

Ekologija mikrobne zajednice s naglaskom na aerobne anoksigene fototrofe u srednjem Jadranu

Stojan, Iva

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:886134>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-11**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)





PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Doktorski studij Biofizika

Doktorski rad

EKOLOGIJA MIKROBNE ZAJEDNICE S
NAGLASKOM NA AEROBNE ANOKSIGENE
FOTOTROFE U SREDNJEM JADRANU

Iva Stojan

Split, svibanj 2024.



FACULTY OF SCIENCE
Doctoral Study of Biophysics

Doctoral thesis

MICROBIAL COMMUNITY ECOLOGY WITH AN
EMPHASIS ON AEROBIC ANOXYGENIC
PHOTOTROPHS IN THE CENTRAL ADRIATIC
SEA

Iva Stojan

Split, May 2024

Ova je doktorska disertacija izrađena u Laboratoriju za mikrobiologiju Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, pod vodstvom mentorice dr. sc. Danijele Šantić, znanstvene savjetnice i komentorice izv. prof. dr. sc. Željke Trumbić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija „Biofizika“ na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu. Istraživanje je provedeno u okviru uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2019-04-8401) „Ekologija aerobnih anoksigenih fototrofa u Jadranskom moru (ADRISAAF)”.

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za fiziku, Doktorski studij Biofizika

EKOLOGIJA MIKROBNE ZAJEDNICE S NAGLASKOM NA AEROBNE ANOKSIGENE
FOTOTROFE U SREDNJEM JADRANU

Doktorski rad Ive Stojan, mag. biol. mol., kao dio obaveza potrebnih da se dobije doktorat znanosti, izrađen je pod vodstvom mentorice dr. sc. Danijele Šantić, znanstvene savjetnice i komentorice izv. prof. dr. sc. Željke Trumbić.

Dobiveni akademski naziv i stupanj: doktorica prirodnih znanosti.

Povjerenstvo za ocjenu i obranu doktorskog rada u sastavu:

1. _____

Dr. sc. Tomislav Radić, znanstveni savjetnik
(Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split-predsjednik)

2. _____

Izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović
(Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu – član)

3. _____

Doc. dr. sc. Tomislav Rončević
(Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu- član)

4. _____

Dr. sc. Jasna Arapov, viša znanstvena suradnica
(Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split - zamjenski član)

Potvrđuje da je disertacija obranjena dana _____.

Voditelj doktorskog studija: izv. prof. dr. sc. Damir Kovačić

Dekan: prof. dr. sc. Mile Dželalija

ZAHVALE

Od srca zahvaljujem mentorici dr. sc. Danijeli Šantić na ukazanoj prilici i povjerenju za rad na njenom uspostavnom istraživačkom projektu u Laboratoriju za mikrobiologiju. Hvala Vam na svojoj podršci i pomoći, vremenu provedenom na mikroskopu te vrijednim znanstvenim, stručnim i životnim savjetima bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Najveću zahvalnost dugujem komentorici izv. prof. dr. sc. Željki Trumbić na kontinuiranoj podršci. Hvala Vam na nesebičnoj pomoći iz optimizacija protokola, bioinformatike, statistike i R-a, dragocjenom vremenu koje ste uložili u mene (i u podne i u ponoć) te svim životnim savjetima. Bez Vas ne bi bilo ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i dragom kolegi dr. sc. Cristianu Villena-Alemanu na nesebično podijeljenoj taksonomskoj bazi podataka i savjetima u bioinformatičkim analizama, kontroliranju i prepravljaju mog često kaotičnog koda, neprocjenjivim diskusijama i podijeljenom znanju.

Iskreno zahvaljujem i dr. sc. Ani Vrdoljak Tomaš na nesebično podijeljenom znanju iz epifluorescentne mikroskopije i ekologije, stručnim savjetima i velikoj pomoći prilikom terenskih uzorkovanja.

Od srca hvala dr. sc. Ivani Lepen Pleić za podršku i pomoć u laboratoriju, a najviše prilikom optimizacija protokola.

Za pomoć na terenima od srca zahvaljujem Anti Marasoviću. Veliko hvala i Davidu Udovičiću, dr. sc. Krešimiru Markulinu, Heliodoru Prelesniku, Ivanu Pezi te posadi istraživačkog broda BIOS DVA. Od srca hvala i kolegi dr. sc. Slavenu Joziću na pomoći pri uzorkovanju za metodološki članak.

Kolegi doc. dr. sc. Frani Matiću iskreno zahvaljujem na pomoći s algoritmima umjetnih neuronskih mreža.

Zahvaljujem i svim kolegama iz Laboratorija za fiziku mora, Laboratorija za kemijsku oceanografiju i sedimentologiju te Laboratorija za plankton i toksičnost školjkaša Instituta za oceanografiju i ribarstvo na podacima abiotičkih čimbenika.

Veliko hvala od srca svim članovima Povjerenstva za ocjenu i obranu doktorskog rada na dragocjenom vremenu.

Posebnu zahvalu dugujem svom dragom kolegi i iznad svega prijatelju doc. dr. sc. Jerku Hrabaru na kontinuiranoj podršci, savjetima i našim ritualnim polusatnim pauzama za kavu. Hvala Jere za smij, sve lipe riči, Insta text i neupitnu viru u mene, bez tebe ovo putovanje ne bi bilo isto.

Krenem li nabrajati sve svoje drage prijatelje, kolege sa PMF-a iz Splita i molekularce iz Zagreba koji su mi bili podrška na ovom putovanju, završit ću kad Hajduk obrani titulu. Vi znate koji ste i hvala vam svima od srca što postojite.

I za kraj, najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima Marinu i Suzani te sestri Marineli na bezuvjetnoj podršci i ljubavi tijekom cijelog života. Ovu disertaciju posvećujem vama.

**EKOLOGIJA MIKROBNE ZAJEDNICE S NAGLASKOM NA AEROBNE ANOKSIGENE
FOTOTROFE U SREDNJEM JADRANU**

Iva Stojan

Rad je izrađen na Institutu za oceanografiju i ribarstvo, Split

Sažetak

U ovom su radu tijekom jednogodišnjeg istraživanja određeni sastav i dinamika mikrobne zajednice na prostorno-sezonalnoj skali područja srednjeg Jadrana s naglaskom na aerobne anoksigene fototrofe (AAF). Za određivanje strukture ukupne mikrobne zajednice na finijim taksonomskim razinama korištena je kombinacija metabarkodiranja 16S rRNA gena te kvantitativnog CARD-FISH pristupa. Metabarkodiranjem *pufM* gena i IC-FISH metodom određen je sastav zajednice AAF. Kako bi se otkrili obrasci unutar zajednica i protumačili u odnosu na najznačajnije okolišne čimbenike, provedeni su algoritmi umjetnih neuronskih mreža. Pripadnici klada SAR11 prevladavali su u raznolikim okolišnim uvjetima. Uočen je opći obrazac povećanja ukupne mikrobne raznolikosti na račun brojnosti u oligotrofnim uvjetima, posebice povećanjem saliniteta. Primijećena je značajna sezonalnost u prosječnim apsolutnim AAF brojnostima (maksimumi u proljeće: $2,136 \pm 0,081 \times 10^4$, minimumi ljeti: $0,86 \times 10^4$ stanica mL^{-1}), IC-FISH grupama (klad *Roseobacter* prevalentan u jesen, razredi Alpha- i Gammaproteobacteria ljeti) i *pufM* podacima (razlike u mjerama raznolikosti). Nisu uočene razlike u prostornom ni vertikalnom profilu. Zajednica je bila heterogenog sastava s najvećim prosječnim relativnim udjelom klada *Roseobacter* (37,66%), a slijedili su pripadnici Gammaproteobacteria (35,25%) i općih Alphaproteobacteria (31,15%). Otkrivena je prevalencija roda *Luminiphilus* na svim postajama, mjesecima i dubinama. Obrnuti odnos AAF brojnosti i mjera raznolikosti primijećen je ljeti, ali nije uočen za ostala godišnja doba. Visoka raznolikost zajednice bila je neovisna o temperaturi, salinitetu i trofičkom statusu. Dodatno je izvršena detaljna usporedba pet metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a na uzorcima „mock“ i morske zajednice kao temeljnog koraka u metabarkodiranju. Nijedna metoda nije bila najbliža teoretski očekivanom sastavu „mock“ zajednice. Dokazano je da se standardni protokol temeljen na toksičnom fenolu može zamijeniti kraćim i sigurnijim alternativama temeljenima na taloženju izopropanolom i etanolom, dok su rezultati izravnog PCR-a pokazali prednosti smanjenog vremena rukovanja uzorcima.

(154 stranica, 41 slika, 11 tablica, 254 literaturnih navoda, 2 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Knjižnici Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

Ključne riječi: aerobni anoksigeni fototrofi, algoritam neuronskih mreža, DNA izolacije, izravni PCR, mikrobna zajednica, metabarkodiranje, 16S gen, *pufM* gen, raznolikost, srednji Jadran

Mentorica: Dr. sc. Danijela Šantić, znanstvena savjetnica

Ko-mentorica: Izv. prof. dr. sc. Željka Trumbić

Ocjenjivači: 1. Dr. sc. Tomislav Radić, znanstveni savjetnik

2. Izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović

3. Doc. dr. sc. Tomislav Rončević

4. Dr. sc. Jasna Arapov, viša znanstvena suradnica

Rad prihvaćen: 24.4.2024.

**MICROBIAL COMMUNITY ECOLOGY WITH AN EMPHASIS ON AEROBIC
ANOXYGENIC PHOTOTROPHS IN THE CENTRAL ADRIATIC SEA**

Iva Stojan

Thesis performed at Institute of Oceanography and Fisheries, Split

In this thesis, composition and dynamics of the microbial community of the central Adriatic were determined during a one year study on a spatio-temporal scale, with an emphasis on aerobic anoxygenic phototrophs (AAPs). A combination of 16S rRNA metabarcoding and quantitative CARD-FISH approach was used to determine the structure of the total microbial community at finer taxonomic scale. The composition of the AAP community was estimated by *pufM* gene metabarcoding and IR-FISH method. In order to detect and interpret patterns within microbial communities in relation to the most significant environmental factors, artificial neural network algorithms were implemented. Members of SAR11 clade prevailed in diverse environmental conditions. A general pattern was recorded of total microbial diversity increase at the expense of abundance in oligotrophic conditions, especially with increased salinity. A significant seasonality was detected in average absolute AAP counts (maxima in spring: $2.136 \pm 0.081 \times 10^4$ cells mL⁻¹, minima in summer: 0.86×10^4 cells mL⁻¹), IR-FISH groups (*Roseobacter* clade predominant in autumn, classes Alpha- and Gammaproteobacteria in summer) and *pufM* dataset (differences in diversity measures). No differences were observed in the spatial nor vertical profiles. The community had a heterogeneous composition with the highest average relative proportion of the *Roseobacter* clade (37.66%), followed by members of Gammaproteobacteria (35.25%) and Alphaproteobacteria (31.15%). The prevalence of genus *Luminiphilus* was revealed at all stations, months and depths. An inverse relationship between AAP abundance and diversity was observed in summer, but not for other seasons. High AAP diversity was independent of temperature, salinity and trophic status of the environment. Additionally, a detailed comparison of five DNA isolation protocols and direct PCR was performed on mock and marine community samples as a fundamental step in metabarcoding. No method was closest to the theoretically expected mock community composition. It has been demonstrated that conventional and toxic phenol-based protocol can be replaced by its shorter and safer alternatives based on isopropanol and ethanol precipitation, while direct PCR results have shown advantages of reduced sample manipulation time.

(154 pages, 41 figures, 11 tables, 254 references, two supplementary materials, original in Croatian)
Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, University Library in Split, Library of the Faculty of Science University of Split, Library of Institute of Oceanography and Fisheries, Split

Keywords: aerobic anoxygenic phototrophs, neural network algorithms, DNA isolation, direct PCR, microbial community, metabarcoding, 16S gene, *pufM* gene, diversity, central Adriatic

Mentor: Danijela Šantić, PhD, Scientific advisor

Co-mentor: Željka Trumbić, PhD, Associate professor

Reviewers: 1. Tomislav Radić, PhD, Scientific advisor

2. Željana Fredotović, PhD, Associate professor

3. Tomislav Rončević, PhD, Assistant professor

4. Jasna Arapov, PhD, Senior scientific associate

Thesis accepted: 24.4.2024.

SADRŽAJ

Popis slika
Popis tablica
Popis kratica

1.	UVOD	1
1.1.	Mikrobna zajednica morskog ekosustava s naglaskom na ulogu i sastav prokariota	1
1.2.	Aerobni anoksigeni fototrofi morskog ekosustava	8
1.3.	Fluorescencijska <i>in situ</i> hibridizacija (FISH, engl. <i>fluorescence in situ hybridization</i>) u istraživanju mikrobnih zajednica	16
1.4.	Metabarkodiranje gena biljega kao temeljni pristup u identifikaciji i istraživanju raznolikosti mikrobnih zajednica	18
1.5.	Metode izolacije DNA u istraživanjima temeljenim na metabarkodiranju	24
1.6.	Kratki pregled dosadašnjih istraživanja mikrobne i AAF zajednice Jadranskog mora	25
1.7.	Cilj i temeljne hipoteze istraživanja	28
2.	MATERIJALI I METODE	30
2.1.	Područje istraživanja, prikupljanje uzoraka i analiza okolišnih čimbenika	30
2.2.	Optimizacija postupka određivanja strukture bakterijskih zajednica metabarkodiranjem 16S rRNA gena u uzorcima mora	32
2.2.1.	Priprema „mock“ zajednica i prikupljanje uzoraka morskog okoliša za testiranje metoda izolacije DNA	32
2.2.2.	Metode izolacije DNA, amplifikacija ciljanog gena i izravni PCR	33
2.2.3.	Pročišćavanje PCR amplikona, priprema knjižnica i sekvenciranje	38
2.2.4.	Bioinformatička obrada podataka i statistička analiza	39
2.3.	Analiza pikoplanktonske zajednice	41
2.3.1.	Određivanje brojnosti članova pikoplanktonske zajednice protočnom citometrijom	41
2.3.2.	Određivanje bakterijske proizvodnje	42
2.3.3.	Fluorescencijska <i>in situ</i> hibridizacija kataliziranim taloženjem reportera (CARD-FISH, engl. <i>catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization</i>)	43
2.3.4.	Izolacija DNA, PCR amplifikacija i sekvenciranje sljedeće generacije	45
2.3.5.	Bioinformatička obrada podataka, izračun indeksa raznolikosti i statistička analiza	46
2.4.	Analiza sastava zajednice aerobnih anoksigenih fototrofa (AAF)	48
2.4.1.	Određivanje brojnosti aerobnih anoksigenih fototrofa (AAF) epifluorescentnom mikroskopijom	48
2.4.2.	Fluorescencijska <i>in situ</i> hibridizacija u kombinaciji s infracrvenom epifluorescentnom mikroskopijom (IC-FISH, engl. <i>fluorescence in situ hybridization-infrared epifluorescence-based microscopy (FISH-IR)</i>)	49
2.4.3.	Izolacija DNA, amplifikacija <i>pufM</i> gena i pročišćavanje PCR amplikona	50
2.4.5.	Bioinformatika, izračun raznolikosti AAF i statistička analiza	51
2.5.	Dostupnost podataka	54
3.	REZULTATI	55
3.1.	Procjena metoda izolacije DNA na uzorcima „mock“ zajednice	55
3.1.1.	Prinosi DNA i rezultati izravnog PCR-a na uzorcima „mock“ zajednice	55
3.1.2.	Rezultati sekvenciranja amplikona V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena	58
3.1.3.	Sastav „mock“ zajednice	59
3.2.	Procjena metoda izolacije DNA na uzorcima iz okoliša	66
3.2.1.	Prinosi DNA i rezultati izravnog PCR-a na uzorcima iz okoliša	66

