

Utjecaj organskog opterećenja na sastav i brojnost bakterijskih populacija u morskom sedimentu ribogojilišta zadarskoga arhipelaga

Vuk, Sandro

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:455994>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sandro Vuk

**Utjecaj organskog opterećenja na sastav i brojnost
bakterijskih populacija u morskom sedimentu ribogojilišta
zadarskoga arhipelaga**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za procese taloženja na Zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom dr.sc Sandija Orlića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar edukacije biologije i kemije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj organskog opterećenja na sastav i brojnost bakterijskih populacija u morskom sedimentu ribogojilišta zadarskoga arhipelaga

Sandro Vuk

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bakterije morskih ekosustava široko su rasprostranjene i slabo istražene, iako predstavljaju brojnu i značajnu mikrobnu skupinu. Da bi se utvrdila uloga bakterija u biogeokemijskim procesima nužno je poznavanje njihove taksonomije te vremenske i prostorne rasprostranjenosti. Cilj rada bio je usporediti sastav bakterijskih populacija u morskom sedimentu ispod ribogojilišta, te na lokalitetima udaljenima 50 m i 100 m od ribogojilišta. Metoda odabrana za taksonomsku karakterizaciju bakterijskih populacija bilo je sekvenciranje sljedeće generacije temeljeno na analizi gena za 16S rRNA. Pretpostavka istraživanja bila je da je zbog suviška hrane te metaboličkih produkata riba organsko opterećenje u sedimentu ispod ribogojilišta veće što može imati utjecaj na strukturu bakterijskih populacija. Rezultati su potvrdili da je bioraznolikost bakterija u sedimentu ispod samog ribogojilišta veća od one zabilježene na udaljenijim lokalitetima. Najveći broj identificiranih bakterija pripada upravo skupinama s važnom ulogom u preradi organskih molekula.

(44 stranice, 21 slika, 3 tablice, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: ekosustav, populacija, taksonomija, sekvenciranje, bioraznolikost, 16S rRNA

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

Suvoditelj: Dr.sc. Silvija Černi, doc.

Ocjenitelji:

Dr. sc. Silvija Černi, doc.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Dr. sc. Vesna Petrović Peroković, izv. prof.

Rad prihvaćen na sjednici povjerenstva za diplomske radove: 29. 11. 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of science
Division of Biology

Graduation Thesis

Influence of organic load on bacterial population structure in marine sediment at two fish farm in the Zadar archipelago

Sandro Vuk

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Marine ecosystems bacteria are widespread and poorly researched although they represent a very large and significant microbial group. In order to determine the role of bacteria in biogeochemical processes, it is necessary to know their taxonomy as well as time and spatial distribution. The aim of this paper was to compare the composition of bacterial populations in the marine sediment below the fish farm, and the localities 50 m and 100 m away from the fish farm. The assumption of the study is that due to excessive food and metabolic fish products the organic load in the sediment below the fish farm is higher. The method used for taxonomic characterization of bacterial populations is the next-generation sequencing method based on 16S rRNA gene analysis. The results indicate that the biodegradability of bacteria in the marine sediment below the fish farm itself is greater than that observed in the distant localities. The largest number of bacteria identified belongs to groups important in the processing of organic molecules, which may indicate the selection effect of organic load within the fish farm.

(44 pages, 21 figures, 3 tables, 57 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words:ecosystem, population, taksonomy, sequencing, fish farm, biodiverisity,16S rRNA

Supervisor: Dr. Sandi Orlić, senior scientific associate

Co supervisor: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Reviewers:

Dr. sc. Silvija Černi, Asst. Prof.

Dr. sc. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. sc. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 29. 11. 2018.

SADRŽAJ

<u>1. UVOD</u>	1
1.1 Taksonomija bakterija.....	2
1.2 Građa bakterijske stanice.....	3
1.3 Ekološka uloga bakterija.....	4
1.4 Bakterije u morskim ekosustavima.....	7
1.5 Raznolikost bakterija u morskom sedimentu Jadranskog mora.....	9
1.6 Ribogojilišta te njihov utjecaj na ekološko stanje.....	9
1.7 Metode za proučavanje bakterija u okolišu.....	12
1.8 Ciljevi istraživanja.....	15
<u>2. MATERIJALI I METODE</u>	16
2.1 Uzorkovanje.....	17
2.2 Ekstrakcija DNA.....	18
2.3 Lančane reakcije polimerazom (PCR).....	19
2.4 Elektroforeza umnoženih fragmenata u gelu agaroze.....	19
2.5 Metoda sekvenciranja sljedeće generacije (NGS).....	20
2.6 Obrada podataka.....	20
<u>3. REZULTATI</u>	21
3.1 Rezultati elektroforeze u agaroznom gelu.....	22
3.2 Obrada sekvenci dobivenih metodom sekvenciranja sljedeće generacije.....	23
3.2 Taksonomska pripadnost bakterija determiniranih u uzorcima sedimenta.....	24
3.3 Postotak sekvenci gena za 16S rRNA pojedinih rodova u uzorcima.....	26
<u>4. RASPRAVA</u>	32
<u>5. ZAKLJUČAK</u>	37

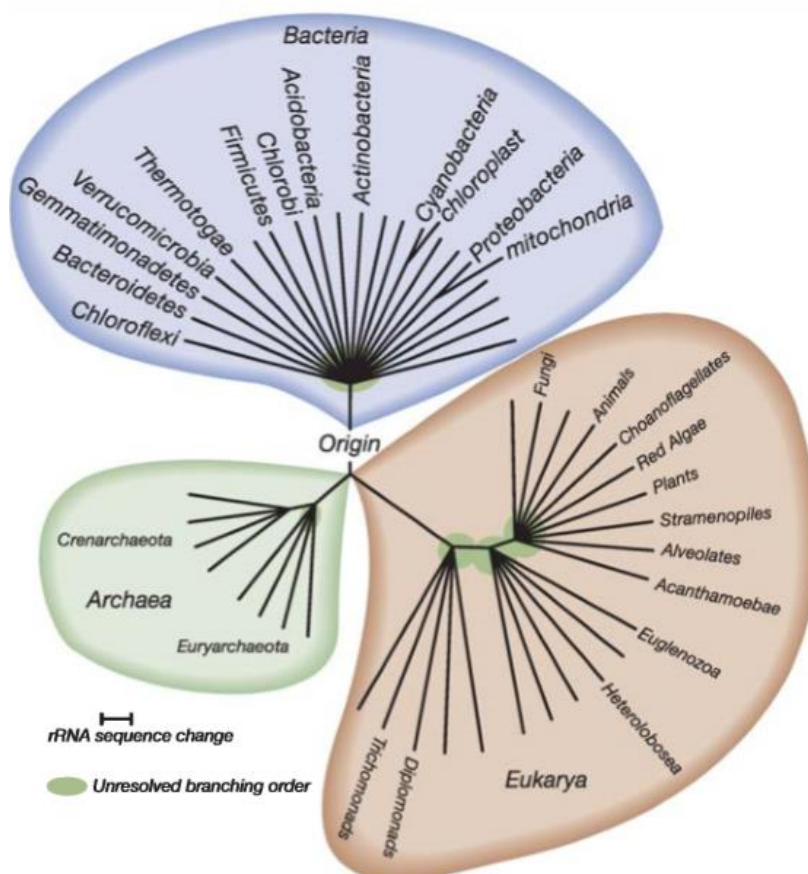
6. LITERATURA.....39

ŽIVOTOPIS.....44

1. UVOD

1.1 TAKSONOMIJA BAKTERIJA

Na temelju filogenetske srodnosti živi svijet podijeljen je u 3 domene: *Bacteria*, *Archea* i *Eucarya* (Willey i sur. 2013) (Slika 1). S izuzetkom virusa i subvirusnih patogena koji nisu svrstani u opisane domene, mikroorganizmi su široka skupina organizama te pripadaju domenama *Bacteria* i *Archea*. Tipična veličina bakterijskih stanica kreće se između 1 i 10 μm te su vidljive svjetlosnim mikroskopom. Veličina bakterijskih stanica varira od veličine mikoplazmi (0,3 do 0,8 μm) do veličine cijanobakterija (promjer 10 μm) (Willey i sur. 2013). Bakterije imaju važnu ulogu u svim ekosustavima, procesu bioremedijacije te ciklusima kruženja tvari u prirodi. U domenu *Bacteria* pripadaju jednostanični organizmi koje uglavnom karakterizira stanična stjenka građena od peptidoglikana. Organizmi koji pripadaju navedenoj domeni naseljavaju gotovo sva staništa poput tla, vode, zraka, uključujući ekstremna staništa visokih temperatura, različitih pH-vrijednosti ili saliniteta (Willey i sur. 2013).



Slika 1. Domene živog svijeta prema Carlu Woeseu dobivene usporedbom rRNA sekvenca
Preuzeto iz: Willey i sur. 2013

S obzirom na način prehrane, bakterije dijelimo na autotrofne i heterotrofne (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011). Autotrofne su one koje same stvaraju organske spojeve iz anorganskih te ih možemo podijeliti na fotoautotrofne i kemoautotrofne. Fotoautotrofne bakterije energiju za stvaranje organskih spojeva dobivaju iz sunčeve svjetlosti, dok kemoautotrofne energiju dobivaju oksidacijom anorganskih spojeva. Heterotrofne bakterije ne mogu samostalno proizvesti vlastite organske spojeve te se koriste gotovim organskim spojevima koje primaju iz okoliša. Možemo ih podijeliti na saprofitne, parazite i bakterije koje žive u simbiozi. Saprofiti razgrađuju spojeve uginulih životinjskih ili biljnih vrsta te ih koriste za sintezu vlastitih spojeva, paraziti organske spojeve dobivaju iz stanica domaćina na kojem parazitiraju, a mutualizam kao oblik simbioze predstavlja suživot dvaju ili više organizama od kojih oba imaju korist (Gerard i sur. 2014).

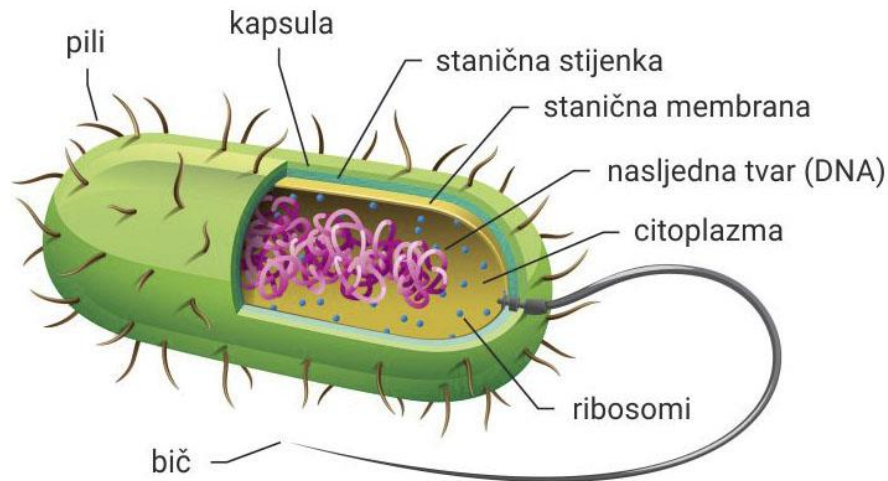
1.2 GRAĐA BAKTERIJSKE STANICE.

Prokariotske stanice nemaju jezgrinu ovojnicu niti organele iako postoje izuzetci, (npr. neke vrste bakterija koljena *Planctomycetes* koje nalazimo u moru i tlu imaju genetički materijal smješten unutar membrane) (Wiley i sur. 2011). Strukture (Slika 2) koje pronalazimo u bakterijskim stanicama su citoplazma u kojoj se nalazi genetski materijal bakterija koji nazivamo nukleoid te ribosomi. Uz nukleoid, bakterijske stanice mogu sadržavati i dodatne kružne molekule DNA nazvane plazmidima koje bakterijama omogućuju otpornost na antibiotike i druge prilagodbe na ekstremne životne uvjete. Sve bakterije posjeduju citoplazmatsku membranu dok se stanična stijenka koja obavija citoplazmatsku membranu nalazi kod gotovo svih bakterija. Specifične strukture koje nalazimo s vanjske strane bakterijskih stanica su bičevi te pili koji služe za pokretanje bakterija ili prihvaćanje za podlogu. Spolni pili omogućuju rekombinaciju genetskog materijala bakterija (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011).

S obzirom na bojanje po Gramu bakterije dijelimo u gram-pozitivne i gram-negativne. Ovakva podjela zasniva se na razlikama u građi stanične stijenke. Gram-pozitivne bakterije imaju deblji sloj peptidoglikana i boje se u ljubičasto, dok gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana i vanjsku membranu te se boje u crveno (Gerard i sur. 2014).

Bakterijske stanice mogu biti različite veličine ili oblika, a neki od najčešćih oblika su: koki (okruglaste stanice), bacili (izdužene stanice), spirili (zavijene stanice), vibriji (stanice poput zarez), koko-bacili (izduženi okruglasti oblik) te spirohete (specifične spiralne strukture).

Ostale skupine bakterija mogu biti pleomorfne, a te bakterije karakterizira varijacija u obliku što znači da nemaju jedan stalan prepoznatljiv oblik (Willey i sur. 2013).



