje, veliki broj porodica pokazao je snažnu korelaciju s otopljenim anorganskim ugljikom. Što ukazuje na to da DIC kontrolira raznolikost bakterija i sastav zajednice u slatkovodnom ekosustavu.

Na koncentracije kalcija i magnezija može utjecati proces biomineralizacije koje provode bakterije pa se samim time, koncentracija iona smanjuje (Núñez Salazar i sur. 2020). Porodice *Rubritaleaceae*, *Sporichthyaceae*, *Cyanobiaceae* i *Clade III* statistički su negativno korelirala s niskim koncentracijama otopljenih iona kalcija i magnezija što može upućivati na njihovu ulogu u biomineralizaciji, posebice jer je koncentracija hranjivih tvari bila niska (Konhauser, Lalonde i Phoenix, 2008, Núñez Salazar i sur. 2020).

7. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje opisalo je strukturu, raznolikost i brojnost bakterioplanktonskih zajednica, kao i sam utjecaj fizikalno-kemijskih čimbenika u zimi, na promjene u strukturi i brojnosti bakterioplanktonskih zajednica u Plitvičkim jezerima. Izvedeni su sljedeći zaključci:

- Koljeno *Proteobacteria* bilo je rasprostranjeno u svim uzorcima. Dominantni razred je bio *Alphaproteobacteria* zbog svoje visoke funkcionalne prilagodljivosti. Uz koljeno *Proteobacteria*, najveću relativnu abundanciju imala su koljena *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* i *Verrucomicrobiota*
- Na taksonomskoj razini porodice, najveću relativnu abundanciju u istraživanim sustavima imale su porodice *Comamonadaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Sporichthyaceae* i *Corynebacteriaceae*.
- Niska relativna abundancija ostalih koljena (<1%) može se pripisati lokalnim uvjetima, uključujući dostupnost hranjivih tvari, karakteristike sliva i sl. Uz to, moguće je da su unesena otjecanjem, resuspenzijom sedimenata i dr. utjecajima.
- Beta raznolikost nije pokazala jasne obrasce u odnosu na geografska udaljenost pojedinih vodenih tijela. Samim time se nije mogao procijeniti utjecaj geografske udaljenosti na bakterijsku zajednicu.
- Neovisno o heterogenosti fizikalno - kemijskih čimbenika vidljiv je utjecaj na bakterijske zajednice. Na bakterijske zajednice posebno su utjecali temperatura, konduktivitet, magnezij, kalcij i otopljeni anorganskog ugljik.
- Permutacijski test za CCA analizu pokazao je da su konduktivitet, sulfati i kloridi statistički značajni čimbenici koji utječu na bakterioplankton.
- Sastav i raspodjela bakterioplanktona usko je povezana s okolišnim čimbenicima u sustavu Plitvičkih jezera tijekom zime.

8. LITERATURA

- Alain, K. and Querellou, J. (2009). Cultivating the uncultured: limits, advances, and future challenges. *Extremophiles*, 13(4), 583–594.
- Amon, R. and Benner, R. (1996). Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 41(1), 41–51.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L. and Thingstad, F. (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10(3), 257–263.
- Bai, C., Cai, J., Zhou, L., Jiang, X., Hu, Y., Dai, J., Shao, K., Tang, X., Yang, X. and Gao, G. (2020). Geographic Patterns of Bacterioplankton among Lakes of the Middle and Lower Reaches of the Yangtze River Basin, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6), 1–13.
- Baker, G.C., Smith, J.J. and Cowan, D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555.
- Bonnet, M., Lagier, J.C., Raoult, D. and Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34, 1-11.
- Buermans, H.P.J. and den Dunnen, J.T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941.
- Bukin, Y., Galachyants, Y., Morozov, I., Bukin, S., Zakharenko, A. and Zemskaya, T. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6(1), 1–14.
- Butman, D. and Raymond, P. (2011). Significant efflux of carbon dioxide from streams and rivers in the United States. *Nature Geoscience*, 4(12), 839–842.
- Callieri, C., Modenutti, B., Queimaliños, C., Bertoni, R. and Balseiro, E. (2007). Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology*, 41(4), 511–523.
- Cancilla, M., Powell, I., Hillier, A. and Davidson, B. (1992). Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with ³²P and fluorescent labels. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1772–1775.
- Caporaso, J., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F., Costello, E., Fierer, N., Peña, A., Goodrich, J., Gordon, J., Huttley, G., Kelley, S., Knights, D., Koenig, J., Ley, R., Lozupone, C., McDonald, D., Muegge, B., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J., Turnbaugh, P., Walters, W., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J. and Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. and Alland, D., (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339.

- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K. and Shen, T. J. (2006). Abundance-based similarity indices and their estimation when there are unseen species in samples. *Biometrics*, 62(2), 361–371.
- Chiang, E., Schmidt, M.L., Berry, M.A., Biddanda, B.A., Burtner, A., Johengen, T.H., Palladino, D. and Deneff, V.J. (2018). Verrucomicrobia are prevalent in north-temperate freshwater lakes and display class-level preferences between lake habitats. *PloS ONE*, 13(3), 1–20.
- Chróst, R.J. (1991). Ectoenzymes in aquatic environments: Microbial strategy for substrate supply. *SIL Proceedings, 1922-2010*, 24(4), 2597–2600.
- Cotner, J.B. and Biddanda, B.A. (2002). Small Players, Large Role: Microbial Influence on Biogeochemical Processes in Pelagic Aquatic Ecosystems. *Ecosystems*, 5(2), 105–121.
- Dai, Y., Yang, Y., Wu, Z., Feng, Q., Xie, S. and Liu, Y. (2015). Spatiotemporal variation of planktonic and sediment bacterial assemblages in two plateau freshwater lakes at different trophic status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 4161–4175.
- Danza, F., Ravasi, D., Storelli, N., Roman, S., Lüdin, S., Bueche, M., and Tonolla, M. (2018). Bacterial diversity in the water column of meromictic Lake Cadagno and evidence for seasonal dynamics. *PloS ONE*, 13(12), 1–17.
- De Mandal S. and Panda A.K. (2015). Microbial Ecology in the Era of Next Generation Sequencing. *Journal of Next Generation Sequencing and Applications*, 1(1), 1–6.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996–998.
- Edwards, C. (2000). Problems Posed by Natural Environments for Monitoring Microorganisms. *Molecular Biotechnology*, 15(3), 211–224.
- Forney L.J., Zhou X. and Brown C.J. (2004). Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), 210–220.
- Fujii, M., Kojima, H., Iwata, T., Urabe, J. and Fukui, M. (2011). Dissolved Organic Carbon as Major Environmental Factor Affecting Bacterioplankton Communities in Mountain Lakes of Eastern Japan. *Microbial Ecology*, 63(3), 496–508.
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H. and Saito, M. (2016). Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223–232.
- Garrity, G.M., Bell, J.A. and Lilburn, T. (2015): Burkholderiales ord. nov. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, 1–1.
- Gasol, J.M. and Kirchman, D.L. (2018.): Introduction: The Evolution of Microbial Ecology of the Ocean. In: Gasol, J.M. and Kirchman, D.L. (eds.) *Microbial ecology of the oceans*. Wiley, 1- 46.
- Gilbert, J.A., Steele, J.A., Caporaso, J.G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., Huse, S., McHardy, A.C., Knight, R., Joint, I., Somerfield, P., Fuhrman, J.A. and Field, D. (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME Journal*, 6(2), 298–308.