3.2.2.	Rezultati sekvenciranja amplicona V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena.....	67
3.2.3.	Sastav bakterijske zajednice u uzorcima okoliša	67
3.3.	Rezultati analize ukupne mikrobne zajednice srednjeg Jadrana.....	73
3.3.1.	Fizikalno-kemijski okolišni čimbenici	73
3.3.2.	Biološki okolišni čimbenici, CARD-FISH rezultati i rezultati sekvenciranja.....	75
3.3.3.	NG analiza CARD-FISH rezultata	84
3.3.4.	NG analiza podataka dobivenih metabarkodiranjem 16S rRNA gena.....	86
3.3.5.	Raznolikost ukupne mikrobne zajednice.....	91
3.4.	Rezultati analize zajednice aerobnih anoksigenih fototrofa srednjeg Jadrana.....	93
3.4.1.	Brojnost aerobnih anoksigenih fototrofa.....	93
3.4.2.	Rezultati brojnosti AAF skupina određenih IC-FISH metodom.....	96
3.4.3.	Sastav AAF zajednice na prostorno-vremenskoj skali određen metabarkodiranjem <i>pufM</i> gena	100
3.4.4.	NG analiza podataka <i>pufM</i> metabarkodiranja aglomeriranih na razini reda.....	106
3.4.5.	NG analiza <i>pufM</i> metabarkodiranih podataka aglomeriranih na razini roda.....	110
4.	RASPRAVA.....	114
4.1.	Procjena pet protokola izolacije DNA i izravnog PCR-a.....	114
4.1.1.	Uzorci „mock“ zajednice	114
4.1.2.	Uzorci okoliša	117
4.2.	Analiza ukupne mikrobne zajednice srednjeg Jadrana.....	119
4.2.1.	Kvantitativna analiza	120
4.2.2.	Kvalitativna analiza	123
4.2.3.	Raznolikost ukupne mikrobne zajednice.....	125
4.3.	Analiza zajednice aerobnih anoksigenih fototrofa	126
4.3.1.	Brojnost AAF zajednice	127
4.3.2.	Kvantitativne brojnosti AAF skupina procijenjene IC-FISH metodom.....	128
4.3.3.	Struktura AAF zajednice dobivena <i>pufM</i> metabarkodiranjem	130
4.3.4.	Okolišni čimbenici koji utječu na AAF zajednicu srednjeg Jadrana	132
5.	ZAKLJUČCI	136
6.	LITERATURA	139
7.	PRILOZI	148
8.	SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	151
9.	SAŽETAK NA ENGLLESKOM JEZIKU	152
10.	ZNANSTVENI RADOVI I SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA.....	153
11.	KRATKI ŽIVOTOPIS.....	154

Popis slika

- Slika 1.1.** Prikaz mikrobne hranidbene mreže i mikrobnog kruga (mikrobna petlja) prema Fenchelu.
- Slika 1.2.** Filogenetsko stablo 16S rRNA gena glavnih koljena domene bakterija.
- Slika 1.3.** Pojednostavljeni prikaz FISH i CARD-FISH metode.
- Slika 1.4.** **A)** Prikaz V1-V9 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena i odgovarajućih početnica za umnažanje ciljane regije. **B)** Prikaz 2D i 3D struktura 16S rRNA.
- Slika 1.5.** Standardni tijek bioinformatičke obrade podataka dobivenih sekvenciranjem amplikona.
- Slika 2.1.** Područje istraživanja i prikaz postaja ST101, CJ007 i CJ009 srednjeg Jadrana.
- Slika 2.2.** Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu nakon amplifikacije V4-V5 regija 16S rRNA gena izravnim PCR-om.
- Slika 2.3.** Rezultati CARD-FISH metode.
- Slika 2.4.** Rezultati IC-FISH metode.
- Slika 3.1.** Prinos nakon izolacija DNA različitim metodama iz uzoraka „mock” zajednice i uzoraka mora prikupljenih 2020. i 2022. godine.
- Slika 3.2.** Prikaz sastava ukupne „mock“ zajednice na razini roda putem toplinske karte.
- Slika 3.3.** **A)** Stupčasti dijagrami prikaza relativnih brojnosti članova „mock“ zajednice na razini obitelji. **B)** Prikaz sastava „core mock“ zajednice na razini obitelji putem toplinske karte.
- Slika 3.4.** Biplot prikaz rezultata analize glavnih komponenti: **A)** „core mock” zajednica aglomerirana na razinu obitelji, **B)** ukupna „mock” zajednica aglomerirana na razinu roda, **C)** okolišni uzorci mora prikupljeni 2020. godine aglomerirani na razinu roda, **D)** okolišni uzorci mora prikupljeni 2022. godine aglomerirani na razinu roda.
- Slika 3.5.** Vennovi dijagrami dijeljenih i jedinstvenih ASV-ova između različitih metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a.
- Slika 3.6.** Stupčasti dijagrami sastava mikrobne zajednice na razini koljena za uzorke mora prikupljene **A)** 2020. **B)** 2022., analizirani različitim metodama izolacije DNA ili izravnim PCR-om.
- Slika 3.7.** Biplot prikaz rezultata analize glavnih komponenti ukupnog skupa podataka „mock” zajednice i okolišnih uzoraka.
- Slika 3.8.** Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara za ispitivano područje u razdoblju od godine dana prikazani za tri postaje po mjesecima te razdvojeni prema dubini uzorkovanja.
- Slika 3.9.** Korelacijski dijagrami između abiotičkih varijabli.
- Slika 3.10.** Sezonska i prostorna raspodjela autotrofnog pikoplanktona: **A)** rod *Synechococcus*, **B)** rod *Prochlorococcus*, **C)** pikoeukarioti.
- Slika 3.11.** Sezonska i prostorna raspodjela heterotrofne sastavnice pikoplanktona: **A)** apsolutne brojnosti heterotrofnih bakterija **B)** bakterijska proizvodnja **C)** udio HNA bakterija.
- Slika 3.12.** Sezonska i prostorna raspodjela udjela bakterijskih skupina određenih CARD-FISH metodom.
- Slika 3.13.** Sezonska i prostorna raspodjela relativnih brojnosti 13 glavnih bakterijskih koljena.
- Slika 3.14.** Prostorno-vremenska raspodjela glavnih proteobakterijskih razreda Alpha- i Gammaproteobacteria, koljena Cyanobacteria i Bacteroidota te domene arheja s relativnim brojnostima najznačajnijih rodova.
- Slika 3.15.** Udjeli bakterijskih skupina određenih CARD-FISH metodom te srednje vrijednosti bioloških i abiotičkih okolišnih čimbenika za NG model CARD-FISH rezultata.
- Slika 3.16.** Relativne brojnosti 24 bakterijska i arhealna koljena grupirana u četiri PHBMU pomoću NG algoritma.
- Slika 3.17.** Srednje vrijednosti bioloških i abiotičkih okolišnih čimbenika prikazane za svaki PHBMU.
- Slika 3.18.** Relativni udio rodova najzastupljenijih bakterija i arheja prikazanih za svaki PHBMU.

Slika 3.19. Krivulja rarefakcije koja pokazuje dovoljnu dubinu sekvenciranja po uzorku za procjenu ukupne mikrobne raznolikosti zajednice.

Slika 3.20. Apsolutne brojnosti aerobnih anoksigenih fototrofa i ukupnih heterotrofnih bakterija prikazane po mjesecima, postajama i dubinama.

Slika 3.21. Prikaz apsolutnih brojnosti AAF u ispitivanom području po sezoni.

Slika 3.22. Prikaz rezultata nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja relativnih brojnosti IC-FISH grupa na sezonskoj ljestvici.

Slika 3.23. Relativne brojnosti AAF grupa Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria i *Roseobacter* dobivene IC-FISH metodom, prikazane po uzorku.

Slika 3.24. Relativna zastupljenost AAF grupa Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria i *Roseobacter* dobivena IC-FISH metodom po sezoni za područje uzorkovanja.

Slika 3.25. Biplot prikaz rezultata analize glavnih komponenti *pufM* skupa podataka prikazanih po sezoni.

Slika 3.26. Sezonska i prostorna raspodjela relativnih brojnosti AAF razreda dobivenih sekvenciranjem *pufM* gena.

Slika 3.27. Sezonska i prostorna raspodjela relativnih brojnosti AAF redova dobivenih sekvenciranjem *pufM* gena.

Slika 3.28. Sezonska i prostorna raspodjela relativnih brojnosti AAF rodova dobivenih sekvenciranjem *pufM* gena.

Slika 3.29. Krivulja rarefakcije koja pokazuje dubinu sekvenciranja po uzorku u svrhu procjene ukupne AAF raznolikosti.

Slika 3.30. Prikaz rezultata NG analize temeljene na *pufM* skupu podataka aglomeriranog na razinu reda uz biotičke i abiotičke okolišne čimbenike.

Slika 3.31. Prikaz rezultata NG analize temeljene na *pufM* skupu podataka aglomeriranog na razinu roda uz biotičke i abiotičke okolišne čimbenike.

Slika 3.32. Prikaz sastava AAF zajednice na razini roda sa pripadajućim clr-vrijednostima po uzorku za svaki BMU pomoću toplinske karte.

Popis tablica

Tablica 2.1. Skraćeni pregled značajki ispitivanih metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a.

Tablica 2.2. Prikaz DNA oligonukleotidnih proba s odgovarajućim udjelom formamida u hibridizacijskom puferu i volumenom NaCl-a korištenog u protokolu CARD-FISH metode.

Tablica 3.1. Koncentracije DNA po uzorku s prikazanim prosječnim vrijednostima i standardnom devijacijom za svaku metodu izolacije te omjeri apsorbancija A260/280 i A260/230.

Tablica 3.2. Rezultati permutacijske multivarijantne analize varijance za uzorke „mock“ zajednice i okolišne uzorke prikupljene 2020. i 2022. godine.

Tablica 3.3. Vrijednosti fizikalno-kemijskih okolišnih čimbenika prikupljenih u srednjem Jadranskom moru na tri postaje tijekom 2021./2022. godine

Tablica 3.4. Rezultati permutacijske multivarijantne analize varijance na podacima 16S rRNA metabarkodiranja.

Tablica 3.5. Prikaz indeksa alfa-raznolikosti arhealnih i bakterijskih kraljevstava po svakom PHBMU.

Tablica 3.6. Rezultati permutacijske multivarijantne analize varijance na podacima apsolutnih brojnosti zajednice AAF-a.

Tablica 3.7. Rezultati permutacijske multivarijantne analize varijance na podacima relativnih brojnosti IC-FISH grupa.

Tablica 3.8. Rezultati permutacijske multivarijantne analize varijance na *pufM* skupu podataka aglomeriranog na razinu roda

Tablica 3.9. Prikaz indeksa alfa-raznolikosti AAF zajednice temeljenih na *pufM* skupu podataka.

Popis kratica

AAF aerobni anoksigeni fototrofi (engl. *aerobic anoxygenic phototrophs*)
ASV varijanta sekvenci amplikona (engl. *amplicon sequence variant*)
ATP adenzin trifosfat
BChl *a* bakterioklorofil *a*
BMU jedinica naboljeg podudaranja (engl. *best match unit*)
CARD-FISH fluorescencijska *in situ* hibridizacija kataliziranim taloženjem reportera (engl. *catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization*)
CFBMU engl. *CARD-FISH best match units*
Chl *a* klorofil *a*
clr centrirani logaritamski omjer (engl. *centered log-ratio*)
dChlMax duboki klorofilni maksimum (engl. *deep chlorophyll maximum*)
DMS dimetil sulfid
DNA deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)
dNTP deoksiribonukleozid- trifosfat
DOC otopljeni organski ugljik (engl. *dissolved organic carbon*)
DOM otopljena organska tvar (engl. *dissolved organic matter*)
DON otopljeni organski dušik (engl. *dissolved organic nitrogen*)
f.c. konačna koncentracija (engl. *final concentration*)
FISH fluorescencijska *in situ* hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization*)
HNA visoki sadržaj nukleinskih kiselina (engl. *high nucleic acid content*)
HNF heterotrofni nanoflagelati
HRP peroksidaza korijena hrena (engl. *horseradish peroxidase*)
IC-FISH infracrvena epifluorescentna mikroskopija i fluorescencijska *in situ* hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization-infrared epifluorescence based microscopy*)
LNA niski sadržaj nukleinskih kiselina (engl. *low nucleic acid content*)
NG engl. *neural gas*
NGS sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*)
OMG oligotrofne morske Gammaproteobacteria
OTU operacijska taksonomska jedinica (engl. *operational taxonomic unit*)
PCA analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*)
PCR lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
PERMANOVA permutacijska multivarijantna analiza varijance
PES polietersulfon
PHBMU engl. *PHYLA best match units*
POM partikulirana organska tvar (engl. *particulate organic matter*)
RNA ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)
ROS štetni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)
rRNA ribosomalna RNA
RuBisCO ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza
SOM samoorganizirajuća mapa (engl. *self-organizing map*)
TBDT TonB-ovisni transporteri
TCA trikloroetena kiselina

1. UVOD

1.1. Mikrobna zajednica morskog ekosustava s naglaskom na ulogu i sastav prokariota

Nevidljivi golom oku, mikroorganizmi su najstarija, najbrojnija i najraznolikija skupina živućih organizama na planeti Zemlji. Sveprisutni su u najrazličitijim i najekstremnijim okolišima te se svrstavaju u sve tri domene živog svijeta: bakterije, arheje i eukariote (Boudouresque *i sur.*, 2015).

Oceani prekrivaju više od 70% Zemljine površine te su ključni u regulaciji klimatskih uvjeta i primarnoj proizvodnji hranjivih tvari. Smatra se da su izvor otprilike pola kisika dostupnog na Zemlji. Glavni pokretači ciklusa kruženja energije i raznovrsnih hranjivih tvari u ekosustavima svjetskih mora i oceana upravo su mikroorganizmi, koji sačinjavaju više od 90% žive biomase navedenih ekosustava (Suttle, 2007). Pikoplankton je najzastupljenija skupina jednostaničnih (mikro)organizama morskog ekosustava, a njegovi se pripadnici svrstavaju u prokariote i eukariote. Pikoplankton podrazumijeva dio planktonske zajednice koji obuhvaća veličinsku frakciju stanica promjera od 0,2 μm do 2 μm , a bakterije i arheje njegova su najbrojnija sastavnica (Krstulović & Šolić, 2006). Članovi mikrobne zajednice aktivni su sudionici morskog okoliša zaslužni za biotransformacije brojnih anorganskih spojeva i prijenos biomase na više trofičke razine. Svojom raznolikom funkcionalnom ulogom uključeni su u kompleksne procese hranidbene mreže, posebice u oligotrofnim područjima kao što je Jadransko more, koje je ograničeno fosforom i dušikom (Cotner & Biddanda, 2002; Vilibić *i sur.*, 2012). Prethodna istraživanja pokazala su da pikoplanktonska zajednica Jadrana brzo i raznoliko reagira na promjene u okolišu (Šolić *i sur.*, 2022; Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2023a), posebice na povećanje temperature (Šolić *i sur.*, 2017). U kontekstu globalnog zatopljenja, odgovori navedenih zajednica se kontinuirano proučavaju kako bi se dodatno razjasnila uloga mikrobne hranidbene mreže u kruženju ugljika u morima i oceanima (Sarmiento *i sur.*, 1998; Šolić *i sur.*, 2017, 2020).