Slika 2. Građa bakterijske stanice.

Preuzeto sa: www.edutorij.e-škola.hr

1.3 EKOLOŠKA ULOGA BAKTERIJA

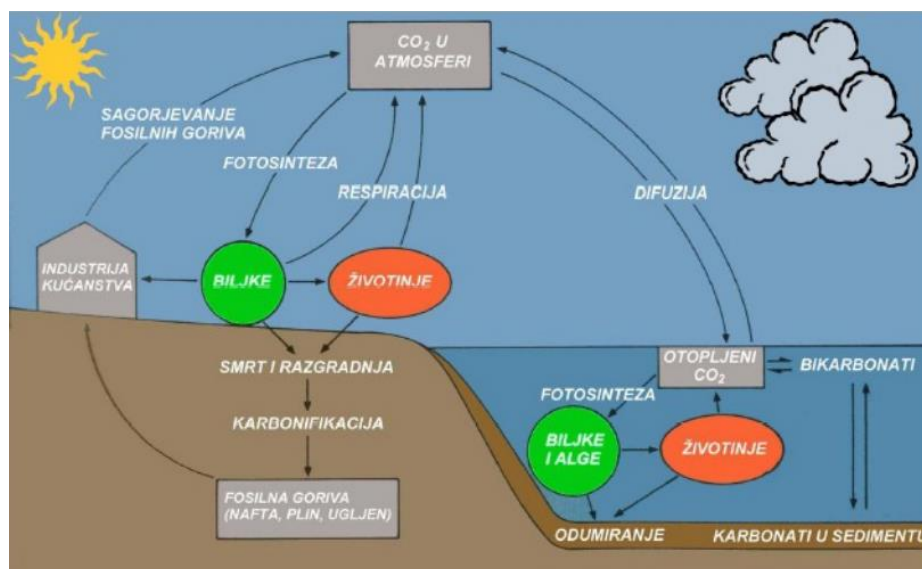
Mikroorganizmi imaju tri glavne uloge u transformaciji elemenata:

- a) Mineralizacija – konverzija organske forme elemenata u anorgansku formu
- b) Konverzija netopivih anorganskih formi elemenata u vodi topive forme
- c) Imobilizacija – konverzija anorganske forme elemenata u organsku formu

Biogeni elementi (ugljik, dušik, sumpor, fosfor i dr.) ugrađeni su u složene organske molekule u tkivima biljaka i životinja (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011). Mikroorganizmi razgrađuju mrtve organizme i organski otpad do jednostavnih anorganskih spojeva koji su ponovo uporabljivi za fotosintetske organizme te time sudjeluju u kruženjima tvari i elemenata u prirodi poput dušika, sumpora, ugljika te fosfora (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011).

Kruženje tvari u prirodi uvjetovano je biogeokemijskim ciklusima koji su rezultat bioloških i kemijskih procesa (Stevenson 1986). Ako je okoliš bogat komponentama visokog redoks-potencijala tada je skloniji redukciji, za razliku od okoliša bogatog komponentama niskog redoks-potencijala koji je skloniji oksidaciji (Katavić 2003).

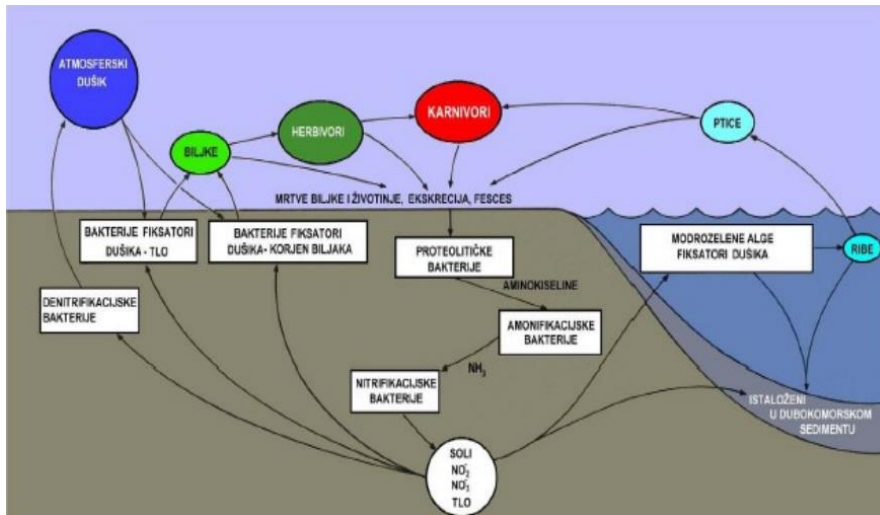
Kod kruženja ugljika u prirodi (Slika 3) važno je napomenuti da se ugljik može nalaziti u oksidiranoj formi (CO i CO_2) i reduciranoj formi (CH_4 i organske tvari). U morskim sedimentima najčešće se događa anaerobna oksidacija metana do ugljikova (IV) oksida (Katavić 2003).



Slika 3. Kruženje ugljika u prirodi.

Preuzeto iz: www.vuka.hr

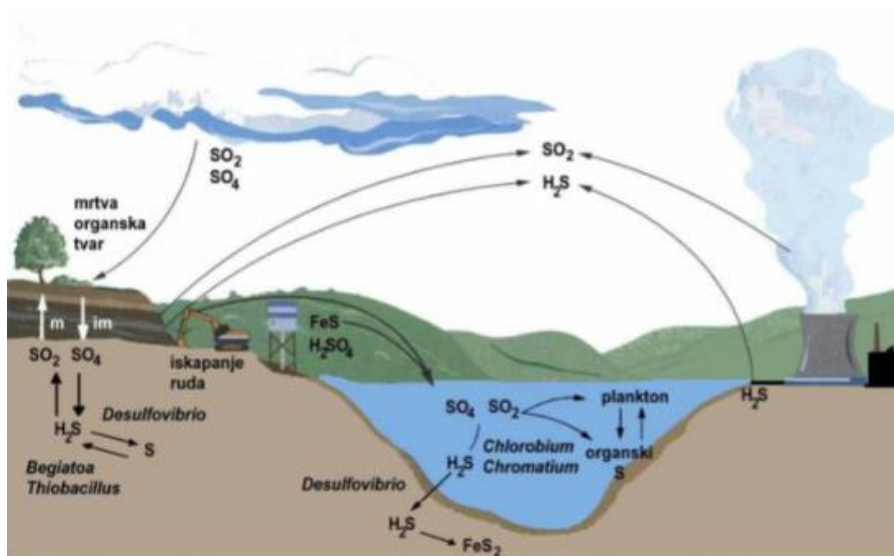
Kruženje dušika u prirodi (Slika 4) može se provoditi u aerobnim ili anaerobnim uvjetima. U početku ciklusa dolazi do fiksacije dušika u amonijak koji se ugrađuje u organsku tvar. Za ovaj dio ciklusa odgovorne su bakterije i arheje. U aerobnim uvjetima ovaj dio ciklusa mogu provoditi bakterije roda *Azobacter* dok u anaerobnim uvjetima bakterije roda *Clostridium*. Sljedeći korak u ciklusu kruženja dušika u prirodi je mineralizacija organske tvari i oslobađanje amonijevih iona. Nakon toga slijedi nitrifikacija u kojoj se amonijev ion pod utjecajem bakterija roda *Nitrosomonas* pretvara u nitritni ion, dok će bakterije roda *Nitrobacter*, u sljedećem koraku, pretvoriti nitrite u nitrate. Suprotan proces je denitrifikacija u kojem se reduciraju nitratni ioni u plinoviti dušik koji se otpušta u atmosferu (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011).



Slika 4. Kruženje dušika u prirodi.

Preuzeto iz: www.vuka.hr

Kruženje sumpora (Slika 5) također je bitno u ekološkim sustavima morskih sedimenata koji se također može provoditi u aerobnim ili anaerobnim uvjetima. Redukcija sulfatnih iona posredovana je biljkama i mikrobima koji procesom mineralizacije sulfatni ion pretvaraju u sumporovodik. Također, ovaj proces mogu provoditi bakterije roda *Desulfovibrio* koji je aerotolerantan. Nastali sumporovodik može ući u oksidacijski ciklus procesom anoksigene fotosinteze pri kojem se sumporovodik oksidira u elementarni sumpor djelovanjem bakterija roda *Thiobacillus* ili *Beggiatoa* (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011).



Slika 5. Kruženje sumpora u prirodi.

Preuzeto iz: www.slideserve.com

1.4 BAKTERIJE U MORSKIM EKOSUSTAVIMA

More predstavlja vrlo složen ekosustav u kojem mikroorganizmi igraju važnu ulogu u biogeokemijskim procesima i u kruženju tvari. U morskom ekosustavu žive predstavnici svih skupina mikroorganizama, uključujući viruse, autotrofne i heterotrofne prokariote (bakterije i arheje), te autotrofne i heterotrofne eukariotske organizme. Bakterije uz viruse predstavljaju najbrojniju i najznačajniju mikrobnu grupu. Radi utvrđivanja uloge bakterija u morskoj biogeokemiji nužno je poznavanje njihove taksonomije te njihove vremenske i prostorne rasprostranjenosti. Metodama klasične mikrobiologije (uzgoj na hranjivim podlogama) dobiva se uglavnom djelomični uvid u realnu sliku u tom složenom sustavu. Najrasprostranjenije koljeno koje pripada domeni *Bacteria* jest koljeno *Proteobacteria*. Ovome koljenu bakterija pripada najveći broj gram – negativnih bakterija. Bakterije ovog koljena prema načinu prehrane pripadaju kemoheterotrofima što znači da uzimaju gotovu organsku hranu iz okoliša (Gerard i sur. 2014, Wiley i sur. 2011).

Koljenu *Proteobacteria* pripadaju razredi *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* i *Epsilonproteobacteria*. Razred *Alphaproteobacteria* najveći je u koljenu *Proteobacteria*, a taj razred karakterizira mogućnost preživljavanja pri vrlo niskim koncentracijama nutrijenata. U koljenu *Betaproteobacteria* pripadaju anaerobne bakterije koje razgrađuju organske tvari te kao produkt nastaje vodik, amonijak i metan. U koljenu *Gammaproteobacteria* nalazimo bakterijske razrede koji naseljavaju morske sedimente između aerobnih i anaerobnih slojeva poput razreda *Beggiatoa*. U vodenim ekosustavima često se može pronaći razred *Vibrionales*. Ovaj razred pripada gram-negativnim bakterijama te su ove bakterije fakultativno anaerobne (Gerard i sur. 2014).

Razred *Desulfovibrionales* unutar koljena *Deltaproteobacteria* poznate su kao bakterije koje reduciraju sumpor. To su obvezatni anaerobi koji redukcijom sumpora ili sulfata iz podloge stvaraju sumporovodik. Zbog toga ova skupina bakterija ima važnu ulogu u kruženju sumpora u prirodi. Nastali sumporovodik koriste bakterije roda *Beggiatoa* kao izvor energije. Najbolje proučavani red ovog koljena je *Desulfovibrio* kojem pripadaju sumpor-reducirajuće bakterije, a nalazimo ih u anaerobnim staništima morskih sedimenata te probavnom traktu životinja i ljudi. Crna boja sedimenta posljedica je reakcije sumporovodika, koji nastaje kao produkt redukcije ovih bakterija, sa željezom pri čemu nastaje željezov (II) sulfid. Koljenu *Actinobacteria* pripadaju gram-pozitivnim bakterijama koje imaju mogućnost apsorpcije

nutrijenata u kompetitivnom okolišu. Ova skupina bakterija također naseljava različita staništa, a možemo ih pronaći u morskom sedimentu (Gerard i sur. 2014).

Morsko područje može se podijeliti na: pelagičko područje i bentosko područje. Pelagičko područje obuhvaća slobodnu vodu (vodeni stupac) ili pučinu te sve organizme koji žive u ovom području nazivamo pelagijal ili pelagos. Morsko dno naziva se bentosko područje te bentalom ili bentosom obuhvaćamo sve organizme koji tamo žive ili su ovisni o njemu (Petricioli 2007). Morski sediment čini materijal od kojeg je izgrađeno morsko dno, a sastoji se od anorganskih i organskih tvari te porne vode (voda koja ispunjava prostore između čestica sedimenta). Sediment može nastati trošenjem i erozijom stijena, aktivnostima organizama, vulkanskih erupcija te kemijskim procesima u morskoj vodi. Podjelu sedimenta vršimo prema teksturi, odnosno veličini čestica (Tablica 1) (Pikelj i Juračić 2015).

Tablica 1. Wentworthova skala podjele morskog sedimenta (reuzeto sa: www.jadran.izor.hr)

Materijal	Veličina čestica
STIJENA	>2 mm
PIJESAK	62 μ m – 1 mm
MULJ	4 – 31 μ m
GLINA	<1,5 μ m

U moru može nastati nekoliko tipova sedimenata, a najznačajniji su:

- a) Litogeni – prevladavaju uz rubove oceana
- b) Hidrogeni – kemogeni koji nastaju direkto iz otopine
- c) Biogeni – prevladavaju u otvorenim morima, a nastaju djelovanjem organizama

Za proučavanje strukture i uloge organizama u stvaranju sedimenta, najznačajniju ulogu u biologiji imaju sedimenti biogenog djelovanja, koji su nastali od ostataka uginulih biljnih ili životinjskih skupina. U biogenom sedimentu nalazimo i bakterije koje doprinose stvaranju određenog tipa biogenog sedimenta koji može biti građen od vapnenca, fosfata i ugljena. Bakterije u takvom sedimentu imaju ključnu ulogu u razgradnji organskih tvari dospjelih do morskog dna kao i u procesu kruženja određenih elemenata u morskih ekosustavima (Pikelj i Juračić 2015).