- Habdija, I. and Sertić Perić, M. (2011) Fizičko-kemijska obilježja vode u jezeru Prošće i jezeru Kozjak. Habdija, I. i sur. 2011. Funkcionalna organizacija planktonske zajednice u jezeru Kozjak i jezeru Prošće kao indikator ekološkog stanja hidrosustava Plitvičkih jezera (NP Plitvička jezera). Ekspertiza.
- Hanson, C. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C. and Martiny, J. B. (2012). Beyond biogeographic patterns: Processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 497–506 .
- Haukka, K., Kolmonen, E., Hyder, R., Hietala, J., Vakkilainen, K., Kairesalo, T., Haario, H. and Sivonen, K. (2006). Effect of Nutrient Loading on Bacterioplankton Community Composition in Lake Mesocosms. *Microbial Ecology*, 51(2), 137–146.
- Head, I.M., Saunders, J.R. and Pickup, R.W. (1998). Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microbial Ecology*, 35(1), 1–21.
- Hengy, M.H., Horton, D.J., Uzarski, D.G. and Learman, D.R. (2017). Microbial community diversity patterns are related to physical and chemical differences among temperate lakes near Beaver Island, MI. *PeerJ*, 5, 1–22.
- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH and Bohannan BJM. (2003). Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters* 6, 613–622.
- Huang, X.C., Quesada, M.A. and Mathies, R.A. (1992). DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 64(18), 2149–2154.
- Hunkapiller, T., Kaiser, R., Koop, B. and Hood, L. (1991). Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science*, 254(5028), 59–67.
- Iaconelli, M., Valdazo-González, B., Equestre, M., Ciccaglione, A. R., Marcantonio, C., Della Libera, S. and La Rosa, G. (2017). Molecular characterization of human adenoviruses in urban wastewaters using next generation and Sanger sequencing. *Water research*, 121, 240–247.
- Ivković M., Kesić M. and Stloukalova V. (2012) Contribution to the knowledge of black fly (Diptera, Simuliidae) fauna at Plitvice Lakes National Park. *Natura Croatica* 21(1), 263–268.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764.
- Jones, S.E., Newton, R.J. and McMahon, K.D. (2009). Evidence for structuring of bacterial community composition by organic carbon source in temperate lakes. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2463–2472.
- Joshi, P. (2016). Microbial Diversity of Aquatic Ecosystem and its Industrial Potential. *Journal of Bacteriology and Mycology: Open Access*, 3(1), 177–179.
- Kawabata K. and Nakanishi M. (1996): Food web structure and biodiversity in lake ecosystems. In: Abe T., Levin S., Higashi M. (eds.) Biodiversity: an ecological perspective. *Springer-Verlag*, 203–213

- Kawasaki, N., Komatsu, K., Kohzu, A., Tomioka, N., Shinohara, R., Satou, T., Watanabe, F.N., Tada, Y., Hamasaki, K., Kushairi, M.R.M. and Imai, A. (2013). Bacterial Contribution to Dissolved Organic Matter in Eutrophic Lake Kasumigaura, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7160–7168.
- Kchouk, M., Gibrat, J.F. and Elloumi, M. (2017). Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*, 9(3), 1–8.
- Keller, M. and Zengler, K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 141–150.
- Kent, A.D., Jones, S.E., Lauster, G.H., Graham, J.M., Newton, R.J. and McMahon, K.D. (2006). Experimental manipulations of microbial food web interactions in a humic lake: shifting biological drivers of bacterial community structure. *Environmental Microbiology*, 8(8), 1448–1459.
- Konhauser, K.O., Lalonde, S.V. and Phoenix, V.R. (2008). Bacterial biomineralization: Where to from here? *Geobiology*, 6(3), 298–302.
- Kortelainen, P., Huttunen, J.T., Väisänen, T., Mattsson, T., Karjalainen, P. and Martikainen, P.J. (2000). CH₄, CO₂ and N₂O supersaturation in 12 Finnish lakes before and after ice-melt. *SIL Proceedings, 1922-2010*, 27(3), 1410–1414.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. and Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, 79(17), 5112–5120.
- Kurilkina, M.I., Zakharova, Y.R., Galachyants, Y.P., Petrova, D.P., Bukin, Y.S., Domysheva, V.M., Blinov, V.V. and Likhoshway, Y.V. (2016). Bacterial community composition in the water column of the deepest freshwater Lake Baikal as determined by next-generation sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(7), 1–13.
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y. and Kim, Y.H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62, 1–5.
- Levy, S.E. and Myers, R.M. (2016). Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17(1), 95–115.
- Lindström, E.S. (2000). Bacterioplankton Community Composition in Five Lakes Differing in Trophic Status and Humic Content. *Microbial Ecology*, 40(2), 104–113.
- Lindström, E.S. and Leskinen, E. (2002). Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microbial Ecology*, 44(1), 1–9.
- Lindström, E.S., Kamst-Van Agterveld, M.P. and Zwart, G. (2005). Distribution of Typical Freshwater Bacterial Groups Is Associated with pH, Temperature, and Lake Water Retention Time. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8201–8206.
- Logue, J.B., Langenheder, S., Andersson, A.F., Bertilsson, S., Drakare, S., Lanzén, A. and Lindström, E.S. (2012). Freshwater bacterioplankton richness in oligotrophic lakes depends on nutrient availability rather than on species–area relationships. *The ISME Journal*, 6(6), 1127–1136.