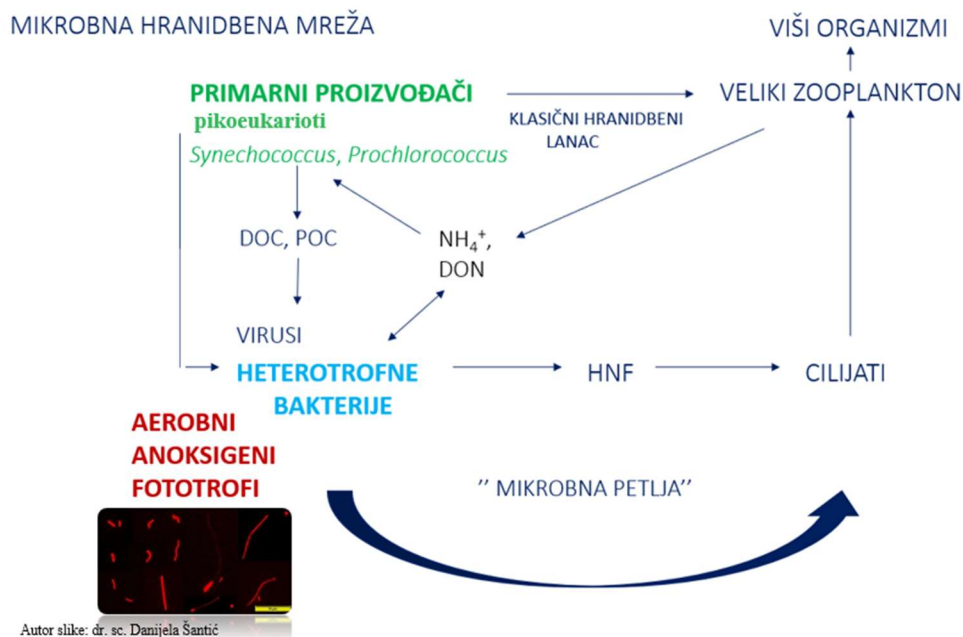
Svaki okoliš opisan je složenim odnosima između biotičkih i abiotičkih sastavnica koje ga sačinjavaju. Brojni čimbenici direktno i/ili indirektno utječu na veličinu i dinamiku zajednica morskih mikroorganizama, a mogu se podijeliti u tri glavne skupine: 1) izvori ugljika i ostalih hranjivih tvari (metabolita) te izvori energije, 2) abiotički okolišni čimbenici poput temperature, saliniteta, svjetla, gibanja vodenih masa, te 3) odnosi između mikroorganizama koji imaju prvenstveno hranidbenu ulogu (Krstulović & Šolić, 2006; Šantić *i sur.*, 2019; Vilibić & Šantić, 2008). Uzimajući u obzir izvore ugljika koje koriste kao i načine dobivanja energije,

mikroorganizmi su veoma svestrani po metaboličkim strategijama na koje se oslanjaju. Ukratko, možemo ih podijeliti na fototrofe, kemo-(organo- ili lito-)trofe i fotoheterotrofe (Eiler, 2006; Vrdoljak Tomaš, 2020). Fototrofija podrazumijeva niz biokemijskih procesa pretvorbe elektromagnetskog sunčevog zračenja u kemijsku energiju. Kemo-(organo- ili lito-) trofija predstavlja dobivanje energije oksidacijom kemijskih spojeva, pri čemu litotrofi koriste anorganske spojeve poput vode, amonijaka, vodika ili sulfida, a organotrofi se oslanjaju na ugljik u reduciranom (organskom) obliku, poput primjerice šećernih monomera i polimera. Fotoheterotrofija je miksotrofna, odnosno kombinirana metabolička strategija temeljno organotrofnih organizama koji posjeduju dodatnu sposobnost korištenja sunčeve energije za nadoknadu staničnih energetske potreba, prilikom čega se otopljeni organska tvar koristi kao izvor ugljika, a elektromagnetsko sunčevo zračenje za proizvodnju vlastitog adenozin trifosfata (ATP), umjesto isključivog oslanjanja na staničnu respiraciju (Eiler, 2006). Prema asimilaciji određenog tipa ugljika iz okoliša, mikroorganizme možemo podijeliti na heterotrofne i autotrofne, prilikom čega heterotrofija podrazumijeva proces asimilacije ugljika u već reduciranom (organskom) obliku i njegovu ugradnju u svoju biomasu, a autotrofija redukciju ugljikovog dioksida, uz utrošak energije, u organsku formu (Krstulović & Šolić, 2006). Najznačajniji fotoautotrofi koji za ovaj proces koriste sunčevu svjetlost te predstavljaju temeljne primarne proizvođače reduciranog ugljika u morskom ekosustavu uz provođenje oksigene fotosinteze (prilikom koje se oslobađa kisik) su cijanobakterije rodova *Prochlorococcus* i *Synechococcus*, zaslužni za otprilike 25% ukupne primarne proizvodnje u svjetskim oceanima (Partensky *i sur.*, 1999; Flombaum *i sur.*, 2013). Uz pikoeukariote, kojima pripadaju fototrofni i heterotrofni protoktisti, cijanobakterije tvore frakciju pikofitoplanktona. Rod *Prochlorococcus* sveopće je dominantan fototrof u oligotrofnim područjima otvorenih oceana koji obitava u slojevima mora dubine do ~150 m, za razliku od roda *Synechococcus*, koji zauzima šire ekološke niše te ga se nalazi i u polarnim regijama i eutrofnim područjima (Flombaum *i sur.*, 2013).

Razumijevanje hranidbenih odnosa koji oblikuju određeni ekosustav važno je za temeljno poznavanje funkcioniranja tog ekosustava (Krstulović & Šolić, 2006). Za razumijevanje ekosustava morskog okoliša, kao najvećeg rezervoara mikroorganizama na svijetu, potrebno je temeljno rasvijetliti njihovu ulogu u hranidbenom lancu, što je prvi put objedinjeno i razjašnjeno prema Azam *i sur.* teorijom „mikrobnog kruga“ (Azam *i sur.*, 1983). Ukratko, prva teorija mikrobnog kruga podrazumijeva da bakterioplankton, kojeg sačinjavaju najvećim dijelom heterotrofne bakterije, konzumira otopljenu organsku tvar iz okoliša (DOM, engl. *dissolved organic matter*), prvenstveno otopljeni organski ugljik (DOC, engl. *dissolved organic carbon*).

DOC se u moru sastoji od dviju frakcija, labilnih spojeva koji su odmah dostupni bakterijama te frakcije koju čine kompleksniji spojevi koji zahtijevaju prethodnu obradu. Izvori DOC-a u moru su različiti po podrijetlu. Vanjski izvori su od manje važnosti te su među njima najznačajniji atmosfera i rijeke. Značajniji su unutrašnji izvori poput primjerice fitoplanktona koji je glavni izvor DOC-a bilo putem aktivnog izlučivanja stanica, autolizijom ili pak razgradnjom mrtvih odnosno poluraspadnutih stanica. Nadalje, važni su izvori i izlučivanje mikro- i makrozooplanktona, izlučivanje i raspadanje bentonskih algi te partikulirana organska tvar (POM, engl. *particulate organic matter*) (Krstulović & Šolić, 2006).

Heterotrofne bakterije postaju plijenom heterotrofnih piko- i nanoflagelata (HNF) te cilijata, čime se njihova biomasa prenosi prema višim trofičkim razinama. Heterotrofni pikoflagelati i HNF sami postaju plijenom viših organizama poput velikog zooplanktona čime se prijenos biomase nastavlja (Azam *i sur.*, 1983). Uz opise novih bakterijskih vrsta i arheja, njihovih funkcionalnih uloga, kao i spoznaja o neistraženoj i golemoj raznolikosti mikroorganizama i morskih virusa, ideju mikrobnog kruga razradio je i proširio Fenchel (Slika 1.1). Obuhvaćajući dotadašnja otkrića, ispostavilo se da koncept mikrobnog kruga i mikrobne hranidbene mreže nije ni približno jednostavan kako se prethodno smatralo (Fenchel, 2008). Proširena teorija mikrobnog kruga, koji predstavlja zatvoreni dio mikrobne hranidbene mreže i obuhvaća bakterije, flagelate i cilijate, ali se ne može proučavati odvojeno od nje, podrazumijeva da heterotrofne bakterije konzumiraju DOM koji nastaje kao proizvod primarnih proizvođača, prvenstveno cijanobakterija rodova *Prochlorococcus* i *Synechococcus* te pikoeukariota, ali u manjoj mjeri i razgradnjom zooplanktona. Uz DOM, bakterije su značajni konzumenti i anorganskih soli, u prvom redu ortofosfata te otopljenog anorganskog (NH_4^+) i organskog dušika. Heterotrofni piko- i nanoflagelati, kao glavni predatori bakterija i cijanobakterija, ispašom kontroliraju njihovu stalnu brojnost u okolišu. Cilijati konzumiraju heterotrofne, ali i autotrofne nanoflagelate te se prijenos energije konzumirane iz DOM-a reciklira u hranidbeni lanac kroz mikrobni krug (također zvan i „mikrobna petlja“). Još jedna ključna i veoma raznolika sastavnica mikrobne hranidbene mreže koja je donedavno smatrana potpunom nepoznanicom su morski virusi. Specifični bakteriofagi inficiraju i liziraju odgovarajuće bakterijske stanice, prilikom čega se oslobađa otopljena i partikulirana organska tvar (Suttle, 2007). Pretpostavlja se da morski virusi, kao najbrojniji biološki entiteti u oceanima, dnevno ubijaju i do 20% ukupne mikrobne biomase, što ih čini ključnima u regulaciji stalne brojnosti populacija bakterijskih i arhealnih zajednica (Suttle, 2007). Oslobođene elemente nastale lizom bakterijskih stanica, poput ugljika, fosfora, dušika i ostalih, iskorištavaju živi mikroorganizami u okolišu.



Slika 1.1. Prikaz mikrobne hranidbene mreže i mikroganog kruga („mikrobna petlja“) prema Fenchelu (2008): DOC (engl. *dissolved organic carbon*) predstavlja otopljeni organski ugljik, POC (engl. *particulate organic carbon*) partikulirani organski ugljik, DON (engl. *dissolved organic nitrogen*) otopljeni organski dušik. Aerobni anoksigeni fototrofi primjer su posjedovanja miksotrofne metaboličke strategije, fotoheterotrofije, čije je otkriće značajno proširilo spoznaje o biogeokemijskim procesima i protoku ugljika u moru.

Miksotrofija, odnosno pojava kombiniranog auto- i heterotrofnog metabolizma, važna je metabolička strategija koja je dugo vremena ostala zanemarena u konceptu mikrobne hranidbene mreže. Među morskim mikroorganizmima najpoznatija miksotrofna metabolička strategija jest fotoheterotrofija, čiji su najznačajniji predstavnici aerobni anoksigeni fototrofi (AAF, engl. *aerobic anoxygenic phototrophs*) (Yurkov & Beatty, 1998b). Otkriće fotoheterotrofije je značajno doprinijelo promjeni paradigme o ciklusu kruženja ugljika u okolišu i razumijevanju ekologije morskih mikroorganizama (Eiler, 2006). Uz fotoheterotrofiju, primjer miksotrofne metaboličke strategije jest konzumacija organske tvari od strane eukariotskog fitoplanktona ili bilo koja druga strategija dobivanja energije i izvora ugljika kombinirajući auto- i heterotrofnu prehranu (primjerice fotosintetski zooplankton) (Stoecker *i sur.*, 2017). Organizmi miksotrofne metaboličke strategije značajno doprinose primarnoj i sekundarnoj proizvodnji te u natjecanju s organizmima ostalih metaboličkih strategija oblikuju mikrobnu hranidbenu mrežu morskog ekosustava.

Prokariotska frakcija pikoplanktona, za koju je poznato da tvori i preko 90% ukupne mikrobne biomase svjetskih oceana, veličinom stanica i sastavom zajednice prilagođena je na

oligotrofne uvjete morskog ekosustava (Suttle, 2007). Velik omjer površine i volumena manjih stanica prosječnog morskog prokariota osigurava bolju apsorpciju potrebnih hranjivih tvari te prilagodbu na nutrijentima siromašne uvjete okoliša. Velike stanice u pravilu obitavaju u većim brojnostima u eutrofnim područjima i svrstavaju se u „r-stratege“ koji podrazumijevaju nestabilne bakterijske populacije u vidu njihovih brojnosti koje su uglavnom niske u siromašnim okolišima, dok su u kulturi lako uzgojive i imaju kratko generacijsko vrijeme. Nasuprot navedenom, male stanice čija je brojnost relativno stabilna u okolišu, poznatije kao „K-stratezi“, dobro su prilagođene na korištenje niskih koncentracija dostupnih nutrijenata i često ne mogu rasti u eutrofnim uvjetima, nego isključivo u oligotrofnima (Fuhrman & Hagestorm, 2008). Većina bakterija i arheja morskog ekosustava prilagođene su upravo oligotrofnim uvjetima života u obliku slobodno živućih/pojedinačnih stanica i teško su uzgojive u staničnim kulturama.