1.5 RAZNOLIKOST BAKTERIJA U SEDIMENTU JADRANSKOG MORA

Morski sediment Jadrana do sada je dosta istražen te pokazuje veliku raznolikost bakterijskih populacija. Prema dosadašnjim istraživanjima (Gacesa i sur. 2018, Katavić 2003) pokazano je da se u najvećem udjelu u morskom sedimentu pojavljuje koljeno bakterija *Proteobacteria*. Ovom koljenu bakterija pripadaju bakterije koje se još nazivaju i „purpurne bakterije“ te pripada gram-negativnim bakterijama. Sljedeće koljeno bakterija koje je karakterizirano u morskom sedimentu je koljeno *Bacteroidetes*. Ovo koljeno bakterija široko je rasprostranjeno te nastanjuje staništa poput tla, sedimenta, morske vode kao i probavnog trakta i kože životinja. Bakterijsko koljeno *Bacteroidetes* pripada skupini gram-negativnih aerobnih ili anaerobnih štapićastih bakterija. Sljedeće koljeno koje nalazimo u morskom sedimentu je koljeno *Firmicutes*. Također gram-negativne bakterije koje nastanjuju ekstremna staništa. Koljeno *Actinobacteria* pripada gram-pozitivnim bakterijama koje nastanjuju gotovo sva staništa. Ovaj red važan je u procesu razgradnje organske tvari uginulih organizama. Metagenomskom analizom uzoraka identificirane su i neke vrste bakterija prisutne u morskom sedimentu: *Woeseia oceani*, *Halioglobus pacificus*, *Halioglobus japonicus*, *Maribacter* sp., *Immundisolibacter cernigliae* (Gacesa i sur. 2018).

Također, dosadašnja istraživanja (Katavić 2003) pokazala su da pretjeranim gomilanjem organskog opterećenja u morskom sedimentu dolazi do stvaranja anaerobnih uvjeta koji pospješuju stvaranje bakterijskih populacija koje nastanjuju takva područja. Na takvim područjima pokazano je da se u anaerobnim uvjetima pojavljuju heterotrofne bakterije iz roda *Beggiatoa* kao i sumporne bakterije.

1.6 RIBOGOJILIŠTA TE NJIHOV UTJECAJ NA EKOLOŠKO STANJE

Intenzivni uzgoj životinja predstavlja proces kontroliranog držanja organizama radi postizanja rasta biomase ili povećanja broja jedinki uzgajane populacije. Akvakultura je uzgoj akvatičkih organizama (uključujući ribe, mekušce, vodeno bilje, gmazove vodenih staništa i vodozemce) gdje se poboljšanja u proizvodnji temelje na intervencijama u uzgojnom procesu (Slika 6). Uzgoj u smislu Zakona o morskom ribarstvu gospodarska je djelatnost kontrolirane reprodukcije i rasta riba i drugih morskih organizama.

Marikultura obuhvaća uzgoj akvatičkih organizama u vodenom okolišu, gdje slanost prelazi 20 ‰. Kavezi za uzgoj organizama obuhvaćaju potopljene, plutajuće ili položene strukture od mreže (različitih materijala) koje uzgajane organizme odjeljuju od okoliša i koje s okolišem slobodno izmjenjuju vodu (more) (Bavčević 2014).

Kavezni uzgoj riba treba obavljati u područjima koja su pogodna za provođenje tehnologije uzgoja, sukladno ekonomskoj održivosti i kapacitetu okoliša. Marikultura zahtjeva mirne i čiste lokacije udaljene od turističkih i lučkih središta i time je direktna kompeticija turizmu, no na našoj razvedenoj obali postoji velik broj uvala u kojoj je uzgoj ribe moguć (<http://www.ss-veterinarska-zg.skole.hr/>). Lokacija za uzgoj određuje se prostornim planovima na temelju kriterija. To su biofizičke karakteristike i potrebna infrastruktura. Biofizičke karakteristike su izloženost lokacije otvorenom moru, dubina, vjetar: brzina morskih struja, valovi pridnena topografija: nagib, podmorske barijere-pragovi; struktura i sastav sedimenta, suspendirane tvari, kakvoća mora, količina mora u odnosu na uzgojenu biomasu, trofički status, struktura i sastav bentoskih zajednica, okolna autohtona ihtiofauna i predatori (<http://narodne-novine.nn.hr/clanci/>).

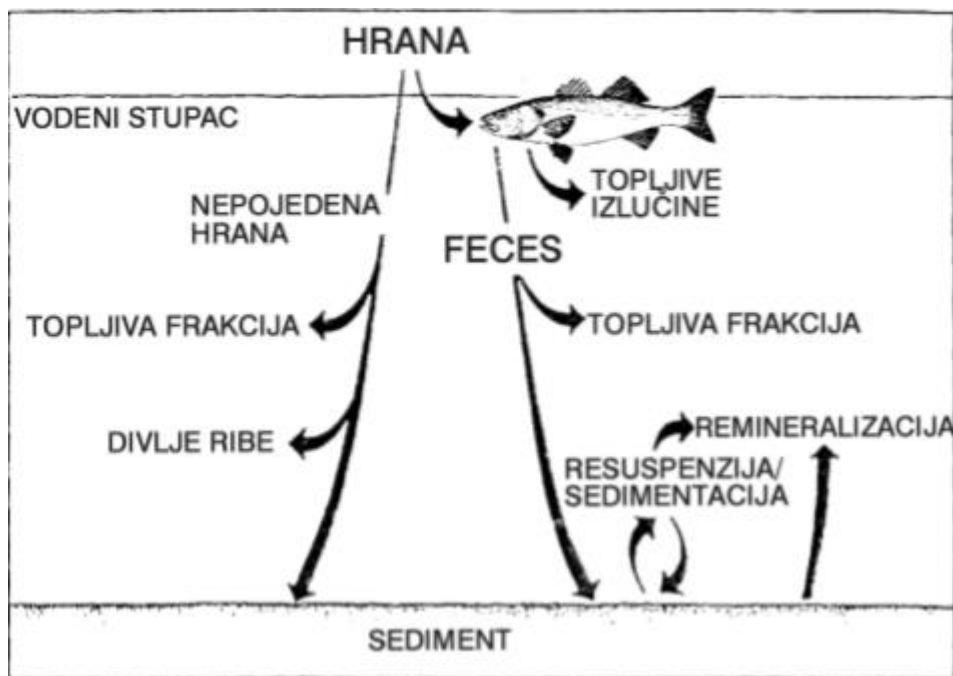


Slika 6. Kavezni uzgoj riba.

Preuzeto sa: www.makarska-post.com

Sudbinu organskog otpada te produkata metabolizma riba kaveznog uzgoja uvelike određuju abiotički i biotički čimbenici Jadranskog mora. Temperatura Jadranskog mora kreće se između 10 i 25 °C što je razlog brzog metabolizma koji utječe na proizvodnju riba kao i na

mikrobiološku aktivnost. Mala masa fitoplanktona uvjetuje prozirnost vode što omogućuju fotosintetske procese u dubljim slojevima čime je omogućena razmjerno velika biološka raznolikost. Organske tvari dospjele u morski okoliš podložne su razgradnji, resuspenziji te mikrobiološkoj aktivnosti (Katavić 2003) (Slika 7). Riblji kavezi proizvode veliku količinu organske tvari ponajviše u obliku zaostalih paleta kojima se ribe hrane i izmetu samih riba (Diaz-Almela i sur. 2008). Širok spektar promjena je zabilježen u blizini ribljih kaveza kao što su: povećan broj i aktivnost bakterija, promjene u strukturi bentičkih zajednica, povlačenje i uginuće bentičkih algi, akumulacija dušika i fosfora u sedimentu kao i mnogi drugi. Važno je napomenuti da je utjecaj ribljih kaveza puno izraženiji na bentos nego na plankton zbog akumulacije tvari u sedimentu (Apostolaki i sur. 2007).



Slika 7. Sudbina nepojedene hrane pri intenzivnom kaveznom uzgoju ribe.

Preuzeto iz: Katavić 2003.

U organska opterećenja unutar ribogojilišta ubrajaju se nepojedeni ostaci hrane kojom se hrani određena populacija riba u samom ribogojilištu te metabolički produkti tih riba. Ukoliko dođe do neravnoteže unosa organskog opterećenja u ekosustav, može doći do taloženja organskih tvari što će rezultirati razvojem heterotrofnih bakterija (osobito roda *Beggiatoa*). Ukoliko dođe do pretjeranog nakupljanja neprerađene organske tvari na površini sedimenta doći će do stvaranja sloja bakterija koji će spriječiti ulazak morske vode u sediment. To može rezultirati

smanjenjem aktivnosti meiofaune što će dovesti do daljnjeg nakupljanja organske tvari i poremećaja u ekosustavu. Nagomilana organska tvar i uginuli organizmi podložni su procesima razgradnje koji troše dodatne količine kisika što će rezultirati anaerobnih uvjeta što u konačnici može dovesti do produkcija sumporovodika i metana (Katavić 2003).

Dosadašnja istraživanja utjecaja ribogojilišta na okoliš pokazala su potencijalno negativni utjecaj na strukturu i sastav bentoskih zajednica. Nekoliko istraživanja zabilježilo je pojavu crnog sedimenta poznatog pod nazivom „sediment ribogojilišta“. U takvom sedimentu najviše se nalazilo organskih tvari te feopigmenata dok je taj sediment karakterizirao niski redoks-potencijal (Matijević i sur. 2010). Uz to povećana je koncentracija ukupnog dušika i fosfora. Ovim istraživanjima debljina i kemijski sastav su varirali s obzirom na udaljenost od samog ribogojilišta. Debljina sedimenta primjetno se smanjivala s udaljenošću od ribogojilišta. Ukoliko akumulacija organske tvari u sedimentu bude toliko visoka da se njena oksidacija ne može izvršiti aerobnim ili subaerobnim putem, tada redoks-potencijal sedimenta postaje negativan što može stvoriti anaerobne uvjete. U takvim anaerobnim uvjetima dolazi do povećanja populacije npr. sumpornih bakterija. (Katavić 2003, Kružić i sur. 2014).

1.7 METODE ZA PROUČAVANJE BAKTERIJA U OKOLIŠU

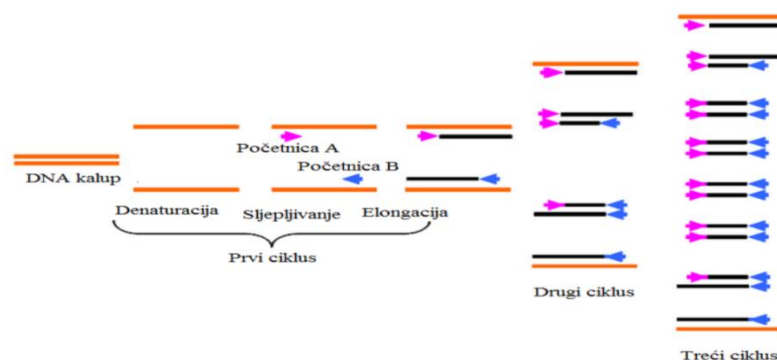
Osnovna metoda u proučavanju bakterijskih stanica je mikroskopija koja se koristi za proučavanje mikrobnog fenotipa. Kao glavni nedostatak ove metode ističe se njezina nepouzdanost jer je samim promatranjem bakterija pod mikroskopom teško odrediti koje su bakterijske vrste prisutne u uzorku.

Jedna od najčešće korištenih metoda za proučavanje bakterije je uzgoj na hranidbenim podlogama pri čemu se bakterije mogu selektirati s obzirom na uporabu specifičnih hranjivih podloga. Pri selekciji, mogu se koristiti krute i tekuće hranjive podloge. Tekuće hranjive podloge dobiju se otapanjem organskih tvari koje se koriste za rast i razvoj bakterija u destiliranoj vodi, dok se krute hranjive podloge dobiju na način da se u tekuću hranjivu podlogu doda agar (produkt crvene morske alge).

Nešto složenije i specifičnije su molekularne metode u određivanju bakterijskih zajednica. Takva identifikacija mikrobnih zajednica vezana je uz identifikaciju gena za 16S rRNA molekule. Određivanje strukture zajednice može se provesti posrednim metodama poput denaturirajuće gradijentne elektroforeze (engl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) ili

polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenta (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), sekvenciranjem ciljnog gena ili fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom (FISH, engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*). Posredne metode baziraju se na amplifikaciji ciljnog gena te detekciji produkata denaturacije (DGGE) ili restrikcije ciljnog gena (RFLP). Ovakve metode omogućuju posrednu usporedbu sastava zajednica, međutim ne dozvoljavaju identifikaciju pojedinih skupina zajednice. Sve metode zahtijevaju primarni korak izolacija okolišne DNA ili fiksiranja i filtracije mikrobnih stanica na filtre željene veličine u slučaju FISH-a (Korlević 2015).