- Lu, Y., Shen, Y., Warren, W. and Walter, R. (2016): Next Generation Sequencing in Aquatic Models. In: Kulski J. K. (ed.) Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges. *IntechOpen*, 61–79
- Meaški, H., Biondić, B. and Biondić, R. (2016): Delineation of the Plitvice Lakes karst catchment area, Croatia. In: Stevanović, Z., Krešić, N. and Kukurić, N. (eds.) Karst without Boundaries ; International Association of Hydrogeologists - Selected Papers on Hydrogeology. *CRC Press/Balkema*, 269-284.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263–273.
- Muylaert, K., Van Der Gucht, K., Vloemans, N., Meester, L. D., Gillis, M. and Vyverman, W. (2002). Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 4740–4750.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695–700.
- Nakatsu, C.H., Byappanahalli, M.N. and Nevers, M.B. (2019). Bacterial Community 16S rRNA Gene Sequencing Characterizes Riverine Microbial Impact on Lake Michigan. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–12.
- Nelson, C.E. (2008). Phenology of high-elevation pelagic bacteria: the roles of meteorologic variability, catchment inputs and thermal stratification in structuring communities. *The ISME Journal*, 3(1), 13–30.
- Newton, R.J., Jones, S.E., Eiler, A., McMahon, K.D. and Bertilsson, S. (2011). A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 14–49.
- Nguyen, N.P., Warnow, T., Pop, M. and White, B. (2016). A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *npj Biofilms and Microbiomes*, 2(1), 1–8.
- Núñez Salazar, R., Aguirre, C., Soto, J., Salinas, P., Salinas, C., Prieto, H. and Paneque, M. (2020). Physicochemical Parameters Affecting the Distribution and Diversity of the Water Column Microbial Community in the High-Altitude Andean Lake System of La Brava and La Punta. *Microorganisms*, 8(8), 1–24.
- Okuda, N., Watanabe, K., Fukumori, K., Nakano, S. and Nakazawa, T. (2014). Biodiversity Researches on Microbial Loop in Aquatic Systems. In: Biodiversity in Aquatic Systems and Environments. *Springer Japan*, 51–67.
- Paerl, H.W., Dyble, J., Moisaner, P.H., Noble, R.T., Piehler, M.F., Pinckney, J.L., Steppe, T.F., Twomey, L. and Valdes, L.M. (2003). Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(3), 233–246.
- Pjevac, P., Žutinić, P., Gligora Udovič, M., Stević, F., Špoljarić, D., Žuna, T., Špoljarić Maronić, D., Stanković, I., Schmidt, H. and Goreta, G. (2018). Community composition in lakes and reservoirs along a trophic gradient. *ASLO 2018*.

- Power, M.L., Littlefield-Wyer, J., Gordon, D.M., Veal, D.A. and Slade, M.B. (2005). Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environmental Microbiology*, 7(5), 631–640.
- Previšić A., Graf W. and Kučinić M. (2010) Caddisfly (Trichoptera) fauna of the Plitvice Lakes National Park, Croatia. *Denisia* 29, 287–294.
- Quail, M., Smith, M.E., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P. and Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13, 1–13.
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J. and Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*, 35(9), 833–844.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Core Team: Vienna, Austria, 2020.
- Radhika, C. G., Mini, I., and Gangadevi, T. (2004). Studies on abiotic parameters of a tropical fresh water lake – vellayani Lake, Trivandrum, Kerala. *Pollution Research*, 23, 49–63.
- Ram, J.L., Karim, A.S., Sendler, E.D. and Kato, I. (2011). Strategy for microbiome analysis using 16S rRNA gene sequence analysis on the Illumina sequencing platform. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 57(3), 162–170.
- Rappé M.S., Vergin, K. and Giovannoni, S.J. (2000). Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(3), 219–232.
- Riđanović, J. and Božičević, S. (1996). Geographic-physical conditions of runoff and hydrogeological characteristics of the Plitvice Lakes. *Acta geographica Croatica*, 31, 7–26.
- Riemann, B., Jørgensen, N.O.G., Lampert, W. and Fuhrman, J.A. (1986). Zooplankton induced changes in dissolved free amino acids and in production rates of freshwater bacteria. *Microbial Ecology*, 12(3), 247–258.
- Rong, Y., Wang, Y., Guan, Y., Ma, J., Cai, Z., Yang, G. and Zhao, X. (2017). Pyrosequencing Reveals Soil Enzyme Activities and Bacterial Communities Impacted by Graphene and Its Oxides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(42), 9191–9199.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.
- Salcher, M., Pernthaler, J., Psenner, R. and Posch, T. (2005). Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquatic Microbial Ecology*, 38(3), 215–229.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463–5467.
- Shafi, S., Kamili, A.N., Shah, M.A., Parray, J.A. and Bandh, S.A. (2017). Aquatic bacterial diversity: Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Microbial Pathogenesis*, 104, 39–47.