Najbrojniji predstavnik mikrobne zajednice u svjetskim oceanima koji pripada „K-strategu“ jest klad SAR11 razreda Alphaproteobacteria (koljeno Proteobacteria odnosno Pseudomonadota), koji može sačinjavati i do polovice ukupne mikrobne zajednice eufotičke zone oceana (Morris *i sur.*, 2002). SAR11 je veoma raznolika i evolucijski drevna skupina miksotrofnih bakterija važnih u ciklusu kruženja ugljika u oceanima. Oslanjaju se na raznovrsne spojeve otopljene organske tvari kao primarni izvor ugljika, dok kao temeljni izvor energije koriste stanično disanje ili sintezu ATP-a pomoću proteorodopsina korištenjem sunčeve energije (Giovannoni *i sur.*, 2005). Za razliku od većine nekulturable mikroorganizama otkrivenih DNA sekvenciranjem okolišnih uzoraka, koji se nazivaju „tamnom materijom mikrobne raznolikosti“, određeni pripadnici klada SAR11 uspješno su uzgojeni u staničnim kulturama u laboratorijskim uvjetima metodom „razrjeđenja do ekstinkcije“ i danas se intenzivno proučavaju (Giovannoni, 2017). Svi članovi klada SAR11 uglavnom pripadaju redu Pelagibacterales, vibroidne su i slobodno živuće stanice. Posjeduju brojne prilagodbe na nutrijentima siromašne uvjete morskog okoliša, poput minimalne veličine stanica, u pravilu promjera manjeg od 1 μm , optimalnog omjera površine stanice i biovolumena te reduciranog genoma (Giovannoni, 2017). Zajednički (engl. *core*) genom reda Pelagibacterales, koji podrazumijeva set gena koji dijele svi njegovi pripadnici, do sada je jedan od najkonzerviranijih opisanih bakterijskih genoma (Grote *i sur.*, 2012). Prvi pripadnik ovog klada uspješno izoliran u čistoj staničnoj kulturi, *Pelagibacter ubique*, posjeduje jedan od najmanjih genoma jednog slobodno živućeg organizma veličine 1,2 Mbp (mega baznih parova) (Rappe *i sur.*, 2002; Grote *i sur.*, 2012). Sekvenciranjem genoma *P. ubique* otkriveno je da ne sadrži introne, transpozone, gene faga, pseudogene, izvankromosomske elemente ili inteine, već samo gene za osnovne metaboličke i regulatorne funkcije nužne za opstanak stanice

(Giovannoni *i sur.*, 2005). Prema „streamlining“ teoriji, izuzetno malena veličina genoma pripadnika SAR11, koji ne sadrže nefunkcionalne ili redundantne gene, uz izrazito malu veličinu stanica, omogućila im je značajnu evolucijsku prednost u prilagodbi na oligotrofne uvjete okoliša (Giovannoni *i sur.*, 2014). Ostali pripadnici razreda Alphaproteobacteria, od kojih su predstavnici slični rodu *Roseobacter* najistraženiji, preferiraju konzumaciju malih i raznolikih organskih molekula prisutnih kao DOM, poput šećernih monomera, aminokiselina, dimetilsulfoniopropionata (DMSP), glikolata, amina, uree i fosfonata (Luo & Moran, 2014; Schada von Borzyskowski *i sur.*, 2019). Uz bitnu ulogu u kruženju sumpornih spojeva poput transformacije DMSP-a u dimetilsulfid (DMS) uz pomoć enzima DMSP demetilaza, DMSP liaza i trimetilamin monooksigenaza, dokazano je kako članovi razreda Alphaproteobacteria, prvenstveno rozeobakteri (engl. *roseobacters*), pokazuju i sezonalnu dinamiku uz praćenje fitoplanktonskog cvjetanja (Gonzalez *i sur.*, 2000; Teng *i sur.*, 2021).

Uz već spomenute pripadnike razreda Alphaproteobacteria kao najbrojnije bakterijske predstavnike u mikrobnj zajednici svjetskih oceana i generalno dobre kompetitore u oligotrofnim uvjetima morskog ekosustava, razred Gammaproteobacteria izdvaja se kao druga brojna i veoma raznolika proteobakterijska skupina u vodenom stupcu i morskim sedimentima. Uočeno je da također pokazuju sezonalnu dinamiku povezanu s fitoplanktonskim cvjetanjem u proljeće (Francis *i sur.*, 2021). Pripadnici razreda Gammaproteobacteria primarno se oslanjaju na konzumaciju većih biopolimera kao primarnog izvora ugljika. Određeni pripadnici ovog razreda specijalizirani su i za korištenje malih organskih molekula u rasponu od aminokiselina i monosaharida do manje očekivanih supstrata poput terpenoida, aromatskih spojeva i bifenila (Francis *i sur.*, 2021). Asimilacija tako širokog spektra supstrata otopljene organske tvari od strane Gammaproteobacteria moguća je zbog postojanja ključnih TonB-ovisnih transportera (TBDT). Ova skupina je i jedan od glavnih rezervoara TBDT gena u morskom okolišu (Tang *i sur.*, 2012). TBDT su membranski proteini vanjske stanične membrane Gram-negativnih bakterija preko kojih se odvija transport kemijski raznovrsnih spojeva. Također, pokazuju visoki afinitet za komplekse željeza poput transferina, hemoglobina i hema, siderofora i citrata te vitamina B i metala poput nikla (Noinaj *i sur.*, 2010; Tang *i sur.*, 2012). Geni koji kodiraju za TBDT proteine široko su rasprostranjeni u redovima Sphingomonadales i Alteromonadales koji pripadaju Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes grupi te u oligotrofnim morskim Gamaproteobacteria-ma (OMG), poput pripadnika klada SAR92 i linije OM60/NOR5. Uz brojne poznate predstavnike morskih Gammaproteobacteria uzgojive u staničnim kulturama poput rodova *Alteromonas*, *Glaciecola*, *Oceanospirillum* i *Pseudoalteromonas*, ovaj razred sadrži uglavnom nekulturable predstavnike

od kojih je najbrojniji i najšire rasprostanjen klad SAR86 (Korlević, 2015). Predstavljen sa čak pet različitih globalnih ekotipova, SAR86 je vrlo raznolika skupina sa značajnom taksonomskom, funkcionalnom i genetičkom raznolikošću za koju se pretpostavlja da može biti uzrokovana upravo diverzifikacijom lokusa povezanima s genima koji kodiraju za TBSDT (Hoarfrost *i sur.*, 2020).

Još jedna skupina bakterija koja posjeduje veliki broj TBSDT gena su pripadnici skupine Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes, odnosno koljena Bacteroidetes (Bacteroidota). Iza koljena Proteobacteria i Cyanobacteria, predstavnici koljena Bacteroidetes najbrojnija su grupa morskog bakterioplanktona, gdje u obalnim morskim područjima mogu sačinjavati od 10% do 30% ukupne bakterijske zajednice (Alonso-Sáez & Gasol, 2007). Pripadnici ovog koljena su Gram-negativne bakterije koje mogu biti ili obliganti anaerobi ili obligatni aerobi, poput primjerice Flavobacteria (Thomas *i sur.*, 2011). Najpoznatiji pak kao ključni pripadnici mikrobioma probavnog trakta čovjeka i općenito sisavaca, ova veoma raznolika skupina zaokuplja brojne ekološke niše i sveprisutna je u brojnim staništima poput tla, jezera, sedimenata, morskog leda, hidrotermalnih izvora te površinskih i dubokomorskih slojeva oceana (Pommier *i sur.*, 2007; Thomas *i sur.*, 2011; Zhu *i sur.*, 2023). Prvi sekvencirani genom predstavnika morskih Bacteroidetes-a potvrdio je pretpostavku da ovi mikroorganizmi imaju značajnu ulogu u razgradnji spojeva visoke molekularne mase poput različitih polimera te pokazuju preference prema rastu na podlogama: pričvršćeni za čestice ili stanice algi brojnim adhezijskim proteinima. Uz navedeno, pripadnici morskog koljena Bacteroidetes posjeduju raznolike metaboličke prilagodbe na siromašne uvjete okoliša, kao što su velik broj raznovrsnih enzima poput peptidaza i proteaza te glikozid hidrolaza i glikozil transferaza, upućujući na značajan proteolitički i glikolitički potencijal ove skupine (Fernández-Gómez *i sur.*, 2013). Bacteroidetes imaju primarnu ulogu razlagača partikulirane organske tvari u morskom okolišu. Pripadnici ovog koljena koji sadrže proteorodopsin slobodno plivajuće su bakterije te posjeduju značajno manje genome uz visoki broj gena uključenih u fiksaciju ugljikovog dioksida, što im osigurava prednost u siromašnim uvjetima površinskog sloja mora (Fernández-Gómez *i sur.*, 2013).

Najmanje istražena domena života, za koju se u početku njena otkrića smatralo kako zaokuplja isključivo rijetke ekološke niše ekstremnih staništa poput hidrotermalnih izvora, anoksičnih okoliša i slanih jezera, obuhvaća prokariote arheje (DeLong, 2021). Otkrivene 1977. filogenetskom analizom ribosomalne rRNA i definirane kao potpuno nova domena života, tada su nazvane Archaeobacteria zbog pretpostavljenih sličnosti s domenom Bacteria (Woese & Fox, 1977). U početku su se smatrale isključivo anaerobnim metanogenima, međutim daljnja

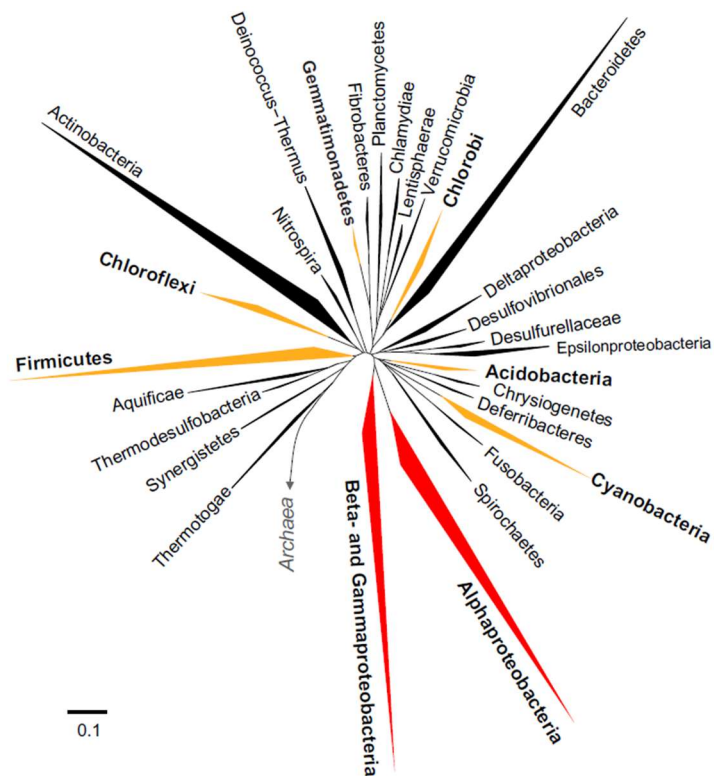
istraživanja su pokazala da su i halofili, termoacidofili i ekstremni termofili (Woese & Fox, 1977). Iznenadujuće, 1990tih otkriveni su novi pripadnici ove domene, koljena Crenarchaeota (nazvanih *Marine Group I*) te Thermoplasma (nazvanih *Marine Group II*), brojni u okolišima bogatim kisikom: morskom prioblanom području i dubomorskim slojevima (DeLong, 1992). Različitih metaboličkih strategija poput kemoautotrofije gdje se oslanjaju na amonijak kao donor elektrona te heterotrofije, za arheje u morskom okolišu je zasada poznato da su uglavnom slobodno živeći mikrobi ili simbionti spužava, poput primjera spužve *Axinella mexicana* i njenog simbionta arheje *Cenarchaeum symbiosum* (DeLong, 2021).

1.2. Aerobni anoksigeni fototrofi morskog ekosustava

Aerobni anoksigeni fototrofi (AAF, engl. *aerobic anoxygenic phototrophs*, AAP) jedinstvena su funkcionalna skupina bakterija sveprisutnih u brojnim staništima, a slučajno su ih otkrili 1970-ih japanski znanstvenici u blizini Tokya (Harashima *i sur.*, 1989). Prilikom odvajanja i dokazivanja pigmenta korištenjem tankoslojne kromatografije s površine zelene morske alge *Enteromorpha linza*, neočekivano je uočen plavi pigment za koji se ispostavilo da je bakterioklorofil *a* (BChl *a*). Izolirana s površine spomenute morske alge, prva opisana AAF vrsta bila je aerobna anoksigena bakterija narančastih kolonija *Erythrobacter longus* (Shiba & Simidu, 1982). Drugi izolirani predstavnici AAF bakterija bile su dvije vrste roda *Roseobacter*, *Roseobacter denitrificans* i *Roseobacter litoralis* (Shiba, 1991). Do tada se smatralo da isključivo fotosintetske bakterije sposobne za rast u anaerobnim ili semiaerobnim uvjetima posjeduju BChl *a* (Koblížek, 2015). Daljnjim istraživanjima mjerenjem autofluorescencije BChl *a* pokazano je da su AAF poprilično brojni u eufotičkim zonama oceana i to s brojnostima od najmanje 11% ukupne bakterijske populacije (Kolber *i sur.*, 2001). Spoznaja da koriste primarno heterotrofni metabolizam oslanjajući se na otopljenu organsku tvar čime zadovoljavaju i do 80% staničnih potreba za energijom, uz dodatno provođenje aerobne anoksigene fotosinteze za nadoknađivanje energetske potreba kada je nužno, poprilično je iznenadila tadašnju znanstvenu zajednicu (Yurkov & Beatty, 1998b). Ispostavilo se da su AAF brojni, aktivni i poprilično važni sudionici u ciklusu kruženja ugljika u raznim ekosustavima (Yurkov & Csotonyi, 2009). Otkriveno je da ne naseljavaju samo površine morskih algi i oceane, već i tla (Csotonyi *i sur.*, 2010), rijeke (Suyama *i sur.*, 2002), jezera (Mašin *i sur.*, 2008), estuarije (Waidner & Kirchman, 2007) kao i ekstremna staništa poput slanih jezera (Labrenz *i sur.*, 2000) te dubokomorskih hidrotermalnih izvora (Yurkov & Beatty, 1998a).

Tri grupe prokariotskih organizama planktonske zajednice u morskom ekosustavu mogu koristiti sunčevu svjetlost kao izvor energije: aerobni oksigeni plankton koji proizvodi kisik i sadrži klorofil s već spomenutim predstavnicima cijanobakterija rodova *Synechococcus* i *Prochlorococcus* kao primarnim proizvođačima, aerobni anoksigeni fototrofi koji sadrže bakterioklorofil i nikada ne proizvode kisik te fotoheterotrofne bakterije koje koriste proteorodopsin kao protonsku pumpu reguliranu svjetlom za sintezu ATP-a (Béjà & Suzuki, 2008).

AAF su dakle fakultativni fotoheterotrofi koji prikupljaju svjetlosno elektromagnetsko zračenje i stvaraju ATP pomoću jedinstvenih fotosintetskih reakcijskih centara koji sadrže pigment BChl *a* putem procesa fotofosforilacije, međutim, prvenstveno se oslanjaju na heterotrofni metabolizam odnosno otopljenu organsku tvar kao izvor energije (Hauruseu & Koblížek, 2012; Koblížek, 2015). Anoksična fotosinteza evolucijski je drevna metabolička strategija jedinstvena za bakterije, a pretpostavlja se da se prvi put pojavila prije 3 milijarde godina još u razdoblju Arhaika dok je Zemljina atmosfera većinom bila anoksična (Bekker *i sur.*, 2004; Koblížek, 2015). To je proces kojim se za razliku od klasične oksigene fotosinteze ne proizvodi kisik. Anoksična fotosinteza može se podijeliti na anaerobnu i aerobnu, prilikom čega anaerobna podrazumijeva anoksične uvjete okoliša koristeći reducirane anorganske spojeve za proizvodnju stanične biomase iz ugljikovog dioksida, a aerobna obvezatno aerobne uvjete prilikom čega se ne proizvode značajnije količine stanične biomase iz ugljikovog dioksida (Biebl & Wagner-Döbler, 2006). Poznato je da šest glavnih bakterijskih koljena imaju sposobnost provoditi anoksičnu fotosintezu, a to su Proteobacteria (ljubičaste fotosintetske bakterije), Chlorobi (zelene sumporne bakterije), Chloroflexi (zelene nesumporne bakterije), Firmicutes, Acidobacteria i Gemmatimonadota (Koblížek, 2015) (Slika 1.2). AAF, koliko je zasada poznato, pripadaju koljenu Proteobacteria (razredi Alpha-, Beta- i Gammaproteobacteria), iako je nedavno otkriveno i da određeni pripadnici neistraženog koljena Gemmatimonadota posjeduju sposobnost provođenja aerobne anoksične fotosinteze (Mujakić *i sur.*, 2021, 2022).