Lančanom reakcijom polimerazom umnožavaju se željeni sljedovi nukleotida (slika 8). Ovom metodom se kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija. Ciljni dio DNA koji se želi umnožiti omeđuje se kratkim oligonukleotidnim sekvencama koje zovemo početnice, a koje su komplementarne krajevima ulomka DNA od interesa. Enzim DNA – polimeraza na temelju lanca kalupa sintetizira novi lanac na temelju komplementarnosti baza. Veličina sintetiziranog lanca odgovara dužini koju omeđuju izabrane početnice. U prvom koraku dvostruki lanac DNA razdvoji se zagrijavanjem na temperaturi od 94 °C kroz 3 minute. Hlađenjem na temperaturu između 50 i 60 °C dolazi do komplementarnog vezanja početnica što omogućuje vezanje Taq polimeraze koja započinje sintezu novog lanca dodavanjem komplementarnih baza. Prosječno se PCR reakcija odvija u 30 do 35 ciklusa (Cooper 2010). Nakon ovog procesa dobiveni sljedovi nukleotida mogu se determinirati metodom sekvenciranja sljedeće generacije.



Slika 8. Lančana reakcija polimerazom.

Preuzeto sa: www.slideshare.net

U današnje vrijeme često se koristi metoda sekvenciranja sljedeće generacije koja omogućuje dobivanje nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća sljedova nukleotida u kratkom vremenu. Ova metoda koristi se za identifikaciju bakterija umnažanjem sljedova nukleotida karakterističnih za bakterije (regija gena za 16s rRNA) (Goodwin i sur. 2016). Ova metoda

koristi nekoliko različitih pristupa kojima se sljedovi nukleotida utvrđuju puno brže i jeftinije nego klasičnim metodama. Otkriće ove metode imalo je važnu primjenu u sekvenciranju ljudskog genoma, kao i u otkrivanju brojnih genetskih bolesti (Shendure i sur. 2017). Metodama sekvenciranja, pogotovo sekvenciranja nove generacije, moguće je dobiti detaljan uvid u raznolikost zajednica bakterija i arheja. Metoda sekvenciranja sljedeće generacije uključuje nekoliko različitih metoda u kojima se predlošci sekvenciraju istodobno u jednoj reakciji. U prvom koraku dolazi do fragmentiranja DNA na čije se fragmente dodaju aditivne sekvence (oligonukleotidi koji služe kao početnice za umnažanje i sekvenciranje). Predlošci se zatim sekvenciraju pomoću lasera koji prate ugrađivanje fluorescentnih nukleotida. Najpoznatija metoda sekvenciranja je Sangerova metoda koju je ovaj znanstvenik započeo 1975. godine., a temelji se na razdvajanju DNA molekule koja se razlikuje u jednom nukleotidu pomoću gel elektroforeze. Sangerova metoda sekvenciranja dugotrajniji je i skuplji proces (Gvozdanović i sur. 2015).

Za razliku od Sangerove metode sekvenciranja, ova metoda omogućuje čitanje puno odsječaka DNA odjednom te se time ubrzava sam proces sekvenciranja. Razlikujemo nekoliko tehnika sekvenciranja metodom sljedeće generacije:

- a) Pirosekvenciranje
- b) Sekvenciranje sintezom
- c) Sekvenciranje vezivanjem

Prednosti metode sekvenciranja sljedeće generacije su manji broj pogrešaka tijekom obrade uzoraka te veći broj podataka dobiven u kratkom vremenskom periodu zbog čega je ovo jeftinija metoda od Sangerova koja zahtijeva dulje vrijeme za obradu uzoraka te veći ljudski faktor (Gvozdanović i sur. 2015). U ovom istraživanju metoda sekvenciranja sljedeće generacije koristila se za određivanje RNA sekvenci regije gena za 16S rRNA (regije V3 – V4) pomoću kojih se mogu odrediti bakterijske skupine prisutne u uzorku (Cooper 2010).

1.8 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog bio je identificirati i karakterizirati bakterijske populacije u morskom sedimentu uzorkovanom unutar ribogojilišta, kao i na lokalitetima izvan ribogojilišta. Iz ranijih istraživanja je poznato da intenzivni uzgoj ribe dovodi do obogaćivanja mora nutrijentima (Kružić i sur. 2014), te je pretpostavka ovog istraživanja bila da će se struktura bakterijskih populacija u morskom sedimentu ispod samog ribogojilišta razlikovati od one na lokalitetima izvan ribogojilišta.

Specifični ciljevi:

- pomoću analize nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA identificirati i kvantificirati bakterije prisutne u različitim uzorcima morskog sedimenta
- usporediti sastav bakterija prisutnih u morskom sedimentu na lokalitetima ispod samih ribogojilišta i onima udaljenim 50 i 100 m od ribogojilišta
- procijeniti utjecaj organskog opterećenja na mjestu uzorkovanja na strukturu bakterijskih populacija

2. MATERIJALI I METODE

2.1 UZORKOVANJE

U istraživanju je korišteno 6 uzoraka površinskog sedimenta morskog dna uzetih u svibnju 2018. standardnim postupkom uzimanja uzoraka pomoću grabila (KC DENMARK A/C). Uzorkovanje je obavljeno od strane djelatnika Zavoda za javno zdravstvo Zadarske županije te djelatnika Instituta Ruđer Bošković, a uzorci su pohranjeni u zamrzivaču pri -80°C . Uzorkovani sediment podrijetlom je iz dva ribogojilišta brancina u zadarskom arhipelagu (Slika 9). Po jedan uzorak uzet je unutar svakog ribogojilišta, a po dva uzorka uzeta su u točkama udaljenima 50 metara i 100 metara od samih ribogojilišta.

Ribogojilište A: uzorak 1 prikupljen je ispod samog ribogojilišta, uzorak 2 prikupljen 50 metara od ribogojilišta, dok je uzorak 3 prikupljen 100 metara od ribogojilišta.

Ribogojilište B: uzorak 4 prikupljen je ispod samog ribogojilišta, uzorak 5 prikupljen 50 metara od ribogojilišta, dok je uzorak 6 prikupljen 100 metara od ribogojilišta.

Ribogojilišta brancina u kojima je provedeno uzorkovanje privatno su vlasništvo te je izradom ovog diplomskog rada zajamčena tajnost podataka točne lokacije samih ribogojilišta kao i specifičnih pojedinosti oko uzgoja riba i tretiranja ribogojilišta.

2.2 IZOLACIJA DNA

Nakon što su uzorci dopremljeni na Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, provedena je izolacija ukupne DNA iz svakog pojedinog uzorka metodom izolacije DNA koristeći komercijalni komplet reagensa „*DNeasy PowerSoil kit*“ (Qiagen) čiji je protokol opisan u daljnjem tekstu.

Protokol DNeasy Powersoli Kit:

Izolacija ukupne DNA provedena je prema navedenom protokolu za svaki uzorak pojedinačno (uzorci su označeni brojevima 1-6).

0,25 g uzorka sedimenta stavio sam u PowerBead tubu te lagano miješao na vrtložnoj miješalici. Dodao sam 60 μ l pufera C1 te kratko miješao na vrtložnoj miješalici. Epruvetu s uzorkom posložio sam horizontalno u Vortex adapter (13000 – V1 – 24). Uzorak sam zatim ostavio u vrtložnoj miješalici na maksimalnoj brzini 10 minuta. Nakon toga uzorak sam centrifugirao na 10,000 x g 30 sekundi. Nakon centrifugiranja izdvojio sam dobiveni supernatant u čistu epruvetu od 2 ml. Dodao 250 μ l pufera C2 i miješao na vrtložnoj miješalici 5 sekundi, nakon čega sam uzorke stavio na inkubiranje 5 minuta na 4 °C. Nakon inkubiranja centrifugirao sam uzorak 1 minutu na 10,000 x g. Izdvojio 600 μ l supernatanta u čiste epruvete od 2 ml. Tada sam dodao 200 μ l pufera C3 i lagano miješao na vrtložnoj miješalici te inkubirao uzorak 5 minuta na 4 °C. Ponovno slijedi centrifugiranje uzorka 1 minutu na 10,000 x g. Izdvojio sam 750 μ l supernatanta u čistu epruvetu od 2 ml. Nakon toga sam dodao 1200 μ l pufera C4 u izdvojeni supernatant te miješao na vrtložnoj miješalici 5 sekundi. Izdvojio sam 650 μ l uzorka u MB Spin Column i centrifugirao 1 minutu na 10,000 x g. Korak 14 sam ponavljao dok cijeli uzorak nije obrađen. Tada sam dodao 500 μ l pufera C5 i centrifugirao 30 sekundi na 10,000 x g. Izdvojio sam tekući dio te centrifugirao 1 minutu na 10,000 x g. Dobiveni sadržaj u MB Spin Column prebacio sam u čistu epruvetu od 2 ml i dodao 100 μ l pufera C6 u centar bijele filter membrane. Centrifugirao sam dobiveni sadržaj na sobnoj temperaturi 30 sekundi na 10,000 x g, te ga izdvojio u MB Spin Column. Postupak sam ponavljao za svaki pojedini uzorak zasebno.

2.3 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR)

S ciljem umnažanja željenog bakterijskog gena za 16 rRNA (regija V3 – V4) provedena je metoda lančane reakcije polimerazom. Početnice odabrane za ovu metodu komplementarne su upravo ciljanim regijama bakterijskih gena (V3Bac_II_PE_Adaptor_341FW: 5'-tcg tcg gca gcg tca gat gtg tat aag aga cag cct acg ggn ggc agc ag-3' i V4Bac_II_PE_Adaptor_805RV: 5'-gtc tcg tgg gct cgg aga tgt gta taa gag aca gga cta chv ggg tat cta atc c-3' (*BioLabs*)). Početnice sam ubacio u izolirane uzorke ukupne DNA te sam proveo lančanu reakciju polimerazom prema opisanom postupku. Postupak je proveden koristeći gotove početnice i sastojke potrebne za provođenje ciklusa prema uputama proizvođača (*BioLabs*).

Inicijalno denaturiranje DNA u trajanju 30 sekundi na temperaturi od 98 °C u kojem dolazi do razdvajanja lanaca DNA koji će služiti kao kalup u sintezi.

Hibridizacija početnica na komplementarne dijelove DNA molekule. U ovom koraku temperatura se spustila na 62 °C u trajanju od 30 sekundi što odgovara vezanju oligonukleotidnih početnica na komplementarne dijelove DNA.

Sinteza komplementarnog lanca na temperaturi od 72 °C u trajanju od 30 sekundi. Ova temperatura optimalna je za djelovanje Taq polimeraze koja je izrazito termolabilna stoga je potrebno kontrolirati uvjete temperature. Polimeraza ugrađuje nove nukleotide sve dok ne stigne do druge početnice. Finalna ekstenzija provedena je u trajanju od 5 minuta na temperaturi od 72 °C. Lančana reakcija polimerazom sastojala se od 29 ciklusa.

2.4 ELEKTROFOREZA UMNOŽENIH FRAGMENTA U GELU AGAROZE

Kontrola produkata provedena je u 1% - tnom gelu agaroze. Gel je pripremljen na način da je 1 g agaroze otopljen u 100 mL TAEx1 puferu (Tablica 2). Za bojanje gela korišten je *SYBR Safe* koji se dodaje u gel u tekućem stanju (10 µl na 100 mL gela). Boja se veže za fragmente dobivene lančanom reakcijom polimeraze te stoga omogućuje vizualizaciju dobivenih produkata tijekom slikanja gela. Elektroforeza je provedena 1 h.

Tablica 2. Protokol za pripremu 50 x TAE pufera za elektroforezu.

50 x TAE elektroforetski pufer	
Tris	242 g
EDTA	18,61 g
Octena kiselina	57,1 mL
Redestilirana H₂O	do 1 litre

Ovako pripremljeni pufer razrjeđuje se na 1 x TAE.

2.5 METODA SEKVENCIRANJA SLJEDEĆE GENERACIJE

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

Rezultati dobiveni ovom metodom prikazani su brojem sljedova nukleotida bakterijskih populacija u uzorcima 1-6.