- Smith, V. H. (2007). Microbial diversity-productivity relationships in aquatic ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 181–186.
- Staley, C., Unno, T., Gould, T.J., Jarvis, B., Phillips, J., Cotner, J.B. and Sadowsky, M.J. (2013). Application of Illumina next generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *Journal of Applied Microbiology*, 115(5), 1147–1158.
- Stilinović, B. and Božičević, S. (1998.). The Plitvice Lakes – a natural phenomenon in the middle of the Dinaric Karst in Croatia. *European Water Management*, 1(1), 15–25.
- Swerdlow, H., Dew-Jager, K.E., Brady, K., Grey, R., Dovichi, N.J. and Gesteland, R. (1992). Stability of capillary gels for automated sequencing of DNA. *Electrophoresis*, 13(1), 475–483.
- Székely, A.J. and Langenheder, S. (2013). The importance of species sorting differs between habitat generalists and specialists in bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 102–112.
- Šegota T. and Filipčić A. (2003.). Köppenova podjela klima i hrvatsko nazivlje. *Geoadria* 8(1), 17–23.
- Šimek, K., Weinbauer, M.G., Hornák, K., Jezbera, J., Nedoma, J. and Dolan, J.R. (2007). Grazer and virus-induced mortality of bacterioplankton accelerates development of *Flectobacillus* populations in a freshwater community. *Environmental Microbiology*, 9(3), 789–800.
- Torres, C.I., Kato Marcus, A. and Rittmann, B.E. (2008). Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(5), 872–881.
- van Buuren, S. and Groothuis-Oudshoorn, K. (2011). mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *Journal of Statistical Software*, 45(3), 1–67.
- Vurnek, M., Brozinčević, A., Briški, F., and Kepčija, R.M. (2016). Distributional patterns of fecal indicator bacteria in spring area of Plitvice Lakes National park. *Periodicum Biologorum*, 118(1), 37–44.
- Wan, Y., Ruan, X., Zhang, Y. and Li, R. (2017). Illumina sequencing-based analysis of sediment bacteria community in different trophic status freshwater lakes. *Microbiology Open*, 6(4), 1–15.
- Yadav A., Yadav N., Kour D., Kumar A., Yadav K., Kumar A., Rastegari A., Ghosh Sachan S., Singh B., Chauhan V. and Saxena A. (2019): Bacterial community composition in lakes. In: S.A. Bandh, S. Shafi and Nowsheen Shameem (eds.) *Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems*. *Academic Press*, 1–71.
- Yang, B., Wang, Y. and Qian, P.-Y. (2016a). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17, 1–8.
- Yang, C., Liu, Y., Zhu, Y. and Zhang, Y., (2016b). Insights into the binding interactions of autochthonous dissolved organic matter released from *Microcystis aeruginosa* with pyrene using spectroscopy. *Marine Pollution Bulletin*, 104(1-2), 113–120.
- Yang, J., Jiang, H., Dong, H., Wang, H., Wu, G., Hou, W., Liu, W., Zhang, C., Sun, Y. and Lai, Z. (2013). amoA-encoding archaea and thaumarchaeol in the lakes on the northeastern Qinghai-Tibetan Plateau, China. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–17.