Slika 1.2. Filogenetsko stablo 16S rRNA gena glavnih koljena domene Bacteria; crveno je označeno koljeno Proteobacteria (razredi Alpha-, Beta- i Gammaproteobacteria) kojima pripadaju aerobni anoksiogeni fototrofi (AAF). Ostala koljena koja imaju sposobnost provođenja anoksiogene fotosinteze označena su narančasto. Preuzeto iz Koblížek, 2015.

Definirano je pet specifičnih značajki po kojima se AAF bakterije razlikuju od klasičnih anoksiogenih fototrofa: 1) zahtijevajući kisik za fotosintezu, nikada nisu stanovnici anaerobnih okoliša, 2) paradoksalno, sinteza pigmenta BChl *a* inhibirana je prisutnošću svjetla, 3) ne provode Calvinov ciklus niti posjeduju mogućnost asimilacije anorganskog ugljika zbog nedostatka enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (RuBisCO), 4) posjeduju mnogo manji broj fotosintetskih jedinica po stanici, 5) posjeduju velike količine pomoćnih pigmenta karotenoida (Yurkov & Csotonyi, 2009).

Ukratko, AAF prikupljaju svjetlosnu energiju u kompleksima koji sadrže karotenoide i BChl *a* kao glavni pigment, nakon čega se događa prijenos energije u reakcijski centar gdje se odvijaju redoks procesi. Posjeduju membranski fotosustav I u kojem se događa ciklički prijenos elektrona potaknut svjetlom u oksičnim uvjetima te zbog elektrokemijskog gradijenta protona nastaje ATP uz pomoć enzima ATP sintaze. S obzirom da ne posjeduju fotosustav II prisutan u procesima klasične fotosinteze, prilikom opisanog procesa ne stvara se NADPH, ne dolazi do

fotolize vode niti nastanka kisika (Okamura *i sur.*, 1985). Sve AAF vrste sadržavaju BChl *a* kao glavni pigment u apsorpciji svjetla. Njegova je koncentracija pak značajno niža u AAF stanicama nego u purpurnim nesumpornim bakterijama te se ne može sintetizirati u prisustvu svjetla uz potencijalno objašnjenje da bi intermedijeri biosintetskog puta BChl *a*, uz prisustvo svjetla i kisika, rezultirali proizvodnjom štetnih kisikovih radikala ili ROS-ova (engl. *reactive oxygen species*) (Shiba, 1987; Koblížek *i sur.*, 2010). Nasuprot navedenom, AAF posjeduju velike koncentracije karotenoida koje su razlog živopisnih boja njihovih kolonija uzgojenih u staničnim kulturama, poput narančaste, crvene, ružičaste ili žute (Koblížek, 2015). Sastav karotenoida značajno se razlikuje u različitim AAF vrstama, poput primjerice sferoidenona u vrsti *Roseobacter sp.* soja COL2P ili pak zeaksantina i bakteriorubiksantina u vrsti *Erythrobacter sp.* soja NAP1, a služe kao pomoćni pigmenti koji proširuju apsorpciju svjetla u plavo-zelenom dijelu spektra (Yurkov & Csotonyi, 2009; Šlouf *i sur.*, 2013). Za *Erythrobacter longus* pokazano je da posjeduje čak 20 različitih karotenoida, od cikličkih β -karotena do acikličkih spojeva poput spiriloksantina (Takaichi *i sur.*, 1990). Posjedovanje raznolikih skupina karotenoida posebno je važno u morskom okolišu gdje jedino svjetlost plavo-zelenog dijela spektra dopire u dublje slojeve mora, a karotenoidi je apsorbiraju i omogućavaju prijenos ekscitacijske energije na BChl *a* u pikosekundama koja se potom koristi za razdvajanje naboja u reakcijskom centru (Šlouf *i sur.*, 2013; Koblížek, 2015). Mnogi AAF predstavnici redova Sphingomonadales i Rhodospirillales sadržavaju i velike količine karotenoida nevezanih za fotosintetske komplekse za koje se pretpostavlja da imaju fotoprotektivnu ulogu (Koblížek, 2015).

Pokazano je da izlaganje svjetlu zaustavlja proces staničnog disanja kod AAF bakterija i dovodi do povećanja koncentracije staničnog ATP-a u aerobnim uvjetima, indicirajući da AAF imaju sposobnost zamjene velikog udjela oksidativne fosforilacije procesom fotofosforilacije u ovim uvjetima (Okamura *i sur.*, 1986; Koblížek *i sur.*, 2010). Pitanje zašto AAF ne mogu rasti anaerobno uslijed iluminacije odgovoreno je eksperimentom u anaerobnim uvjetima. Naime, dokazano je da tada dolazi do blokade svjetlom inducirane oksidacije reakcijskog centra, oksidacije citokroma *c551* te translokacije protona nužnih za elektrokemijski gradijent, što dovodi do nemogućnosti sinteze ATP-a (Okamura *i sur.*, 1985).

Kao što je već spomenuto, AAF ne mogu asimilirati anorganski ugljik u obliku ugljikovog dioksida zbog nedostatka enzima RuBisCo, stoga im je potreban vanjski izvor organskog (reduciranog) ugljika (Yurkov & Csotonyi, 2009). Značajna metabolička prilagodljivost, uočljiva kroz primarno heterotrofni metabolizam kombiniran sa spomenutom strategijom korištenja svjetlosne energije za nadopunu energetske stanice kroz sintezu ATP-a procesom

fotofosforilacije, osigurala je pripadnicima AAF zajednice ekološku prednost nad isključivo autotrofnim odnosno heterotrofnim članovima mikrobne zajednice. Mogućnost korištenja svjetla kod ove bakterijske skupine dokazano može udvostručiti učinkovitost asimilacije organskog ugljika u usporedbi s heterotrofima te reducirati potrebe za organskim izvorima ugljika (Yurkov & Csotonyi, 2009). Također, energija dobivena iz svjetla može se upotrijebiti za različite metaboličke procese, primjerice za asimilaciju dušika ili fosfora, osobito u okolišima koji su značajno ograničeni nekim od navedenih elemenata, kao što je Jadransko more (Vrdoljak Tomaš, 2020).

Osim po svom zanimljivom mikostrofnom metabolizmu koji se oslanja na različite metaboličke strategije prikupljanja energije, AAF su jedinstveni i po drugim značajkama. Naime, pokazuju značajno veće stope rasta i veći biovolumen stanica u usporedbi s prosječnim morskim heterotrofnim bakterijama, što ih čini posebno podložnima pašnji, odnosno „*grazingu*“ od strane predatora, primarno heterotrofnih nanoflagelata (Ferrera *i sur.*, 2011; Stegman *i sur.*, 2014). Dokazano je da je promjer AAF stanice veći 1,3 do 2,6 puta od prosječne heterotrofne bakterije, dok je u Jadranu veći 1,2 puta (Mašín *i sur.*, 2006, 2008; Stegman *i sur.*, 2014; Vrdoljak Tomaš, 2020). AAF stanice se i dijele značajno brže od prosječnih morskih bakterija. Naime, u oligotrofnim okolišima poput Atlantika imaju stopu diobe od jednom dnevno, dok im u eutrofnijim područjima stopa diobe može iznositi i do 3 puta dnevno (Koblížek *i sur.*, 2007). Utvrđeno je da heterotrofni nanoflagelati u svojoj prehrani preferiraju brzo-rastuće i velike stanice, upućujući na veću podložnost AAF bakterija „*top-down*“ kontroli, odnosno pašnji, u usporedbi s ostalim bakterijama (Pernthaler, 2005; Vrdoljak Tomaš, 2020).

Ekologija AAF-a je složena, još poprilično nerazjašnjena, no poznato je da na nju utječu brojni čimbenici, uključujući dostupnost hranjivih tvari, intenzitet svjetla, temperaturu i prisutnost drugih mikroorganizama (Koblížek, 2015). S obzirom da se radi o eurivalentnim mikroorganizmima koji zaokupljaju brojne ekološke niše, nije jednostavno jednoznačno odrediti ključne okolišne varijable koje ih kontroliraju kao ni njihov utjecaj. Na primjer, natjecanje s heterotrofnim bakterijama za otopljenu organsku tvar može ograničiti rast AAF-a, a dostupnost hranjivih tvari kao što su dušik i fosfor te prisutnost svjetla i predatora također mogu imati značajan utjecaj na stope rasta pojedinih skupina (Ferrera *i sur.*, 2017; Fecskeova *i sur.*, 2021). Iako se prethodno pretpostavljalo da zbog svog miksotrofnog metabolizma i mogućnosti korištenja svjetlosne energije imaju značajnu prednost nad isključivo autotrofnom odnosno heterotrofnom komponentom mikrobne zajednice te da će obitavati u većim brojnostima u oligotrofnim uvjetima okoliša, za zajednicu AAF se ova hipoteza više puta osporila (Schwalbach

& Fuhrman, 2005; Jiao *i sur.*, 2007; Lamy *i sur.*, 2011). Danas je uvriježeno mišljenje da AAF preferiraju produktivniji okoliš i obitavaju u većim brojnostima u eutrofnim područjima, poput morskih priobalnih područja. Većina istraživanja o brojnostima AAF bakterija u morskom okolišu te u slanim i slatkovodnim jezerima pokazala je pozitivnu korelaciju između njihovih brojnosti i koncentracije klorofila, no nije jasno odražava li navedeno direktnu povezanost AAF bakterija i primarnih proizvođača ili njihovu zajedničku ovisnost o limitirajućim nutrijentima poput fosfora ili dušika (Jiao *i sur.*, 2007; Edgar *i sur.*, 2011; Hojerová *i sur.*, 2011; Medová *i sur.*, 2011; Koblížek, 2015). Okolišni čimbenik za koji se također pretpostavlja da značajno utječe na brojnost AAF je temperatura, gdje je uočen njen pozitivan utjecaj u sezonskim istraživanjima u priobalnim područjima i slatkovodnim jezerima (Mašin *i sur.*, 2006, 2008; Jiao *i sur.*, 2007; Ferrera *i sur.*, 2014). Međutim, rezultati se preklapaju s ostalim čimbenicima okoliša te nije jasno potiče li viša temperatura direktno ili indirektno rast populacije navedene zajednice. Salinitet se također pokazao kao ključan okolišni čimbenik koji utječe na specifične prilagodbe određenih AAF podskupina, izdvajajući se kao parametar značajniji od trofičkog statusa ekosustava (koncentracije nutrijenata i klorofila) (Lehours *i sur.*, 2018). Utjecaj svjetla na AAF zajednicu nije jednoznačno određen, prilikom čega su brojni laboratorijski eksperimenti u kontroliranim uvjetima pokazali pozitivan utjecaj svjetla na ovu zajednicu, no mjerenja s terenskih istraživanja raznih staništa, poput slatkovodnih jezera, nisu uvjerljivo potvrdila laboratorijske rezultate (Koblížek, 2015). S obzirom da se AAF nalaze u eufotičkim zonama morskih ekosustava, Koblížek je predložio da je utjecaj svjetla na prirodne zajednice (kao zasebno proučavane varijable) vjerojatno premalen kako bi se dokazao tijekom kratkih terenskih eksperimenata u prirodnim uvjetima. Stoga, nužno je provoditi dugoročna terenska istraživanja, poput primjerice dugoročnog istraživanja u Mediteranskom priobalnom području i laguni gdje je utvrđena jasna pozitivna korelacija između AAF abundancije i duljine dana (Lamy *i sur.*, 2011; Ferrera *i sur.*, 2014). Prema Ferrera *i sur.* (2017) te eksperimentima provođenima u sjeverozapadnom Mediteranu, prirodne zajednice AAF su pokazale značajno veće stope rasta kada su bile izloženi ciklusima svjetlo-tama nego samo rastu u tami, te je dokazana snažna „*top-down*“ kontrola predatorima i dostupnošću fosfora (Ferrera *i sur.*, 2017). Također je utvrđeno da se brojnost i raspodjela AAF bakterija značajno mijenjaju na prostorno-vremenskoj skali, s jasno izraženom sezonalnošću uočenom u većini istraživanja, kako na globalnoj razini (Jiao *i sur.*, 2007; Ferrera *i sur.*, 2014; Lehours *i sur.*, 2018; Auladell *i sur.*, 2019), tako i u Jadranskom moru (Šantić *i sur.*, 2017; Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2019, 2023b). Desetogodišnje istraživanje u „*Blanes Bay Microbial*“ obzervatoriju u sjeverozapadnom Mediteranu temeljeno na metabarkodiranju *pufM* gena i metagenomici, dokazalo je izraženu

statistički značajnu sezonalnost AAF zajednice (Auladell *i sur.*, 2019). Sezonalnost je uočena u različitim indeksima raznolikosti i relativnim brojnostima specifičnih filogrupa s ponavljajućim maksimumima u određenom mjesecu odnosno godišnjem dobu. Najveći Shannonovi indeksi raznolikosti zabilježeni su u zimu, a najmanji tijekom ljeta, uz jasno pokazanu obrnutu vezu između AAF abundancije i njihove raznolikosti. Navedeno istraživanje također je dokazalo da određene najzastupljenije taksonomske inačice pripadnika filogrupa K i E pokazuju ponavljajuća povećanja relativne brojnosti u specifičnom mjesecu, ponekad i do 92% zajednice (Auladell *i sur.*, 2019).

Na temelju rezultata metagenomike i metabarkodiranja *pufM* gena, morski AAF su polifiletski mikroorganizmi uglavnom taksonomski razvrstani kao proteobakterijski razredi Alpha- i Gammaproteobacteria (Auladell *i sur.*, 2019; Gazulla *i sur.*, 2023), a sastav AAF zajednice karakterističan je za određeno biogeografsko područje (Yutin *i sur.*, 2005; Lehours *i sur.*, 2018). Pretpostavlja se da je sposobnost anoksigene fotosinteze stečena horizontalnim prijenosom gena, što je zaključeno proučavanjem *puf* operona reda Rhodobacterales, primarno *pufL* i *pufM* gena, ali i *pufX* i *pufC* gena, koji pokazuju drugačije filogenetske obrasce u odnosu na najčešći bakterijski gen biljeg 16S rRNA (Koblížek *i sur.*, 2015). Gen *pufM* je najčešće korišteni gen biljeg za AAF funkcionalnu zajednicu pošto je zajednički svim njenim pripadnicima. Zbog nedovoljno popunjenih taksonomskih baza podataka i nepoznavanja sastava zajednice AAF na finijim taksonomskim razinama, donedavno se koristila njihova klasifikacija u 12 filogrupa na temelju strukture *puf* operona i filogenije *pufM* gena (filogrupa A- filogrupa L) (Yutin *i sur.*, 2007; Auladell *i sur.*, 2019). Povećanjem broja uspješno izoliranih AAF vrsta i sastavljenih metagenoma iz raznih ekosustava, upotpunjuju se i taksonomske baze nužne za određivanje strukture AAF zajednice na finijim taksonomskim razinama (Gazulla *i sur.*, 2023; Villena-Alemany *i sur.*, 2023a i b). Struktura zajednice AAF značajno varira na prostornoj skali globalnih morskih ekosustava, jedinstvena je za određeno područje te su razlike veće što su dva područja geografski udaljenija. U sjeverozapadnom Mediteranu, kao nama geografski najbližem području, Auladell *i sur.* (2019.) otkrili su da su pripadnici filogrupe K (članovi razreda Gammaproteobacteria) najzastupljeniji članovi AAF zajednice, sveprisutni u svim sezonama u relativnim brojnostima >50%, dok filogrupe E i G (članovi razreda Alphaproteobacteria) pokazuju povećane relativne udjele u proljeće. Manje zastupljene filogrupe D, F, I, J i K zabilježene su u relativnim brojnostima uglavnom <1%. Podatci na finijim taksonomskim razinama od razine filogrupa nisu dokumentirani zbog tadašnje već spomenute nepotpunosti taksonomskih baza za zajednicu AAF (Auladell *i sur.*, 2019).