2.6 OBRADA PODATAKA

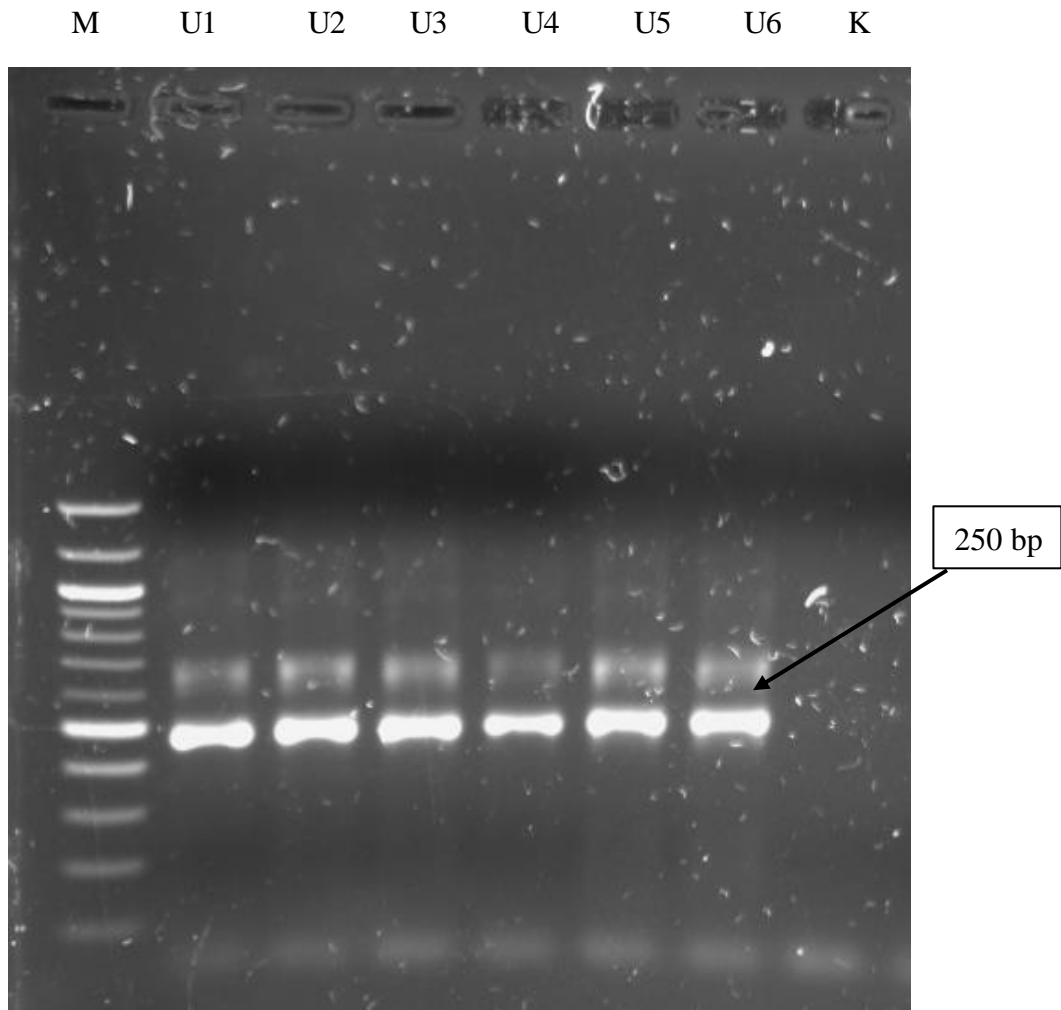
Obrada sekvenci nakon sekvenciranja provedena je na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu sravnavanjem dobivenih fragmenata (oko 250 bp) korištenjem računalnog programa QIIME (Caporaso i sur. 2010). Nadalje je provedena klaster analiza korištenjem računalnog programa SWARM (Mahe i sur. 2015) te identifikacija sekvenci prema referentnoj bazi NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Dobivene tablice sekvenci i taksonomskih kategorija statistički su obrađena te su rezultati prikazani tablično i grafički. Na temelju dobivenih nukleotidnih sljedova napravljena je statistička analiza multidimenzijskog skaliranja (MDS) korištenjem računalnog programa XLSTAT.

3. REZULTATI

3.1 REZULTATI ELEKTROFOREZE U GELU AGAROZE

Elektroforetska analiza produkata PCR-reakcije potvrdila je prisutnost fragmenata odgovarajuće veličine (250 bp) kod svih analiziranih uzoraka (Slika 10).

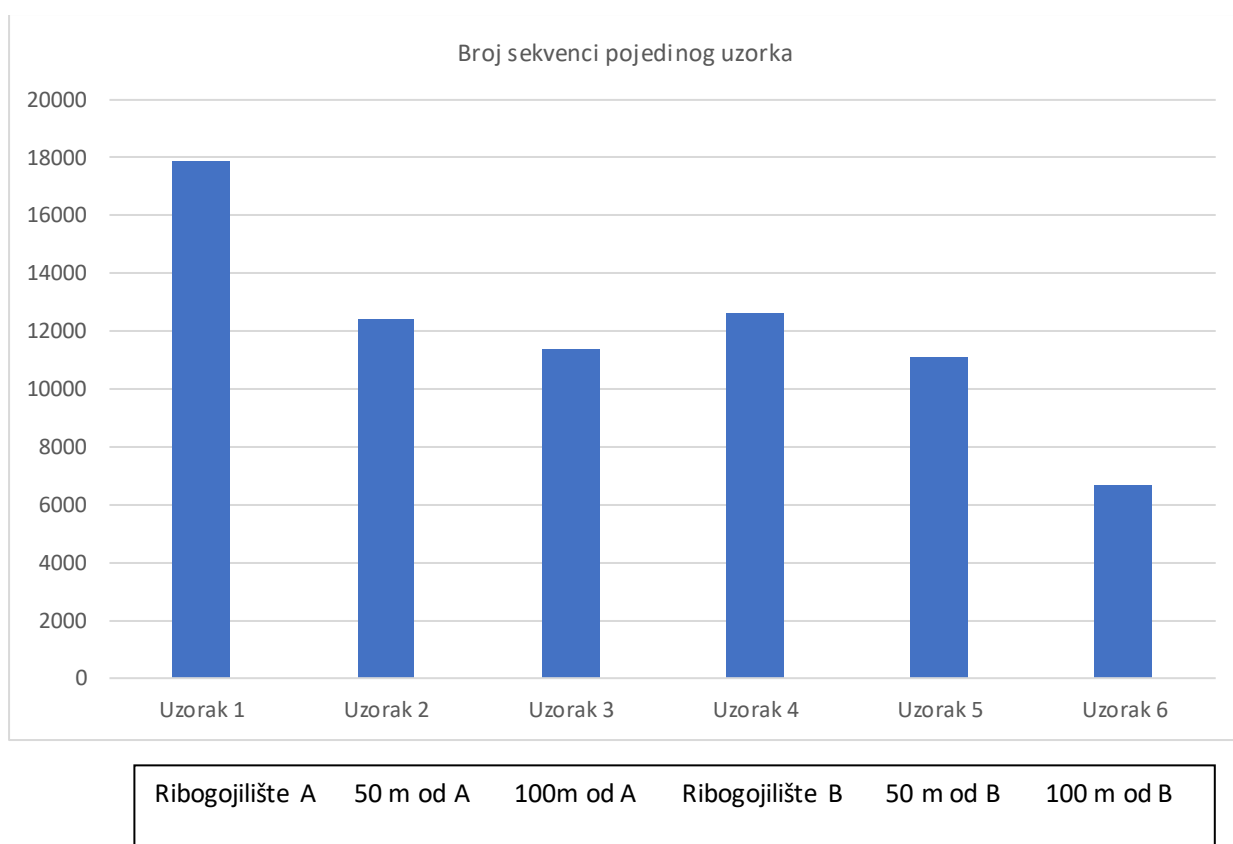
Prva kolona na dobivenom agaroznom gelu prikazuje DNA marker koji služi kako bi identificirali veličinu dobivenog PCR produkta. Nadalje su prikazani uzorci (1-6) dok je posljednji stupac negativna kontrola.



Slika 10. Rezultati elektroforeze uzoraka 1-6 te negativne kontrole K na 1% - tnom agaroznom gelu. Dobiveni fragmenti imaju veličinu 250 bp.

3.2 OBRADA SEKVENCI DOBIVENIH METODOM SEKVENCIRANJA SLJEDEĆE GENERACIJE

Illumina sekvenciranjem 6 uzorka dobiveno je ukupno 1, 009 306 sekvenci. Nakon obrade podataka određeno je da 298 030 sekvenci pripada domeni bakterija. Za daljnju obradu izdvojene su sekvence koje su imale jednaku ili veću sličnost od 97% (Mysara i sur. 2017) sa nekom od sekvenci navedenoj u bazi sekvenci NCBI. Ovim pristupom sekvenciranja kod analiziranih uzoraka utvrđeno je 1837 različitih bakterijskih taksonomskih kategorija s ukupno 72 096 sekvenci, od kojih je najveći broj pripadao uzorku 1 (17 887 sekvenci), a najmanji u uzorku 6 (6706 sekvenci) (Slika 11).



Slika 11. Ukupan broj određenih sekvenci gena za 16S rRNA u pojedinom uzorku morskog sedimenta.

3.3 TAKSONOMSKA PRIPADNOST BAKTERIJA DETERMINIRANIH U UZORCIMA SEDIMENTA

Na temelju dobivenih sekvenci za regiju gena 16S rRNA određena je taksonomska struktura prisutnih bakterija u pojedinim uzorcima. Uzorci su determinirani na razini koljena, razreda, reda, porodice i roda. U nastavku su prikazani rezultati (Tablica 3).

Tablica 3. Taksonomija determiniranih bakterija u uzorcima 1-6 do razine roda.

UZORAK	KOLJENO	RAZRED	RED	PORODICA	ROD
Uzorak 1 Ribogojilište A	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobium</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Photobacterium</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Lutimonas</i>
	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Tepidibacter</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfococcus</i>
Uzorak 2 50 m od ribogojilišta A	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobium</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfococcus</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophorhabdaceae</i>	<i>Syntrophorhabdus</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Lutimonas</i>
Uzorak 3 100 m od ribogojilišta A	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobium</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfococcus</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophorhabdaceae</i>	<i>Syntrophorhabdus</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Lutimonas</i>
	<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Nitrospira</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>
Uzorak 4 Ribogojilište B	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobium</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Zetaproteobacteria</i>	<i>Mariprofundales</i>	<i>Mariprofundaceae</i>	<i>Mariprofundus</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Photobacterium</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophorhabdaceae</i>	<i>Syntrophorhabdus</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Eudoraea</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Iamiaceae</i>	<i>Iamia</i>

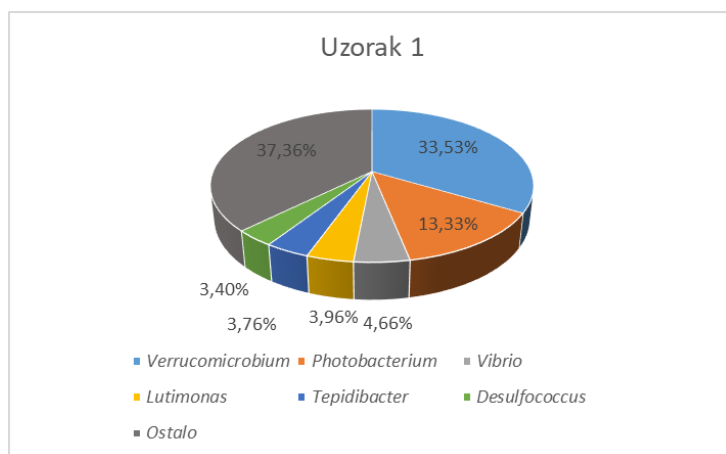
Nastavak **Tablice 3.**

UZORAK	KOLJENO	RAZRED	RED	PORODICA	ROD
Uzorak 5 50 m od ribogjilišta B	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobium</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfococcus</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Iamiaceae</i>	<i>Iamia</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Lutimonas</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophorhabdaceae</i>	<i>Syntrophorhabdus</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales</i>	<i>Desulfuromonadaceae</i>	<i>Pelobacter</i>
	<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Nitrospira</i>
Uzorak 6 100 m od ribogjilišta B	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobium</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfococcus</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophorhabdaceae</i>	<i>Syntrophorhabdus</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfuromonadales</i>	<i>Desulfuromonadaceae</i>	<i>Pelobacter</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Lutimonas</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Zetaproteobacteria</i>	<i>Mariprofundales</i>	<i>Mariprofundaceae</i>	<i>Mariprofundus</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>

3.4 POSTOTAK SEKVENCI GENA ZA 16S rRNA POJEDINIH RODOVA BAKTERIJA U UZORCIMA (1-6)

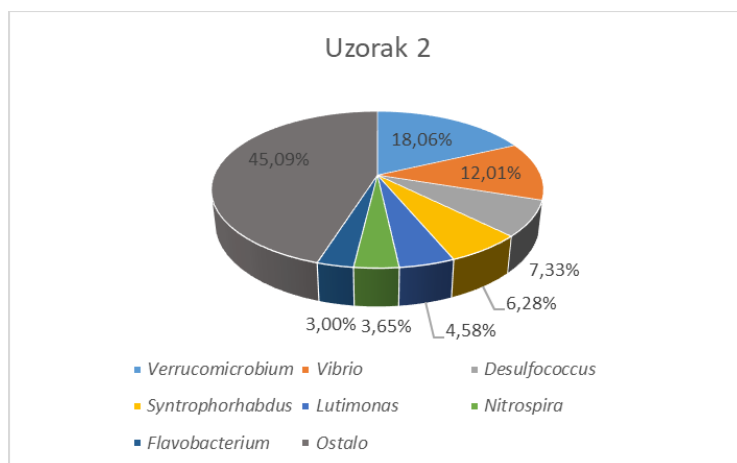
Postoci dobivenih sekvenci gena za 16S rRNA prikazani su za bakterijske rodove determinirane u uzorcima.