- Yannarell, A. C. and Triplett, E. W. (2005). Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 227–239.
- Yu, Z., Yang, J., Amalfitano, S., Yu, X. and Liu, L. (2014). Effects of water stratification and mixing on microbial community structure in a subtropical deep reservoir. *Scientific Reports*, 4, 1–7.
- Zhang, L., Zhao, T., Wang, Q., Li, L., Shen, T. and Gao, G. (2019). Bacterial community composition in aquatic and sediment samples with spatiotemporal dynamics in large, shallow, eutrophic Lake Chaohu, China. *Journal of Freshwater Ecology*, 34(1), 575–589.
- Zhou, Y., Davidson, T.A., Yao, X., Zhang, Y., Jeppesen, E., de Souza, J.G., Wu, H., Shi, K. and Qin, B. (2018). How autochthonous dissolved organic matter responds to eutrophication and climate warming: Evidence from a cross-continental data analysis and experiments. *Earth-Science Reviews*, 185, 928–937.
- Zhou, Z., Tran, P.Q., Kieft, K. and Anantharaman, K. (2020). Genome diversification in globally distributed novel marine Proteobacteria is linked to environmental adaptation. *The ISME Journal* 14(8), 2060–2077.
- Žutinić, P., Kralj Borojević, K., Gligora Udovič, M., Dujmović, A. and Plenković-Moraj, A. (2009) Raznolikost fitoplanktona u Plitvičkim jezerima. *Zbornik sažetaka 10. Hrvatskog Biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem*.

Internetski izvori

- URL 1: www.geoportal.hr (pristupljeno 07.03.2021)
- URL 2: <http://sequencing.roche.com> (pristupljeno 20.05.2021)
- URL 3: <https://nanoporetech.com> (pristupljeno 20.05.2021)
- URL 4: <https://www.ab-solid.eu> (pristupljeno 20.05.2021)
- URL 5: <https://www.biocompare.com> (pristupljeno 20.05.2021)
- URL 6: <https://www.illumina.com> (pristupljeno 20.05.2021)
- URL 7: <https://www.pacb.com> (pristupljeno 20.05.2021)
- URL 8: <https://www.np-plitvicka-jezera.hr> (pristupljeno 08.10.2021)

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1996. godine u Rijeci, gdje sam završila osnovnu školu i Prirodoslovna i grafička škola Rijeka (smjer Prirodoslovna gimnazija). Preddiplomski studij znanosti o okolišu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2015. godine. Zvanje prvostupnika struke znanosti o okolišu stekla sam 2018. godine nakon čega upisujem Diplomski studij ekologije i zaštite prirode (modul more) na Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studijskog obrazovanja, odradila sam laboratorijsku stručnu praksu u Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju (Zavod za istraživanje mora i okoliša) na Institutu Ruđer Bošković. Uz to, aktivno sam volontirala u Udruzi studenata biologije – BIUS od 2015. godine. Za voditelja Sekcije za herpetologiju izabrana sam 2016. godine, 2017. godine postajem članica Upravnog odbora, a zatim 2018. godine dopredsjednica Udruge. Uz navedeno, sudjelovala sam u organiziranju 5. Simpozija studenata bioloških usmjerenja.

PRILOZI

Prilog 1. Minimalne (min), maksimalne (max) i prosječne vrijednosti (avg) te standardna devijacija (stdev) za 13 fizikalno – kemijskih čimbenike za istraživano područje.

	Konduktivitet μS/cm	ODO (mg/L)	Salinitet (PSU)	pH	T (°C)	DIC (mg/L)	DOC (mg/L)	[Ca ²⁺] (mM)	[Mg ²⁺] (mM)	[Na ⁺] (mM)	[Cl ⁻] (mM)	[SO ₄ ²⁻] (mM)	[NO ₃] (mM)
min	203.06	9.33	0.15	7.52	5.10	12.48	0.45	1.39	0.69	0.01	0.02	0.03	0.01
max	511.00	12.12	0.27	8.57	8.37	17.87	2.63	2.23	1.63	0.88	1.03	0.05	0.10
avg	329.04	11.05	0.22	8.15	6.62	14.76	1.04	1.72	1.04	0.07	0.09	0.04	0.06
stdev	71.55	0.78	0.03	0.30	0.95	1.26	0.54	0.18	0.25	0.17	0.20	0.01	0.02

Prilog 2. Statistički pregled analize varijance (ANOVA) između alfa raznolikosti i lokacija istraživanog područja (statistička značajna razlika(p): < 0.001***; <0.01 **, <0.05*)

	Bogatstvo OTU	Shannon	Simpson	ACE	Chao1	Pokrivenost (%)
F	23.3	7.41	1.163	30.84	28.83	1.223
p	0.0000591***	0.00377 **	0.431	0.0000211***	0.0000262***	0.401