Zbog svoje metaboličke prilagodljivost i evolucijske prednosti zahvaljujući sposobnosti fotoheterotrofije, brzih stopa rasta i eurivalentnosti, AAF imaju važnu ulogu u morskoj hranidbenoj mreži i biogeokemijskim ciklusima, prvenstveno kruženju ugljika. AAF se prema ulozi u kruženju DOM svrstavaju u sekundarne proizvođače. Ipak, jedinstvena mogućnost nadopune energetske zahtjeva sintezom ATP-a direktnom apsorpcijom svjetla omogućava im učinkovitije korištenje dostupnih tvari (Koblížek, 2015). Uz već spomenutu veću učestalost diobe stanica od drugih heterotrofnih bakterija, AAF su visoko aktivni članovi mikrobne zajednice. Navedeno je dokazano eksperimentima ugradnje 3H-leucina, prilikom čega su AAF stanice ugrađivale radioaktivni leucin dvostruko brže od prosječnih bakterija (Stegman *i sur.*, 2014) te analizom metatranskriptoma ukupne mikrobne zajednice Tihog oceana gdje su dokazane visoke ekspresije *puf* i *bch* gena, unatoč maloj brojnosti AAF bakterija u ovom oligotrofnom okolišu (Frias-Lopez *i sur.*, 2008).

U svom preglednom članku iz 2015. godine, Koblížek je postavio pitanje i ponudio objašnjenja zašto je brojnost AAF bakterija općenito toliko mala uzevši u obzir njihovu veliku metaboličku aktivnost, brze stope rasta i gotovo dvostruko veće stanice od prosječnih bakterija, prednosti fotoheterotrofije u odnosu na druge metaboličke strategije te važnost AAF u ciklusu ugljika. Činjenica jest da su fotoheterotrofni mikroorganizmi ipak brojčano dominantni u eufotičkim zonama oceana, poput primjerice bakterija koje sadrže proteorodopsin i pripadnika roda *Prochlorococcus* koji također posjeduju sposobnost fotoheterotrofije. Međutim, AAF su samo specifična podskupina fotoheterotrofa, a njihova prednost vidljiva je u okolišima limitiranim ugljikom. Pošto svjetlosna energija pomaže AAF da učinkovitije iskorištavaju dostupne organske supstrate, AAF bakterije nemaju prednost u odnosu na ostale kemoheterotrofne vrste ukoliko se radi o ograničenoj dostupnosti dušika, fosfora, željeza i drugih nutrijenata. Njihova značajno veća veličina stanica (nepovoljniji odnos površine i volumena stanica) ograničava difuziju slabo dostupnih nutrijenata, dok veliki genomi i povećane stope dioba rezultiraju povećanim staničnim zahtjevima za višim koncentracijama prvenstveno fosfora kao osnovnog građevnog elementa fosfatne okosnice nukleinskih kiselina i fosfolipida staničnih membrana. Ovo je problem u okolišima ograničenim fosforom. Također, zbog svoje veličine posebno podliježu pašnji od strane protistnih predatora čime se odvija prijenos biomase na više trofičke razine. Uzevši u obzir sve navedeno, unatoč relativno maloj prosječnoj brojnosti od 1-7% ukupnih bakterija eufotičkih zona globalnog morskog ekosustava, doprinos AAF bakterija u ovom ekosustavu značajno je viši nego što bi se moglo zaključiti na prvi pogled (Koblížek, 2015).

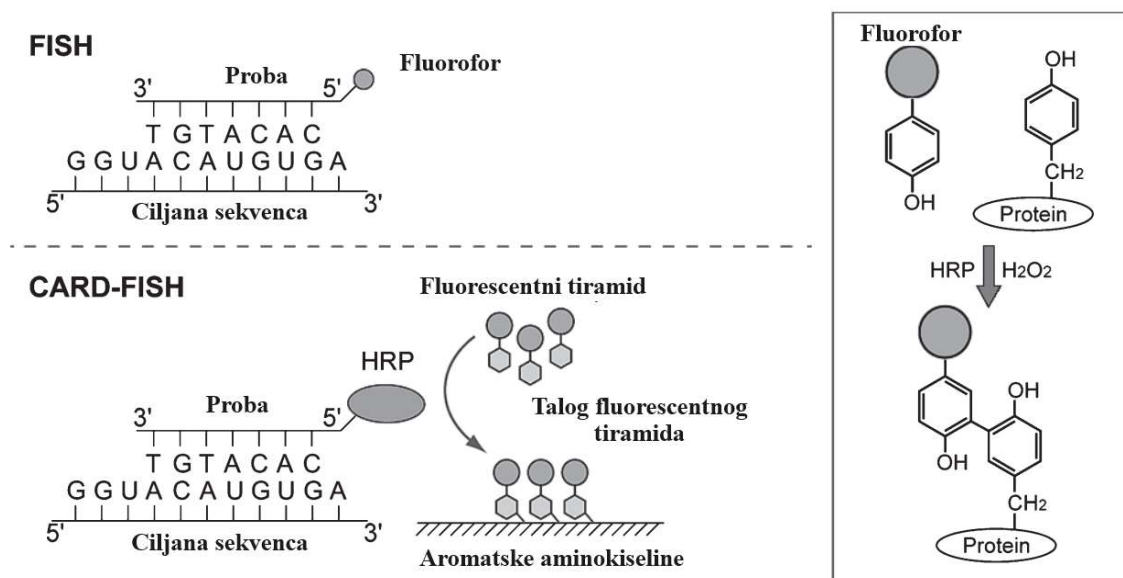
1.3. Fluorescencijska *in situ* hibridizacija (FISH, engl. *fluorescence in situ hybridization*) u istraživanju mikrobnih zajednica

Istraživanja mikrobnih zajednica nisu uvijek bila jednostavna zbog prethodno nezaobilazne potrebe za uzgojem pojedine vrste u čistoj kulturi kao temelja identifikacije i budućih istraživanja te vrste. Nakon prvotnih istraživanja temeljenih isključivo na uzgoju mikroorganizama u čistim kulturama, ubrzo je postalo jasno da većinu nije moguće uzgojiti na standardnim mikrobiološkim podlogama, a daljnja otkrića temeljena na epifluorescentnoj mikroskopiji rezultirala su spoznajom da 99% prokariota uopće nije kulturabilno (Amann *i sur.*, 1995; Fuhrman & Hagestorm, 2008; Su *i sur.*, 2012). Klasičnim mikrobiološkim pristupom nije bilo moguće opisati raznolikost niti funkcionalni potencijal cjelokupne zajednice te je bilo nužno pronaći alternativne načine identifikacije i proučavanja prokariota. Uočeno je da je kombinacija kvalitativnih i kvantitativnih metodologija nužna za sveobuhvatnu analizu sastava mikrobnih zajednica, a najčešće primjenjivane kvantitativne metode temeljene su na fluorescencijskoj *in situ* hibridizaciji (FISH, engl. *fluorescence in situ hybridization*).

Fluorescencijska *in situ* hibridizacija kataliziranim taloženjem reportera (CARD-FISH, engl. *catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization*) najčešće je korištena varijanta FISH metodologije u ekološkim istraživanjima (Pernthaler *i sur.*, 2002). Temelji se na hibridizaciji oligonukleotidnih proba za koje je kovalentno vezana peroksidaza korijena hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*). Oligonukleotidne probe su specifične za ciljanu bakterijsku skupinu. Ukratko, stanične stijenke mikroorganizama okolišnog uzorka se nakon fiksacije permeabiliziraju lizozimom kako bi se omogućio ulazak HRP-obilježene probe u stanice. DNA proba specifična za određenu skupinu potom se veže za komplementarni slijed 16S rRNA molekule na ribosomima. Nakon toga, HRP u prisutnosti vodikovog peroksida pretvara fluoresceinom obilježeni tiramid u radikalni oblik koji reagira s aromatičnim cikličkim prstenovima u aminokiselinama poput tirozina ili triptofana. Dolazi do vezivanja i koncentriranja fluorescentnog tiramida oko ciljanog nukleotidnog slijeda i HRP-a, što predstavlja amplificirani signal koji omogućuje detekciju bakterija (Pernthaler *i sur.*, 2002; Kubota, 2013). Navedeno je neophodno za vizualizaciju morskih mikroorganizama koji u oligotrofnim uvjetima sadrže malen broj ribosoma. Pojednostavljena shema CARD-FISH metode prikazana je na Slici 1.3.

Kvantitativne procjene brojnosti specifičnih bakterijskih skupina koje proizlaze iz CARD-FISH metode često se navode u brojnim ekološkim istraživanjima (Pernthaler *i sur.*, 2002; Ferrera *i sur.*, 2011; Kubota, 2013; Korlević, 2015; Magalhães *i sur.*, 2021). Nasuprot navedenom,

kvantitativne procjene AAF-a koje se pripisuju određenim razredima ili skupinama relativno su rijetke. Kombinacija dviju metoda temeljenih na epifluorescentnoj mikroskopiji, infracrvene epifluorescentne mikroskopije i fluorescencijske *in situ* hibridizacije, (IC-FISH; engl. *fluorescence in situ hybridization-infrared epifluorescence based microscopy, FISH-IR*) prethodno je korištena za filogenetsku anotaciju AAF bakterija (Mašin *i sur.*, 2006; Kasalický *i sur.*, 2018). Infracrveni dio elektromagnetskog spektra valnih duljina od 780 nm do 1 mm nužan je za detekciju pigmenta BChl *a* specifičnog za zajednicu AAF. Za razliku od klasičnog protokola CARD-FISH metode, IC-FISH metoda se temelji na dvostruko fluorescentno obilježenim oligonukleotidnim DNA probama koje ciljaju komplementarni slijed 16S rRNA molekule. Fluorofori se koriste za obilježavanje 5' i 3' kraja probi te izostaje korak amplifikacije fluorescentnog signala karakterističnog za CARD-FISH. Zbog nestabilnosti pigmenta Bchl *a*, protokol IC-FISH metode ne koristi završna ispiranja uzoraka etanolom (Kasalický *i sur.*, 2018).

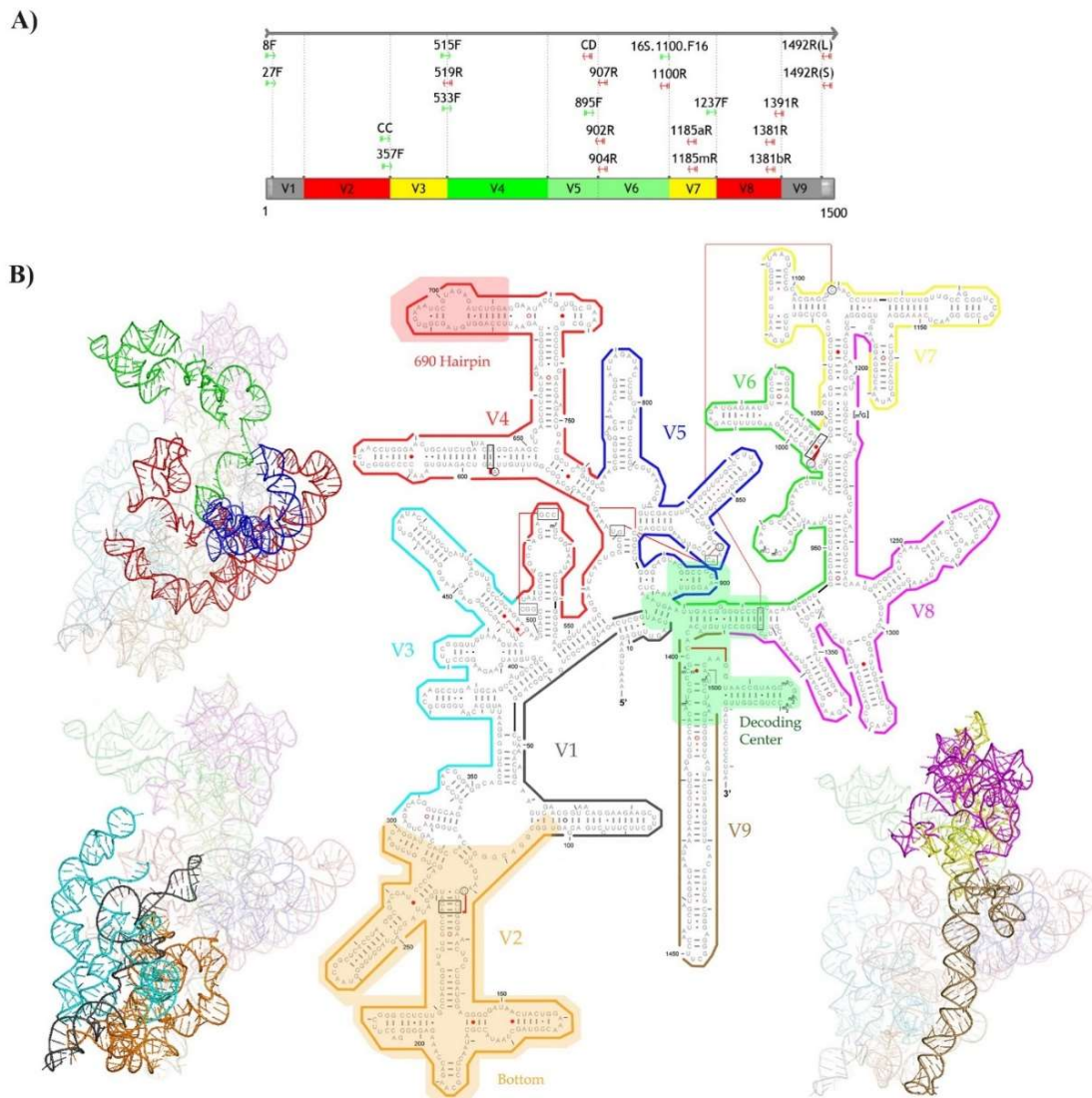


Slika 1.3. Pojednostavljeni prikaz FISH (engl. *fluorescence in situ hybridization*) i CARD-FISH (engl. *catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization*) metoda. Preuzeto i prilagođeno iz Kubota (2013.)