U najvećem udjelu u uzorku 1 pojavljuje se rod bakterija *Verrucomicrobium* čiji postotak nukleotidnih sljedova iznosi 33,53%. Sljedeći je rod *Photobacterium* čiji postotak nukleotidnih sljedova iznosi 13,33%. U manjem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuju se rodovi *Vibrio* (4,66%), *Lutimonas* (3,96%), *Tepidibacter* (3,76%) te *Desulfococcus* (3,40%). Pod ostalim se smatraju bakterijski rodovi čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 12).



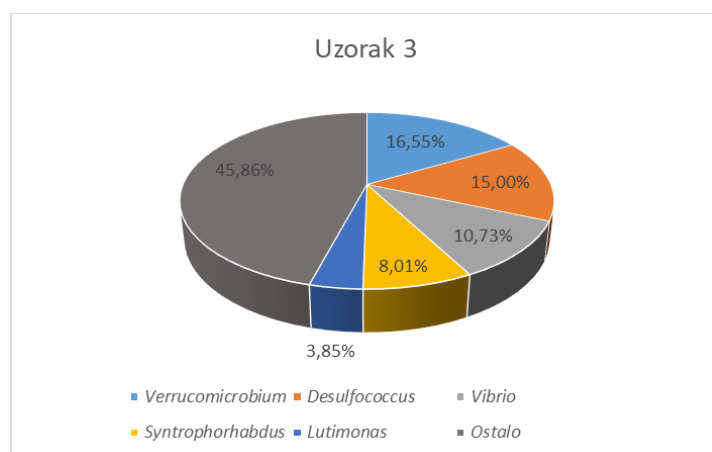
Slika 12. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih rodova bakterija u **uzorku 1-Ribogojilište A.**

U uzorku 2 rod *Verrucomicrobium* pojavljuje se s najvećim postotkom nukleotidnih sljedova (18,06%) Sljedeći prema postotku nukleotidnih sljedova je rod *Vibrio* (12,01%). U manjem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuju se rodovi *Desulfococcus* (7,33%), *Syntrophorhabdus* (6,28%), *Lutimonas* (4,58%), *Nitrospira* (3,65%) te *Flavobacterium* (3,00%). Pod ostalim se smatraju bakterijski rodovi čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 13).



Slika 13. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih rodova bakterija u **uzorku 2** – **Ribogojilište A.**

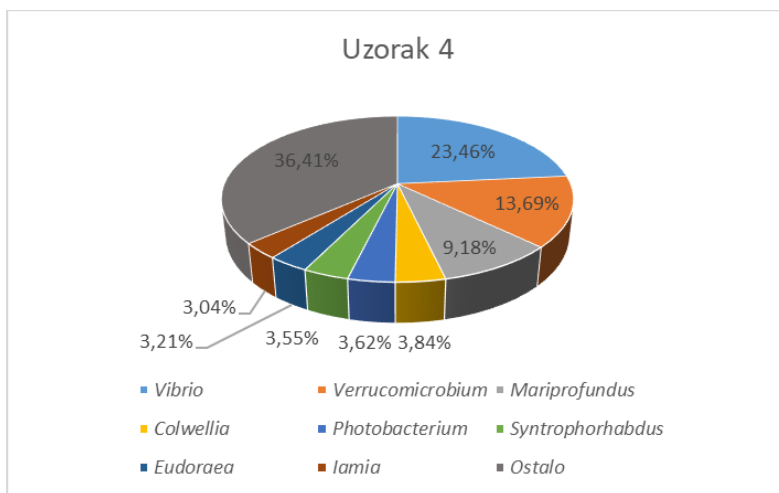
U uzorku 3 se u najvećem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuje bakterijski rod *Verrucomicrobium* (16,55 %). Sljedeći najzastupljeniji bakterijski rod je *Desulfococcus* (15,00 %), a nakon njega rod *Vibrio* (10,73 %). U manjem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuju se rodovi *Syntrophorhabdus* (8,01 %) te *Lutimonas* (3,85 %). Pod ostalim se smatraju bakterijski rodovi čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3 % (Slika 14).



Slika 14. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih rodova bakterija u **uzorku 3** – **Ribogojilište A.**

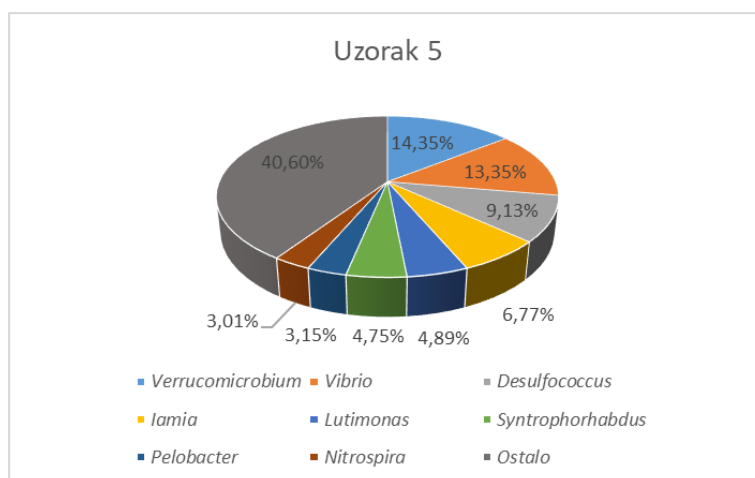
U uzorku 4 se u najvećem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuje bakterijski rod *Vibrio* (23,46 %). Sljedeći po postotku nukleotidnih sljedova je rod *Verrucomicrobium* (13,69%) a iza njega je rod *Mariprofundus* (9,18%). U manjem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuju se rodovi *Colwellia* (3,84%), *Photobacterium* (3,62%), *Syntrophorhabdus* (3,55%), *Eudoraea*

(3,21 %) te *Iamia* (3,04 %). Pod ostalim se smatraju bakterijski rodovi čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 15).



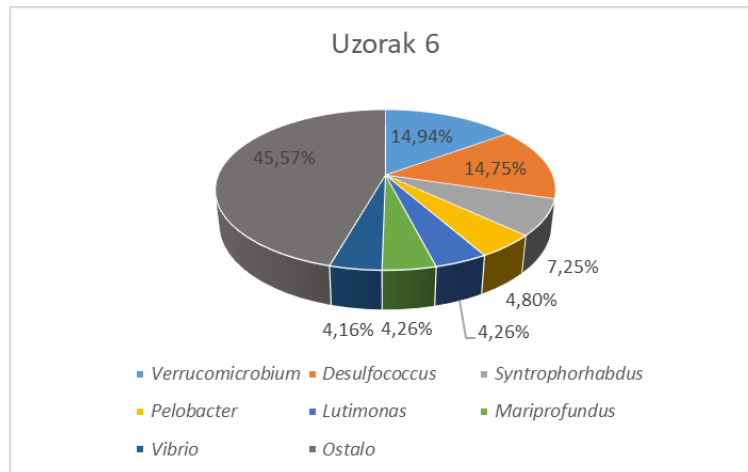
Slika 15. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih rodova bakterija u **uzorku 4** – **Ribogojilište B.**

U uzorku 5 se u najvećem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuje bakterijski rod *Verrucomicrobium* (14,35%). Nakon njega prema postotku nukleotidnih sljedova su rodovi *Vibrio* (13,35%) te *Desulfococcus* (9,13%). U manjem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuju se rodovi *Iamia* (6,77%), *Lutimonas* (4,89%), *Syntrophorhabdus* (4,75%), *Pelobacter* (3,15%) te *Nitrospira* (3,01%). Pod ostalim se smatraju bakterijski rodovi čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 16).



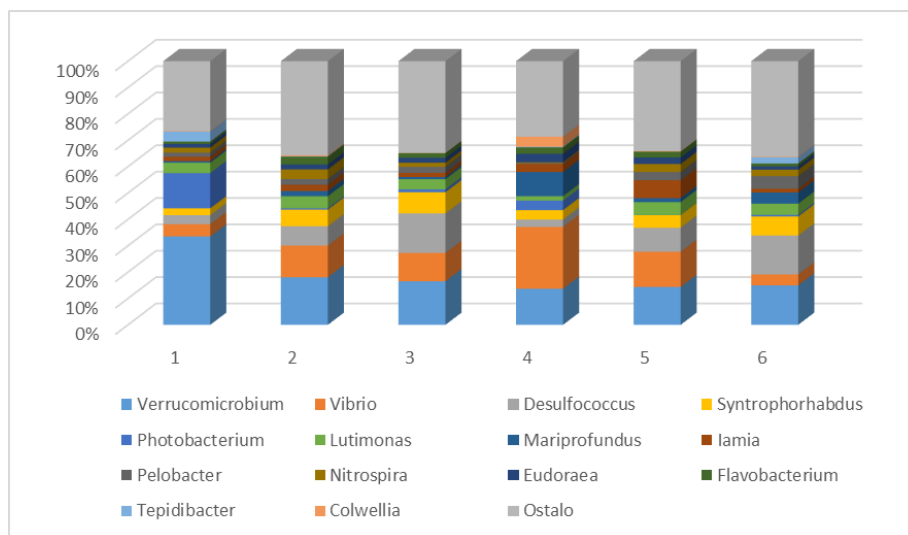
Slika 16. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih rodova bakterija u **uzorku 5** – **Ribogojilište B.**

U uzorku 6 u najvećem postotku nukleotidnih sljedova pojavljuju se bakterijski rodovi *Verrucomicrobium* (14,94%) te *Desulfococcus* (14,75%). Sa manjim postotkom nukleotidnih sljedova pojavljuju se rodovi *Syntrophorhabdus* (7,25%), *Pelobacter* (4,80%), *Lutimonas* (4,26%), *Mariprofundus* (4,26%) te *Vibrio* (4,16%). Pod ostalim se smatraju bakterijski rodovi čiji je postotak nukleotidnih sljedova manji od 3% (Slika 17).



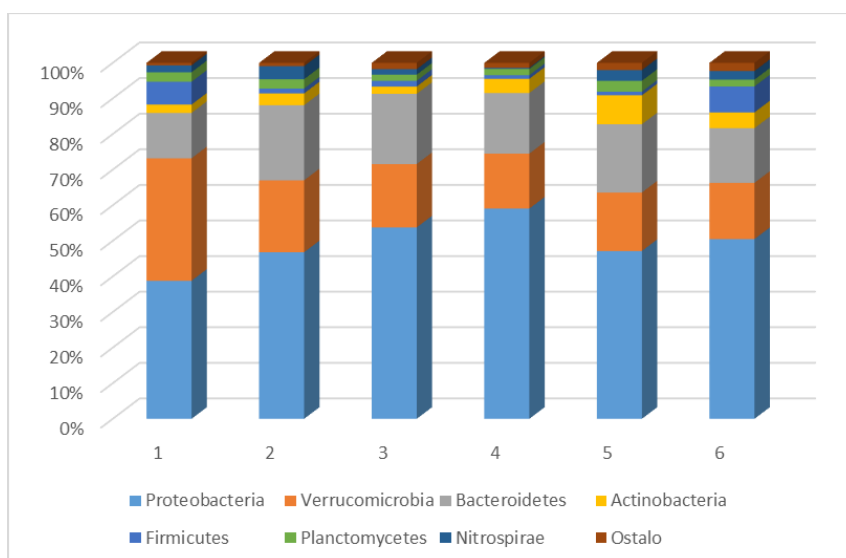
Slika 17. Udio sekvenci gena za 16S rRNA determiniranih rodova bakterija u **uzorku 6** – **Ribogojilište B.**

Nadalje je prikazana pojavnost bakterijskih rodova u pojedinim uzorcima. Na ovaj način prikazan su poklapanja bakterijskih rodova u uzorcima kao i postotak sekvenci pojedinih bakterijskih rodova u pojedinom uzorku (Slika 18).



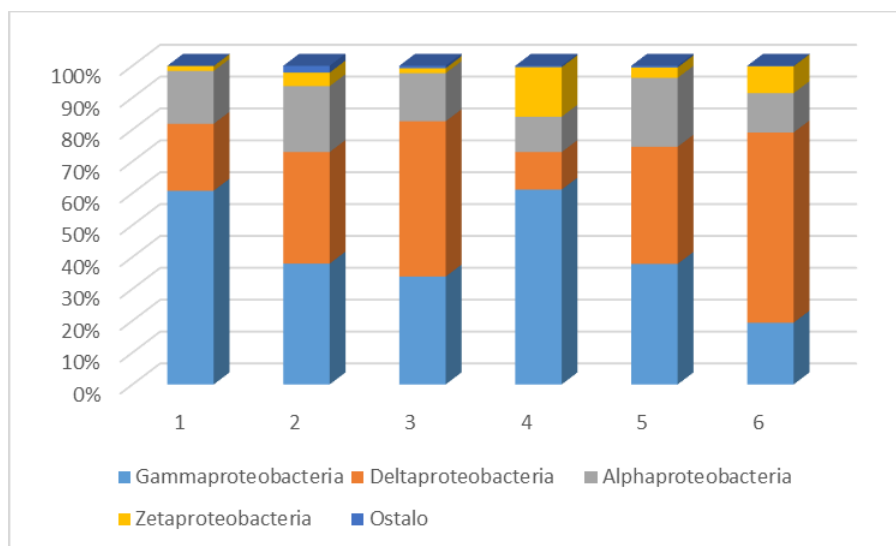
Slika 18. Postotak sekvenci 16 rRNA bakterijskih rodova determiniranih u uzorcima 1-6.

Izračunati su postoci nukleotidnih sljedova pojedinih bakterijskih populacija u uzorcima sedimenta. Prikazana je usporedna analiza postotaka nukleotidnih sljedova bakterijskih koljena za svaki uzorak (Slika 19).



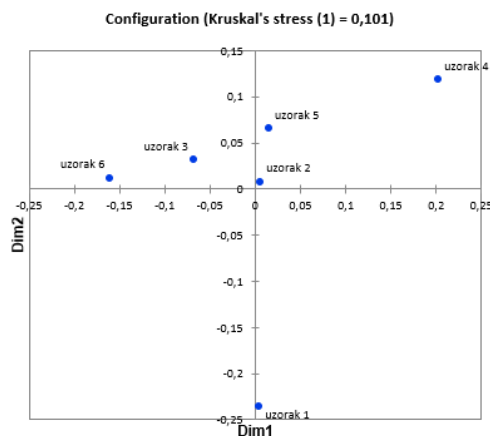
Slika 19. Postotak sekvenci 16 rRNA bakterijskih koljena determiniranih u uzorcima 1-6.

Izračunati su postoci nukleotidnih sljedova pojedinih bakterijskih razreda u uzorcima sedimenta. Prikazana je usporedna analiza postotaka nukleotidnih sljedova bakterijskih razreda za svaki uzorak (Slika 20).



Slika 20. Postotak sekvenci 16 rRNA bakterijskih razreda determiniranih u uzorcima 1-6.

Metodom multidimenzijskog skaliranja (MDS) dobivenu su podaci koji pokazuju sličnost odnosno različitost promatranih podataka sekvenci za pojedini uzorak (Slika 21). Rezultati pokazuju kako su uzorci 1 i 4 međusobno različiti, a isto tako su različiti od ostalih uzoraka. Uzorci 1 i 4 pripadaju uzorku sedimenta ispod ribogojilišta. Isto tako uočava se grupiranje i sličnost podataka za uzorke 2 i 5 kao i za uzorke 6 i 3. Uzorci 2 i 5 pripadaju uzorku sedimenta udaljenom 50 metara od ribogojilišta dok uzorci 6 i 3 odgovaraju uzorku sedimenta udaljenom 100 metara od ribogojilišta.



Slika 21. Multidimenzijsko skaliranje (MDS) za uzorke morskog sedimenta označene 1 – 6.

4. RASPRAVA

Postupak izolacije ukupne DNA iz uzoraka standardnim postupkom *DNeasy PowerSoil Kit* pokazao se kao dobra tehnika izolacije bakterijske DNA iz okolišnih uzoraka. Prema nekim istraživanjima (Rubin i sur. 2014) ova metoda pokazala se uspješnom za dobivanje što boljih rezultata sekvenciranja. Metoda sekvenciranja sljedeće generacije na temelju gena za 16S rRNA pouzdana je za određivanje bakterijskih populacija do razine roda, dok je manje pouzdana za određivanje bakterijskih vrsta u određenim uzorcima zbog toga što su ti geni slični kod većine vrsta te je zbog toga teško odrediti vrstu kojoj bakterija pripada (Rudy i Helix 2010, Ghanabari i sur. 2014). U ovom istraživanju karakterizirane su regije bakterijskih gena V3 i V4. Osim umnažanja ovih gena, za detekciju i taksonomsku karakterizaciju mogu se koristiti i drugi dijelovi genoma bakterija, primjerice regije gena V1 i V2 (Korlević i sur. 2015), kojima se također metodom sekvenciranja sljedeće generacije može odrediti taksonomska pripadnost bakterijskih populacija do razine vrste (Sanschagrin i Yergeau 2014).

Nakon obrade rezultata, napravljen je grafički prikaz taksonomskih kategorija detektiranih u svakom pojedinom uzorku. Kod prvog i drugog ribogojilišta u najvećem udjelu uočena je pojavnost bakterijskih koljena *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* te *Bacterioidetes* (slika 18). U prvom ribogojilištu u najvećem udjelu pojavljuju se bakterije iz razreda unutar koljena *Proteobacteria*. Iz literaturnih izvora (Gerard sur. 2014) poznato je da razred *Proteobacteria* bakterija često obitava u morskom sedimentu. Isto tako, dosadašnja istraživanja (Gacesa i sur. 2018, Katavić 2003) bakterijskih populacija morskog sedimenta pokazala su pojavnost upravo koljena *Proteobacteria* u istraživanom morskom sedimentu. Koljeno *Proteobacteria* jest najrasprostranjenije koljeno koje pripada domeni *Bacteria*. Ovom koljenu pripada najveći broj gram – negativnih bakterija, a te bakterije su uglavnom prema načinu prehrane kemoheterotrofi što znači da kemijskim procesima prerađuju organsku tvar iz okoliša (Gerard i sur. 2014).

Prema rezultatima istraživanja i u prvom i drugom ribogojilištu uočava se najmanji udio bakterija razreda *Alphaproteobacteria*, a za njih je karakteristično da mogu preživljavati pri niskim koncentracijama nutrijenata (Gerard i sur. 2014). *Gammaproteobacteria* i *Deltaproteobacteria* anaerobne su bakterije koje sudjeluju u kruženju sumpora u prirodi. Prema istraživanju (Katavić 2003) pretjerano gomilanje organskog opterećenja u morskom sedimentu stvara anaerobne uvjete koji pospješuju stvaranje bakterijskih populacija koje nastanjuju takva područja.

U takvim uvjetima pojavljuju se heterotrofne bakterije iz roda *Beggiatoa* kao i sumporne bakterije. Sumpornim bakterijama u najvećem udjelu pripadaju bakterije koljena

Deltaproteobacteria koje u anaerobnim uvjetima reduciraju sumpor ili sulfate iz podloge te stvaraju sumporovodik (Gerard i sur. 2014). U najvećem udjelu identificirane su skupine bakterija koje preživljavaju u anaerobnim uvjetima (Katavić 2003) što je prema ovom istraživanju pretpostavljamo posljedica pretjeranog gomilanja organskog opterećenja u morskom sedimentu. Bakterije iz razreda *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria* u nekim dosadašnjim istraživanjima (Huang i sur. 2014, Lyons i sur. 2015) detektirane su u crijevima riba. Ovi razredi bakterija, koje su detektirane u morskom sedimentu ispod ribogojilišta mogu biti porijeklom iz fecesa riba.

Za koljeno *Verrucomicrobia* poznato je da čine mali dio ukupne bakterijske zajednice te da značajno doprinose razgradnji organske tvari putem fermentativnih procesa (Čanković 2018). Ovakva uloga bakterija ključna je u takozvanoj mikrobnoj petlji, u kojoj dolazi do razgradnje organske tvari od strane bakterijskih zajednica koju onda mogu koristiti primarni proizvođači. Biogeokemijskim procesima koji se događaju unutar bakterijskih stanica dolazi do razgradnje organske tvari iz okoliša (Buchan i sur. 2014.).

Kod ostalih bakterijskih koljena determiniranih u uzorcima prvog ribogojilišta nema značajnije promjene s obzirom na postotak sekvenci s udaljavanjem od ribogojilišta. Kod koljena *Proteobacteria* i *Bacteroidetes* uočava se i blagi trend porasta udjela ovih bakterija s udaljavanjem od ribogojilišta. Prema nekim dosadašnjim istraživanjima (Korlević 2015), ova koljena bakterija pojavljuju se kao odgovor na cvat nekih skupina dijatomeja kao i odgovor na završetak fitoplanktonskog cvata. Poznato je da predstavnici koljena *Bacteroidetes* imaju važnu ulogu u razgradnji kompleksne organske tvari (Gerard i sur. 2014).

Kod oba ribogojilišta uočava se trend smanjenja postotka sekvenci razreda *Gammaproteobacteria* udaljavanjem od ribogojilišta što može ukazati na povećano organsko opterećenje unutar samog ribogojilišta, odnosno smanjenje organskog opterećenja udaljavanjem od ribogojilišta (Katavić 2003). Isto tako, udaljavanjem od ribogojilišta može se uočiti trend povećanja postotka sekvenci razreda *Deltaproteobacteria* što se može pripisati djelovanju morskih struja i samih uvjeta staništa s obzirom da se radi o udaljenosti od 100 m od samog ribogojilišta.

Kako se radi o privatnom vlasništvu, podaci o biomasi ribe koja se uzgaja ili količine hrane kojom se hrani riba, a isto tako i informacije oko tretiranja uzgajališta organskim kemikalijama zbog zaštite podataka nisu dostupni stoga se utjecaj organskog opterećenja može samo procijeniti s obzirom na dobivene sekvence bakterijskih populacija.

Iz ranijih istraživanja je poznato da intenzivni uzgoj ribe dovodi do obogaćivanja mora nutrijentima (Kružić i sur. 2014) pa je prema tome poznavanjem biologije determiniranih taksonomskih kategorija bakterija moguće procijeniti postoji li utjecaj navedenog organskog opterećenja na samu strukturu bakterijskih populacija.

Promatranjem udjela pojedinih bakterijskih koljena, kod prvog ribogojilišta može se uočiti trend povećanja *Proteobacteria* udaljavanjem od ribogojilišta. Kod drugog ribogojilišta uočava se suprotni trend, odnosno dolazi do smanjenja koljena *Proteobacteria* udaljavanjem od ribogojilišta. Također, kod prvog ribogojilišta udaljavanjem od ribogojilišta uočava se trend smanjenja koljena *Verrucomicrobia*, dok je kod drugog ribogojilišta podjednak udio ovog koljena. U većem udjelu kod drugog ribogojilišta pojavljuje se koljeno *Actinobacteria*. Ovo koljeno pripada gram-pozitivnim bakterijama koje nastanjuju gotovo sva staništa te je poznato (Gacesa i sur. 2018) da su bakterije ovog koljena važne u procesu razgradnje organske tvari uginulih organizama.

Kod drugog ribogojilišta uočava se veća pojavnost koljena *Zetaproteobacteria*. Ovo koljeno kao i *Deltaproteobacteria* pripada sumpor-reducirajućim bakterijama, a nalazimo ih u anaerobnim staništima morskih sedimenata. To su bakterije koje u reakciji sumpora sa željezom stvaraju željezov (II) sulfid koji daje crnu boju sedimenta (Gerard sur. 2014).

Najveći postotak nukleotidnih sljedova kod prvog uzorka koji odgovara morskom sedimentu ispod ribogojilišta pripada koljenu *Firmicutes*, dok se kod drugog ribogojilišta uočava najveća pojavnost u uzorku udaljenom 100 m od ribogojilišta. Ovo koljeno bakterija determinirano je u morskom sedimentu Jadrana u prijašnjim istraživanjima (Gacesa i sur. 2018). Prema nekim dosadašnjim istraživanjima (Apostolaki i sur. 2007) na području Mediterana pokazano je da je utjecaj kaveza na bentičku faunu ograničen na radijus od 25 m od ruba kaveza, ali se povišene koncentracije dušika i ugljika mogu izmjeriti i u radijusu od 1000 m. Jačina utjecaja je varirala od iznimno značajne do zanemarive, a ovisila je o jakosti morskih struja i vrsti sedimenta gdje su slabe morske struje i fini sediment doprinosili degradaciji bentičke flore i faune.

Prema rezultatima dobivenima ovim istraživanjem može se uočiti utjecaj organskog opterećenja na pojavnost određenih bakterijskih skupina. Poznato je (Matijević i sur. 2010) da prisutnost organskog opterećenja u morskom sedimentu izaziva negativni redoks - potencijal što uzrokuje stvaranje anaerobnih uvjeta, odnosno na temelju toga može se zaključiti da u takvom sedimentu postoji aktivnost anaerobnih bakterija koje razgrađuju organsku tvar. Na temelju poznavanja biologije pojedinih bakterijskih skupina (Gerard i sur. 2014) determiniranih u uzorcima sedimenta može se uočiti kako je utjecaj organskog opterećenja veći kod drugog ribogojilišta brancina.

Prema istraživanju (Krstulović i sur. 2011) uočeno je da smanjenjem organskog opterećenja i organske tvari u morskom ekosustavu dolazi do smanjene abundancije (smanjenja broja i sastava bakterijskih skupina) kao i do promjene mikrobnih zajednica. Prema istraživanju (Krstulović i sur. 2011) uočene su oscilacije bakterijskih populacija tijekom sezonskih razdoblja što može biti potencijal za daljnja istraživanja ovog rada u kojem se mogu pratiti bakterijske strukture tijekom dužeg vremenskog perioda.

Multidimenzijским skaliranjem dobivene su sličnosti podataka sekvenci između uzoraka. Na temelju dobivenog grafičkog prikaza uočava se grupiranje i sličnost podataka uzoraka 2 i 5 te 3 i 6. Uzorci ispod ribogojilišta pokazuju različitost sa uzorcima udaljenim od ribogojilišta.