1.4. Metabarkodiranje gena biljega kao temeljni pristup u identifikaciji i istraživanju raznolikosti mikrobnih zajednica

Zahvaljujući brzom razvoju molekularne biologije i posljedično metoda sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, engl. *next generation sequencing*), danas su značajno unaprijeđene mogućnosti istraživanja sastava i ekologije složenih mikrobnih zajednica iz različitih okoliša, neovisno o njihovom uzgoju u staničnoj kulturi. Zaobilaženje uzgoja u kulturi prvi je put omogućeno klasifikacijom mikroorganizama na temelju filogenetske sličnosti ribosomalne RNA (rRNA), građevne makromolekule ribosoma značajno konzervirane u prokariotskim domenama života. Još 1986. godine Pace *i sur.* su izolacijom DNA iz okolišnih uzoraka kloniranjem gena od interesa i Sanger sekvenciranjem identificirali dotada neuzgojive mikroorganizme. Uspoređujući svojstva i primarne sljedove 5S i 16S rRNA gena u svrhu taksonomske identifikacije, predložili su upravo gen koji kodira za 16S rRNA male ribosomalne podjedinice kao gen biljeg koji bi se mogao koristiti za uspješnu taksonomsku identifikaciju na molekularnoj razini zbog svoje univerzalne prisutnosti u prokariotima, značajne konzerviranosti između prokariotskih domena te male, ali dovoljne duljine od ~1500 parova baza (Dubnau *i sur.*, 1965; Pace *i sur.*, 1986). Do danas je gen za 16S rRNA ostao najkorišteniji gen biljeg u istraživanju mikrobnih zajednica raznih ekosustava, tzv. „zlatni standard“ određivanja strukture i raznolikosti zajednica bakterija i arheja (Pace, 1997; Santos *i sur.*, 2020). Postojanje devet hipervarijabilnih regija unutar navedene makromolekule kao rezultat brojnih evolucijskih promjena omogućava razlikovanje prokariota, dok postojanje visokokonzerviranih regija omogućava kreiranje univerzalnih početnica oko različitih hipervarijabilnih regija, što 16S rRNA čini vrlo dobrim biljegom za taksonomsku identifikaciju (Yang *i sur.*, 2016). Odabirom specifičnih setova početnica moguće je lančanom reakcijom polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) umnožiti ciljano hipervarijabilnu regiju (ili regije) od interesa ovog gena (Slika 1.4A i 1.4B). Ipak, taksonomska identifikacija bakterija putem 16S rRNA gena ima i svojih ograničenja, poput male taksonomske razlučivosti na razini vrste, probleme u PCR umnažanju te pristranost u taksonomskoj anotaciji ovisno o odabranoj hipervarijabilnoj regiji (Vetrovsky & Baldrian, 2013; Poretsky *i sur.*, 2014; Brooks *i sur.*, 2015). U istraživanjima mikrobnih zajednica kojima je glavni cilj taksonomska identifikacija i analiza strukture zajednice prokariota trenutno postoje dva temeljna pristupa: ciljano sekvenciranje PCR amplikona gena biljega čitave zajednice, poput već spomenutog 16S rRNA gena, što se naziva metabarkodiranjem, ili direktno sekvenciranje kompletnih genoma svih organizama zajednice bez prethodne PCR amplifikacije, što se naziva metagenomikom. Prednost

drugog pristupa je upravo u zaobilazanju PCR amplifikacije koja nedvojbeno unosi pristranosti prema određenim taksonima i stvarnijoj predodžbi raznolikosti zajednice te činjenici da sekvenciranje čitavih genoma omogućava i potencijalne funkcionalne analize na genetičkoj razini (Durazzi *i sur.*, 2021). Međutim, zbog visokih troškova i složenijih bioinformatičkih zahtjeva u usporedbi s metabarkodiranjem, metagenomika još uvijek u potpunosti ne zamjenjuje metabarkodiranje, osobito ako je taksonomska klasifikacija glavna svrha opsežnih ekoloških istraživanja.



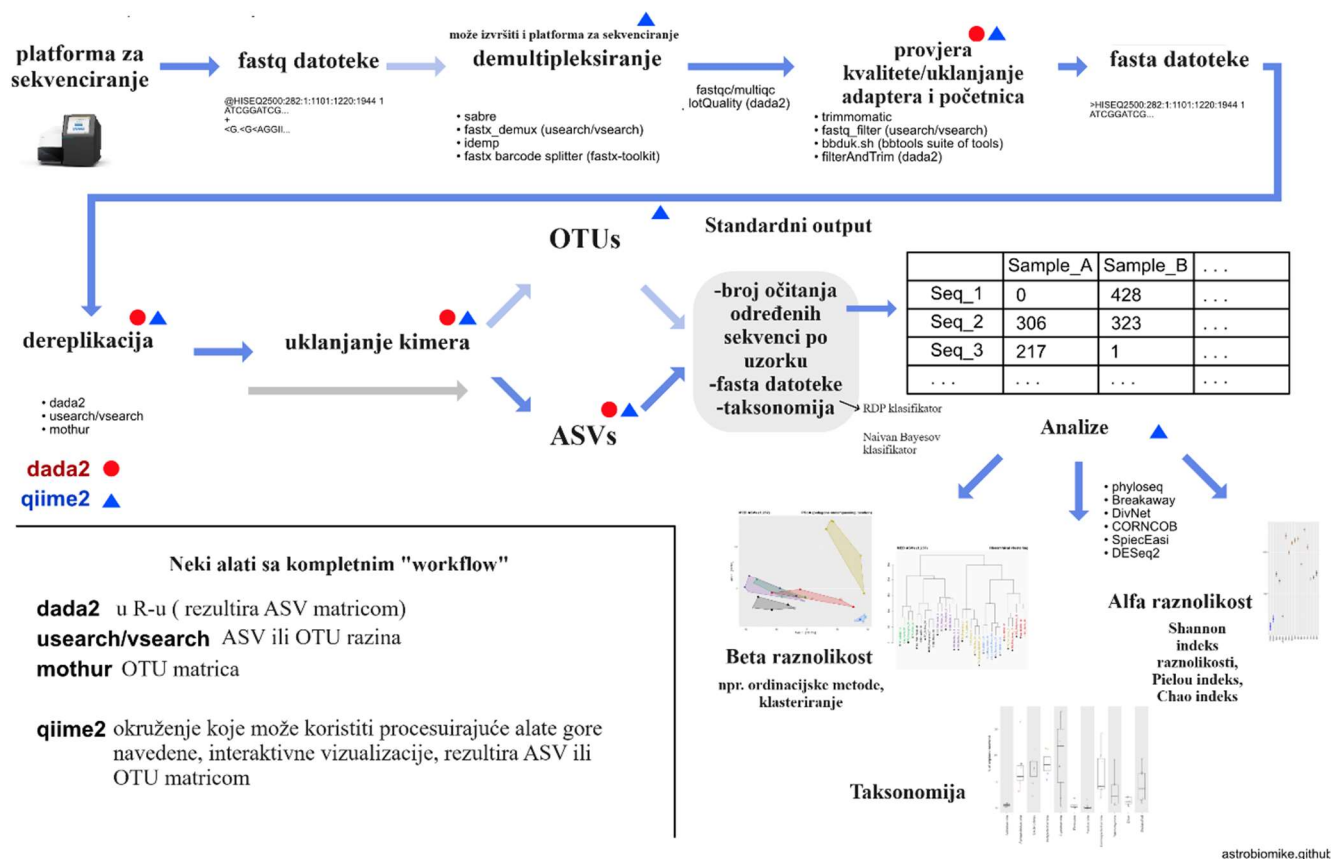
Slika 1.4. A) Prikaz različitih hipervarijabilnih regija (V1-V9) 16S rRNA gena i odgovarajućih prednjih (eng. *forward*) i stražnjih (eng. *reverse*) početnica često korištenih za umnažanje ciljane regije. Crveno označene regije V2 i V8 imaju lošu taksonomsku rezoluciju na razini koljena, dok su regije V4, V5 i V6 preporučene za filogenetske analize. B) Prikaz 2D i 3D struktura 16S rRNA. Specifičnim bojama označene su određene hipervarijabilne regije V1-V9. Preuzeto i prilagođeno prema Yang *i sur.* (2016).

Metabarkodiranje se zasniva na umnažanju ciljanog DNA fragmenta (odnosno određenog gena) čitave zajednice PCR reakcijom te istovremenom sekvenciranju svih prisutnih amplikona. U prošlosti se prvenstveno upotrebljavalo Sanger sekvenciranje, nazvano i metodom sekvenciranja prve generacije, koje je unijelo revoluciju u istraživanjima mikrobnih zajednica otkrivajući dotada nezabilježenu mikrobnu raznolikost (Sanger *i sur.*, 1977). Nedostatak ovog pristupa bila je analiza individualnih sekvenci za koje je nužan preduvjet bio laboratorijski zahtjevan postupak kloniranja. Ukratko, nakon PCR umnažanja 16S rRNA gena čitave zajednice, amplikoni bi se ugrađivali u plazmidne vektore kojima bi se transformirali kompetentni bakterijski domaćini kako bi se postigla ekspanzijska amplifikacija pojedinačnih fragmenata podrijetlom iz samo jedne bakterije. Nasumično bi se odabrao veliki broj klonova, izolirali i pročistili plazmidi te bi se izvršilo sekvenciranje inserata metodom po Sangeru, odnosno terminacijom lanca dideoksinukleotidima. Visoka točnost od 99,99% te mogućnost sekvenciranja dugih amplikona duljine do oko 1000 baznih parova velike su prednosti navedene metode. Međutim, konačni broj sekvenci bio je značajno ograničen dobivenom količinom podataka (engl. *output*) u rasponu od 1,9 do 84 Kb generiranih na Sanger platformi, predstavljajući značajan nedostatak ove metode uz već spomenuti mukotrpan proces kloniranja, dugotrajnost procesa i visoku cijenu (Santos *i sur.*, 2020). Knjižnice klonova danas su većinom zamijenjene sekvenciranjem druge odnosno sljedeće generacije, od kojih je uvjerljivo najveću primjenu pronašla platforma Illumina (Hodžić *i sur.*, 2017). Zbog mogućnosti iznimne brzine sekvenciranja, kapaciteta istovremene obrade velikog broja uzoraka i značajno veće količine generiranih podataka do 750 Gb uz relativno niske cijene (za tu količinu podataka), sekvenciranje sljedeće generacije omogućilo je istraživanja bioloških sustava na potpuno novoj razini (Bentley *i sur.*, 2008). Temeljna razlika između klasičnog Sangerovog sekvenciranja i NGS-a jest da umjesto samo jednog DNA fragmenta, Illumina provodi ovaj proces paralelnim sekvenciranjem milijuna fragmenata istovremeno, ali uz reduciranu veličinu sekvenciranog fragmenta od maksimalno 300 parova baza (Santos *i sur.*, 2020). Svaki Illumina tijek rada (engl. *workflow*) sastoji se od četiri glavna koraka, a to su priprema knjižnice, stvaranje klonalnog klastera, sekvenciranje amplikona i analiza podataka. Priprema knjižnice podrazumijeva dodavanje/ligaciju Illumina adaptera odnosno egzogenog oligonukleotidnog slijeda na 5' i 3' krajeve amplikona, koji je nužan za proces sekvenciranja i hibridizaciju krajeva fragmenta s površinom za sekvenciranje. Adapteri se često dodaju prije koraka PCR amplifikacije prilikom kemijske sinteze oligonukleotidnih početnica. Fragmenti s dodanim adapterima se nakon PCR umnažanja pročišćavaju prije procesa sekvenciranja. Klasteriranje je proces izotermalnog umnažanja svakog DNA fragmenta na protočnim ćelijama (engl. *flow cell*). Pripremljena knjižnica

nanosi se na protočne ćelije gdje se fragmenti preko adaptera hibridiziraju s njenom čvrstom površinom preko fiksiranih komplementarnih slijedova, nakon čega slijedi umnažanje DNA polimerazom metodom mosta i stvaranje klonalnog klastera (engl. *bridge amplification; clone cluster*). Korak stvaranja klonalnog klastera, koji su sastavljeni od velikog broja kopija određenog fragmenta, nužan je za dobivanje dovoljnog intenziteta signala za detekciju od strane uređaja. Sekvenciranje koristi reverzibilnu metodu temeljenu na terminatoru (engl. *reversible terminator-based method*) koja se temelji na prvotnom vezanju univerzalne početnice i ugradnji modificiranog fluorescentno-obilježenog deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP). Svaki od četiri različita dNTP-a obilježeni su specifičnom fluorescentnom bojom, a fluorofor ujedno djeluje i kao 3'-kapa koja zaustavlja daljnju DNA sintezu. Nakon ugradnje jednog dNTP-a po molekuli, sinteza je zaustavljena, nevezani nukleotidi se ispiru, a signal svakog klastera se očitava (Bentley *i sur.*, 2008). Emisijska valna duljina fluorescentnog signala, kao i intenzitet svakog klastera, koriste se za identifikaciju baze, a broj ciklusa određuje duljinu sekvenciranog fragmenta (engl. *read*). Proces se ponavlja dok se ne sekvencira kompletni DNA fragment. Na ovaj se način paralelno obrađuju stotine milijuna klastera. Phred ocjena kvalitete (Q, engl. *Phred quality score*) najčešća je mjera za procjenu kvalitete i točnosti sekvenciranja, a koristi se za kvantifikaciju preciznosti imenovanja određene baze. Q-rezultat predstavlja vjerojatnost da je određena baza pogrešno imenovana od strane sekvencera. Opće je prihvaćeno da je Q30 (što predstavlja jednu krivo detektiranu bazu na njih tisuću, točnost 99,9%) zadovoljavajući rezultat. Veliki iskorak u NGS tehnologiji jest sekvenciranje uparenih krajeva (engl. *paired-end sequencing*), danas najkorištenija Illumina strategija prilikom koje se sekvenciraju DNA fragmenti i od smjera 5' i 3' kraja, generirajući pritom „forward“ i „reverse“ slijedove nukleotida. Ova strategija omogućava preklapanje uparenih krajeva i samim tim sekvenciranje amplikona duljih od 300 baznih parova, uz mogućnost detekcije insercija i delecija baza (engl. *indel*). Zbog ograničavajuće maksimalne duljine sekvenciranog slijeda nukleotida do 300 baznih parova u jednom smjeru, Illumina se u mikrobiološkim istraživanjima najčešće koristi za sekvenciranje specifične hipervarijabilne regije ili pak dvije regije (poput V3/V4 ili V4/V5 regija) 16S rRNA gena ili dijelova drugih gena biljega koje je moguće sekvencirati.