Kako zbog zaštite podataka u ovom istraživanju nisu dobiveni konkretni podaci oko biomase ribe koja se uzgaja u ribogojilištima ili količine hrane kojom se hrani riba sa definitivnom sigurnošću se ne može potvrditi utjecaj organskog opterećenja na bakterijski sastav morskog sedimenta, već se taj utjecaj može procijeniti na temelju dobivenih podataka u ovom istraživanju. Stoga se ovo istraživanje može proširiti u suradnji sa vlasnicima ribogojilišta kako bi se dobili točni podaci oko biomase ribe, količine hrane kao i o uvjetima staništa. Time se usporedbom svih navedenih parametara može definitivno potvrditi postoji li utjecaj samog ribogojilišta na sastav bakterijskih populacija.

5. ZAKLJUČAK

1. Sastav bakterijskih populacija dobiven analizom nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA pokazuje da nema specifične razlike u sastavu između 2 ribogojilišta, odnosno kod oba ribogojilišta u velikom udjelu detektirane su iste taksonomske kategorije bakterijskih populacija.
2. Usporedbom sastava bakterijskih populacija u analiziranim uzorcima morskog sedimenta, uočava se najveća zastupljenost tri bakterijska koljena u svima uzorcima. To su *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* te *Bacterioidetes*. U manjem udjelu kod oba ribogojilišta pojavljuju se bakterije pripadnici koljena *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* te *Nitrospirae*. Razredi bakterija unutar koljena *Proteobacteria* koji se u najvećem udjelu pojavljuju u analiziranim uzorcima morskog sedimenta su *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* te *Zetaproteobacteria*.
3. S obzirom na strukturu bakterijskih populacija i poznavanjem biologije, odnosno staništa i načina života samih bakterija pripadnika najzastupljenijih koljena i razreda može se procijeniti utjecaj organskog opterećenja na njihov sastav. Pretpostavka je da kod oba ribogojilišta postoji utjecaj organskog opterećenja na bakterijske populacije jer su u sedimentu ispod samih ribogojilišta u najvećem dijelu prisutne upravo bakterijske populacije koje razgrađuju organske tvari. Udaljavanjem od samih ribogojilišta može se uočiti trend smanjenja udjela takvih bakterijskih populacija.

6. LITERATURA

- 1) Alan W. D. (2000): Microbial biofilms in intertidal sistem. *Continetal Shelf research* **20**: 1257-1273.
- 2) Apostolaki E. T., Tsagaraki T., Tsapakis M., Karakassis I. (2007): Fish farming impact on sediments and macrofauna associated with seagrass meadows in the Mediterranean. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **75**: 408–416.
- 3) Bavčević L. (2014): Priručnik i vodič za dobru proizvođačku praksu, Kavezni uzgoj lubina i komorača; 3-10.
- 4) Buchan A., LeCleir R. G., Gulvik A. C., Gonzales M. H. (2014): Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms; *Nature reviers Microbiology* **12**: 686 – 698.
- 5) Burggraf S., Mayer T., Amann R., Schadhauer S., Woese C. R., Stetter K. O. (1994): Identifying members of the domain Archea with rRNA- targeted oligonucleotide probes; *Applied and environmental microbiology* **60**: 3112-3119.
- 6) Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., (2010): QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing; *Nature Methods* **7**: 335–336.
- 7) Cooper, H. (7.izdanje): *The cell – A Molecular Approach*.
- 8) Corteselli E. M., Aitken M. D., Singleton D. R (2017): Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class Gammaproteobacteria, and proposal of Immundisolibacterales ord. nov. and Immundisolibacteraceae fam. nov: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **67**: 925-931.
- 9) Čanković M. (2018): Molekularna karakterizacija prokariotskih zajednica u euksinom okolišu Rogozničkoga jezera; doktorski rad: 67-75.
- 10) Dell'Anno A., Beolchinia F., Rocchettia L., Lunab G. M., Danovaroa R. (2012): High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environmental pollution* **167**: 85-92.
- 11) Diaz-Almela E., Marba N., Alvarez E., Santiago R., Holmer M., Grau A., Duarte C. M. (2008): Benthic input rates predict seagrass (*Posidonia oceanica*) fish farm-induced decline; *Marine Pollution Bulletin* **56**: 1332–1342.
- 12) Gacesa R., Baranašić G., Starčević A., Dimić J., Korlević M., Najdek M., Blažina M., Oršolić D., Kolesarić D., Long F. P., Cullum J., Hranueli D., Orlić S., Zucko J. (2018): Bioprospecting for Genes Encoding Hydrocarbon-Degrading Enzymes from Metagenomic Samples Isolated from Northern Adriatic Sea Sediments. *Food tehnology and biotehnology* **56**: 270-275.

- 13) Gerard J. T., Berdell R. F., Christine L. C. (2014): *Microbiology An Introduction* Tortora Funke Case. 11. izdanje, 277-301, 811-835.
- 14) Ghanbari M., Kneifel W., Domig K. J. (2015): A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, **448**: 464–475.
- 15) Goodwin S., McPherson J. D. McCombie W. R. (2016): Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies; *Genetics* **17**: 333-348.
- 16) Gvozdanić K., Čuljak V., Margeta P. (2015): Razvoj novih tehnologijasekvenciranja i njihova primjena u istraživanju genoma domaćih životinja; *Poljoprivreda* **21**: 66-72.
- 17) Homen Z., Jahutka I., Mišura A., Fuček V., Suić J. (1999): Slatkovodno ribarstvo Republike Hrvatske od godine 1995. do 1998. *Ribarstvo* **57**: 105-112.
- 18) Huang Z., Li X., Wang L., Shao Z. (2014): Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* **47**: 1737–1746.
- 19) Jay S., Shankar B., George M. C., Walter G., Jane R., Jeffery A. S., Robert H. W. (2017): DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* **550**: 345-350.
- 20) Katavić I. (2003): Učinci kaveznih uzgajališta riba duž istočne obale Jadrana na morski okoliš. *Ribarstvo* **63**: 175-194.
- 21) Korlević M., Zucko J., Najdek Dragić N., Blažina M., Pustijanac E., Vojvoda Zeljko T., Gacesa R., Baranasic D., Starcevic A., Diminic J., Long P. F., Cullum J., Hranueli D., Orlić S. (2015): Bacterial diversity of polluted surface sediments in northern Adriatic Sea. *Systematic and Applied Microbiology* **38** (3): 189–197.
- 22) Korlević M. (2015.): Detaljna analiza bakterijske raznolikosti Jadranskog mora, doktorski rad: 1-31.
- 23) Korlević M., Zucko J., Dragić M. N., Blažina M., Pustijanac E., Zeljko T. V., Gacesa R., Baranasic D., Starcevic A., Diminic J., Long F. P., Cullum J., Hranueli D., Orlic S. (2015): Bacterial diversity of polluted surface sediments in the northern Adriatic Sea. *Systematic and Applied Microbiology* **38**:189-97.
- 24) Kovač K. (2017): Biološke taksonomske kategorije. *Osvježimo znanje* **66**: 542-542.
- 25) Krstulović N., Šolić M., Šegvić D., Šestanović S., Kušpilić G. (2011): Praćenje utjecaja podmorskog ispusta Stobreč na okoliš; *Hrvatske vode* **19**: 127-132.
- 26) Kružić P., Vojvodić V., Bura-Nakić E. (2014): Inshore capture-based tuna aquaculture impact on *Posidonia oceanica* meadows in the eastern part of Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* **86**: 174-185.
- 27) Lyons P. P., Turnbull J. F., Dawson K. A., & Crumlish M. (2015): Exploring the microbial diversity of the distal intestinal lumen and mucosa of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using next generation sequencing (NGS). *Aquaculture Research* **48**: 77–91.

- 28) Mahe F., Rognes T., Quince C., De Vargas C., Dunthorn M. (2015): Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* **3**: 1420.
- 29) Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., Schleifer K. H. (1996): Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **142**: 1097–1106.
- 30) Massana R., Murray A. E., Preston C. M., DeLong E. F. (1997): Vertical Distribution and Phylogenetic Characterization of Marine Planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied and environmental microbiology* **63**: 50-56.
- 31) Materić D. (2011): Promjene u sistematici živog svijeta, carstava gljiva i pedagoške implikacije; ResearchGate: 1-6.
- 32) Matijević S., Kuspilic G., Ninčević-Gladan Z., Krstulović N., Bojanić N., Bogner D. (2010): The influence of submarine wastewater system on chemical and biological parameters in the water column and sediment at the middle Adriatic (Croatia); Rapport The Mediterranean Science Commission; **39**: 284.
- 33) Menzel P., Ng K. L., Krogh A. (2016): Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun.* **7**: 11257.
- 34) Miller J. R., Koren S., Sutton G. (2010): Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics* **95**: 315-27.
- 35) Mysara M., Vandamme P., Potpora R., Kerckhofs F. M., Leys N., Boon N., Raš J., Monsieurs P. (2017): Reconciliation between operational taxonomic units and species boundaries; *FEMS Microbiology Ecology* **93**.
- 36) Novitsky J. A., Morita R. Y. (1978): Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Marine Biology* **36**: 289–295.
- 37) O’Leary N.A., Wright M. W., Brister J. R., Ciuffo S., Haddad D., McVeigh R., Ako-Adjei D. (2015): Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research* **44**: 733-45.
- 38) Pikelj K., Juračić M. (2015): Površinski sediment dna istočnog dijela Jadranskog mora – raspored, porijeklo i transport; Knjiga sažetaka 5. Hrvatskog geološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem, 212-213.
- 39) Pearson T. H., Rosenberg R. (1978): Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanography and Marine Biology* **16**: 229-311.
- 40) Petricoli – Bakran T. (2007): Morska staništa – priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja; 3-56.

- 41) Rubin E. R. B., Sanders J. G., Hampton – Marcell J., Owens M. S., Gilbert A. J., Moreau C. S. (2014): DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure; *MicrobiologyOpen* **6**: 910-921.
- 42) Rudy G., Helix G. (2010): *A Hitchhiker's Guide of next – generation sequencing*; Golden Helix; 1-9.
- 43) Sanschagrin S., Yergeau E. (2014): Next-generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons; *Journal of Visualized Experiments* **90**: 1-7.
- 44) Stevenson F. J. (1986): *Cycles of soil-carbon, nitrogen phosphorus, sulfur, micronutrients*. J. Wiley and Sons. New York.
- 45) Šestanović S., Šolić M., Krstulović N. (2009): The influence of organic matter and phytoplankton pigments on the distribution of bacteria in sediments of Kaštela Bay (Adriatic Sea). *Scientia Marina* **73**: 83-94.
- 46) Timpson J. N., Greenwood C. M. T., Soranzo N. D., Lawson D. J., Richards J. B. (2018): Genetic architecture: the shape of the genetic contribution to human traits and disease. *Nature* **19**: 110-115.
- 47) Willey J., Sherwood L., Woolverton C. (2013): *Prescott's Microbiology*, 9th edition McGraw-Hill, Boston.
- 48) Willey J., Sherwood L., Woolverton C. (2011): *Prescott's Microbiology*, 8th edition McGraw-Hill, Boston.
- 49) file:///C:/Users/SVuk/Desktop/literatura/novo/ribe_19_3_zadnje_opt.pdf (datum pristupa: 29.9.2018., 10,30h)
- 50) <https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf> (datum pristupa: 29.9.2018., 9:00h)
- 51) https://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO_GRADIVO/Molekularne_metode_u_patologiji.pdf (30.9.2018., 11,30h)
- 52) <http://beanqua.lagr.hr/NGS.pdf> (30.9.2018., 13,00h)
- 53) <http://jadran.izor.hr/hr/nastava/solic/EKOLOGIJA%20MORA/PREDAVANJA/03.%20OPREGLED%20MORSKIH%20STANISTA.pdf> (datum pristupa: 22.9.2018., 10,30h)
- 54) <http://www.uoz.hr/pdf/zakoni/Zakon-o-morskom-ribarstvu-novo.pdf> (datum pristupanja: 2.10.2018., 23:00h)
- 55) <http://www.ss-veterinarska-zg.skole.hr/> (datum pristupanja: 21.10.2018., 17:00h)
- 56) <http://narodne-novine.nn.hr/clanci/> (datum pristupanja: 21.10.2018., 17:30h)
- 57) https://www.vuka.hr/fileadmin/user_upload/lovstvo/korisni_sadržaj/Opća_bilogija/bio_geokemijski_ciklusi.pdf (datum pristupanja: 24.10.2018., 16:00h)

ŽIVOTOPIS

Završeno obrazovanje:

- Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec, Čakovec; smjer: opća gimnazija
- Osnovna škola „Hodošan“, Hodošan

Objavljeni radovi:

- Smrečki N., Jović O., Kukovec B.M., Šimunić E., Vuk S., Skuhala A., Babić M., Rončević T., Ilić N., Kekez I., Matković-Čalogović D., Popović Z. (2018): Copper (II) complexes with N-alkyliminoacetamide ligands. Preparation, structural, spectroscopic and DFT studies and biological evaluation. *Inorganica Chimica Acta*

Udruge i organizacija:

- Član Mikrobiološke sekcije pri Udruzi studenata biologije
- Voditelj sekcije za mikrobiologiju pri Udruzi studenata biologije
- Član Udruge Tvornica znanosti
- Organizator u Udruzi Tvornica znanost