Bioinformatička obrada podataka završni je korak u procesu sekvenciranja. Tijek tipične obrade podataka amplikon sekvenciranja sažeto je prikazan na Slici 1.5. Ukratko, sekvence s platforme za sekvenciranje dolaze u fastq formatu. Prvo je potrebno izvršiti demultipleksiranje što podrazumijeva sortiranje sekvenci u zasebne datoteke za svaki uzorak prema jedinstvenim indeksima (adapterima). Naime, različite knjižnice se ujedinjuju u jedan veliki uzorak prije samog

procesa sekvenciranja i nanose na istu liniju protočne ćelije, a jedinstvene sekvence indeksa dodane svakom DNA fragmentu tijekom procesa pripreme knjižnice omogućavaju razlikovanje različitih uzoraka i njihovo simultano sekvenciranje. Nakon demultipleksiranja, slijedi kontrola kvalitete sekvenci te uklanjanje adaptera i početnica. Uglavnom se uklanjaju sekvence čiji je prosječni Q-rezultat manji od 30. Dereplikacija podrazumijeva ujedinjavanje svih identičnih sekvenci u jedinstvenu sekvencu s odgovarajućom „brojnošću“ odnosno zabilježenim brojem očitavanja što značajno smanjuje vrijeme analize izbjegavajući redundantne usporedbe. Nakon spajanja sekvenci dobivenih sekvenciranjem suprotnih krajeva fragmenata nastalih uparenim sekvenciranjem, potrebno je ukloniti i kimerne sekvence, artefakte nastale PCR umnažanjem. Krajnja matrica sekvenci, koja može biti sastavljena ili od varijanti sekvenci amplikona (ASV, engl. *amplicon sequence variant*) ili operacijskih taksonomskih jedinica (OTU, engl. *operational taxonomic unit*), koristi se za taksonomsku identifikaciju uz različite metode klasifikacije, poput primjerice naivnog Bayesovog klasifikatora (Wang *i sur.*, 2007). Za razliku od klasičnog pristupa stvaranja operacijskih taksonomskih jedinica (OTU) klasteriranjem sekvenci prema zadanom pragu sličnosti (najčešće 97%), danas su popularniji i korišteniji „denoising“ algoritmi zbog finije taksonomske razlučivosti i preciznosti, neovisnosti o skupu podataka iz kojeg su proizašli i reproducibilnosti (Callahan *i sur.*, 2017). Popularan *dada2* algoritam, originalno osmišljen za podatke generirane Illumina Miseq uređajem, koristi parametrijski model pogreške specifičan za svaki skup podataka odnosno „run“ sekvenciranja, razlikujući pogreške nastale prilikom samog sekvenciranja od prave biološke raznolikosti sekvence do razine jednog nukleotida (Callahan *i sur.*, 2016). Rezultat je matrica varijanti sekvenci amplikona (ASV). Dobra popunjenost referentnih taksonomskih baza podataka osnovni je preduvjet uspješne taksonomske identifikacije, kao i taksonomske razlučivosti, međutim potonja ovisi i o značajkama gena biljega korištenog u analizi. Najčešće korištene baze podataka za 16S rRNA gen su Silva, RDP i GreenGeens. Navedeni tijekom rada rezultira dakle matricom sekvenci s brojem pojavljivanja svake sekvence u uzorcima (relativna brojnost), tablicom taksonomskih klasifikacija i fasta datotekama sa svim sekvencama. U mikrobnjologiji, naknadno se provode standardne analize temeljene na alfa raznolikosti unutar samog uzorka, poput primjerice Shannonovog indeksa raznolikosti te beta raznolikosti između uzoraka različitim ordinacijskim metodama.



Slika 1.5. Standardni tijek bioinformatičke obrade podataka (engl. *workflow*) dobivenih sekvenciranjem amplikona. Preuzeto i prilagođeno prema Lee (2019).

U metabarkodiranju bakterijskih zajednica, osim glavnog gena biljega 16S rRNA, mogu se koristiti i drugi geni povezani sa specifičnim značajkama različitih funkcionalnih skupina kako bi se analiza fokusirala isključivo na njih te postigla bolja taksonomska razlučivost. U analizi sastava zajednice AAF bakterija trenutno se koristi metabarkodiranje *pufM* gena. Gen *pufM* kodira M lanac helikalne strukture transmembranskog kompleksa fotosintetskog reakcijskog centra anoksigenih fototrofa te je do danas najkorišteniji gen biljeg AAF zajednice (Achenbach *i sur.*, 2001). Ovom metodom uspješno su detektirane neke AAF skupine zastupljene u vrlo maloj brojnosti zahvaljujući koraku umnažanja amplikona PCR-om (Auladell *i sur.*, 2019). Nedavno istraživanje također je usporedilo i evaluiralo nekoliko različitih parova postojećih i novih početnica za amplifikaciju *pufM* gena te su preporučeni *pufMF_Y/pufM_WAW* ili *UniF/UniR* parovi početnica za metabarkodiranje morskih AAF zbog najmanje pristrane reprezentacije njihova taksonomskog sastava (Gazulla *i sur.*, 2023).

1.5. Metode izolacije DNA u istraživanjima temeljenim na metabarkodiranju

Prvi korak u istraživanjima temeljenima na metabarkodiranju određenog gena biljega temelji se na izolaciji ukupne genomske DNA iz ciljanog organizma/okoliša/tkiva. Trenutno ne postoji jasan dogovor i standardizacija u brojnim protokolima molekularne biologije te analizi podataka dobivenih metabarkodiranjem bakterijskih zajednica, što znatno otežava usporedbu rezultata između različitih istraživanja (Knight *i sur.*, 2018; Pollock *i sur.*, 2018). Postupci samog sakupljanja uzoraka i početne manipulacije uzorcima neizbježno utječu na rezultate: od načina i mjesta prikupljanja, temperature zamrzavanja/skladištenja i korištenja krioprotektanata, preko metoda izolacije DNA, uvjeta PCR umnažanja gena biljega, strategije i platforme sekvenciranja te konačno obrade podataka (Pollock *i sur.*, 2018).

Izdvojene kao posebno problematičan osnovni čimbenik u metabarkodiranju, metode izolacije DNA neizbježno uvode određene pristranosti prema specifičnim vrstama i nedosljednosti koje smanjuju preciznost procjene relativne zastupljenosti određenog taksona (Pollock *i sur.*, 2018). Iako su mnoga istraživanja usporedila različite metode izolacije DNA u svrhu određivanja sastava bakterijske zajednice različitih ekosustava (Henderson *i sur.*, 2013; Wesolowska-Andersen *i sur.*, 2014; Deiner *i sur.*, 2015; Walden *i sur.*, 2017; Hermans *i sur.*, 2018; Liu *i sur.*, 2019; Mateus-Barros *i sur.*, 2019; Ma *i sur.*, 2020), manje ih je napravljeno na uzorcima iz morskog okoliša (Djurhuus *i sur.*, 2017) istovremeno s analizom umjetnih bakterijskih zajednica poznatog, često pojednostavljenog sastava, odnosno takozvanih „mock” zajednica (Muñoz-Colmenero *i sur.*, 2021). Sekvenciranje takvih zajednica sa zadanim i provjerenim sastavom zajedno s okolišnim uzorcima ključno je za procjenu stopa pogreške analitičkih postupaka (Caporaso *i sur.*, 2010b; Pollock *i sur.*, 2018; Yeh *i sur.*, 2018). Najčešće korištene metode izolacije DNA uključuju različite komercijalne kitove koji obično daju visokokvalitetne rezultate, ali malen prinos DNA, i/ili standardne postupke ekstrakcije na bazi fenola i kloroforma koji koriste toksična organska otapala, ali rezultiraju visokokvalitetnom DNA visokog prinosa (Renshaw *i sur.*, 2015; Muñoz-Colmenero *i sur.*, 2021). Iskustva iz različitih područja pokazuju da se ti postupci mogu modificirati kako bi se izbjegla upotreba opasnih kemikalija bez gubitka kvalitete rezultata, kao što su primjerice metode isoljavanja (engl. *salting-out*) (Aljanabi & Martinez, 1997). Moguće je i potpuno preskočiti korak izolacije DNA i napraviti izravno PCR umnažanje ciljanog gena na uzorku iz okoliša. Primjena ove jednostavne i vremenski učinkovite metode relativno je zanemarena u ekološkoj mikrobiologiji, a mogla bi biti posebno korisna pri rukovanju velikim brojem uzoraka, što je često slučaj s opsežnim istraživanjima temeljenim na metabarkodiranju (Ben-Amar *i sur.*, 2017; Vinayaka *i sur.*, 2019; Tao *i sur.*, 2022).

1.6. Kratki pregled dosadašnjih istraživanja mikrobne i AAF zajednice Jadranskog mora

Dosadašnja istraživanja u Jadranskom moru temeljena su na brojnostima i biomasi članova mikrobne zajednice te su značajno proširila spoznaje o ekologiji pikoplanktona navedenog ekosustava, kako u sjevernom, srednjem i južnom, tako i u otvorenom i priobalnom području (Fuks *i sur.*, 2004, 2005; Radić *i sur.*, 2003, 2005; Šantić *i sur.*, 2013, 2021; Šolić *i sur.*, 2017, 2018, 2020). Fototrofi, obuhvaćajući cijanobakterije *Prochlorococcus* i *Synechococcus* te pikoeukariote; i heterotrofi, prvenstveno heterotrofne bakterije i heterotrofni nanoflagelati pikoplanktonske frakcije, opsežno su se proučavali protočnom citometrijom, epifluorescentnom mikroskopijom i metodom procjene bakterijske proizvodnje (Šantić *i sur.*, 2013, 2021; Šolić *i sur.*, 2022). Nedavno objavljeno istraživanje na velikom skupu od 3000 podataka biotičkih i abiotičkih varijabli sakupljenih tijekom desetljeća na prostorno-vremenskoj skali pokazalo je postojanje četiri različita tipa mikrobnih hranidbenih mreža u Jadranu (Šolić *i sur.*, 2022). Kroz praćenje brojnosti, biomase i aktivnosti članova mikrobne hranidbene mreže, dokazano je kako mozaik različitih uvjeta okoliša direktno utječe na pretvorbu jednog tipa hranidbene mreže u drugi na postojan i ponovljiv način. Primjerice, Tip 1 mikrobne hranidbene mreže prisutan je u okolišu opisanom smanjenim koncentracijama dušika i fosfora te je značajan za područje otvorenog mora i topli dio godine. U navedenom tipu hranidbene mreže najveće brojnosti imaju autotrofni mikroorganizmi, osobito cijanobakterije s velikim udjelom u primarnoj proizvodnji, koje su dominantno kontrolirane predatorima. Tip 2 i Tip 3, prijelazni oblici mikrobnih hranidbenih mreža, nisu sezonski određeni, a njihovi članovi jednako su kontrolirani dostupim nutrijentima i predatorima. Tip 3 mikrobne hranidbene mreže svojstveniji je za okoliš ograničen fosforom. Tip 4 opisuje okoliš niskog saliniteta osobit za hladniji dio godine i estuarijska područja. U njemu najveće brojnosti ima veliki fitoplankton, kao i heterotrofne bakterije i njihovi predatori, a brojnosti njenih članova su prvenstveno kontrolirane količinom dostupnih nutrijenata, a ne predatorima.

Govoreći o raznolikosti i sastavu mikrobne zajednice Jadrana na finijim taksonomskim razinama, postoji manji broj istraživanja, dok njen kvalitativni i kvantitativni sastav na prostorno-vremenskoj skali u srednjem Jadranu do sada nije istraživani. Sezonska raznolikost i kvantitativni sastav pikoplanktona srednjeg zapadnog Jadrana su prvi put opisani korištenjem fluorescencijske *in situ* hibridizacije kataliziranim taloženjem reportera (CARD-FISH) u kombinaciji s protočnom citometrijom (Manti *i sur.*, 2012). Brojnosti glavnih bakterijskih grupa utvrđene CARD-FISH metodom pokazale su sezonalno ponašanje ispitivanih grupa i općenito prevladavanje razreda Alphaproteobacteria u bakterijskoj zajednici, sa značajnim doprinosom pripadnika klada SAR11

(najvećih srednjih relativnih brojnosti $44 \pm 3\%$ u ožujku) i najvećih relativnih brojnosti pripadnika općih Alphaproteobacteria u prosincu označenih probom ALF968 (srednja vrijednost $33 \pm 5\%$). Pripadnici Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) grupe bili su drugi najbrojniji članovi mikrobne zajednice, uz manji relativni doprinos pripadnika razreda Gammaproteobacteria (Manti *i sur.*, 2012).

Raznolikost bakterioplanktona u površinskom obalnom području južnog Jadrana prvi put je istražena ARISA metodom (engl. *automated method of ribosomal intergenic spacer analysis*) u kombinaciji sa sekvenciranjem 16S amplikona (Quero & Luna, 2014). Sastav bakterijske zajednice određen u ovom istraživanju bio je poprilično neujednačen, s utvrđenim brojnim rijetkim vrstama te se značajno razlikovao između priobalnog područja i otvorenog mora, a temperatura i trofički status prijavljeni su kao glavni kontrolirajući okolišni čimbenici. Rezultati pirosekvenciranja otkrili su prevladavanje razreda Alphaproteobacteria, prvenstveno klada SAR11, nekulturalnih pripadnika Gammaproteobacteria iz obitelji Rhodobacteraceae te Cyanobacteria, prvenstveno roda *Synechococcus*. Pripadnici koljena Bacteroidetes pridonjeli su i do 25% relativnog udjela ukupne mikrobne zajednice u eutrofnim uvjetima. Prvo istraživanje koje je odredilo sezonsku dinamiku i detaljno ispitalo raznolikost bakterijske i arhealne zajednice u otvorenom moru južnog i sjevernog Jadrana te estuariju rijeke Krke primijenilo je 454 pirosekvenciranje 16S rRNA gena i CARD-FISH metodu (Korlević, 2015). Rezultati navedenog istraživanja pokazali su da je klad SAR11 bio najbrojniji predstavnik prokariotskog pikoplanktona sačinjavajući većinu zajednice južnog Jadrana, obalnog područja sjevernog Jadrana i dubokog sloja estuarija rijeke Krke. Rezultati sekvenciranja također su pokazali da su cijanobakterije obuhvaćale dva sveprisutna morska roda: *Synechococcus* i *Prochlorococcus* koji su u južnom Jadranu pokazali svojstvenu vertikalnu raspodjelu s brojnijim *Synechococcus*-om do dubine od 75 m, nakon čega biva zamijenjen *Prochlorococcus*-om. U sjevernom Jadranu s izraženom sezonalnošću prevladavao je *Synechococcus*. Najveće promjene strukture bakterijskih zajednica zbivale su se istovremeno s fitoplanktonskim cvatnjama uz najznačajnije pripadnike koljena Bacteroidetes (predstavnici morske skupine *NS4* i *NS5*, *NS2b*, *NS3a* te rodovi *Flavobacterium* i *Formosa* u estuariju Krke) te razreda Gammaproteobacteria (predstavnik klad SAR86). Razred Betaproteobacteria, karakterističan za slatkovodni okoliš, pronađen je u staništima pod utjecajem rijeke Krke i u zapadnom području sjevernog Jadrana pod snažnim utjecajem rijeke Po. Pripadnici koljena Actinobacteria bili su sveprisutni u istraživanom području s povećanim relativnim udjelom samo u staništima pod snažnim utjecajem sliva krških rijeka. Dubokomorska područja Jadranskog mora karakterizirale su tipične dubokooceanske skupine bakterija: klad SAR324,

SAR202 i SAR406, kao i veći udio arheja (Korlević *i sur.*, 2015). Istraživanje Šantić *i sur.* (2021) na području otvorenog mora južnog Jadrana i vertikalnom profilu do dubine od 1200 metara također je koristilo sekvenciranje sljedeće generacije (Illumina MiSeq) u metabarkodiranju 16S rRNA gena uz primjenu algoritma umjetne neuronske mreže nazvanim „*neural gas*“ (NG). Najveća bakterijska raznolikost zabilježena je u sloju dubokog klorofilnog maksimuma (dChlMax, engl. *deep chlorophyll maximum*). Većina identificiranih bakterijskih rodova pripadala je koljenu Proteobacteria, a glavni predstavnici razreda Alphaproteobacteria bili su AEGEAN-169 i SAR116 dok su OM60 (NOR5) i klad SAR86 bili najzastupljeniji pripadnici razreda Gammaproteobacteria. *Synechococcus* i vrste srodne slatkovodnoj cijanobakteriji *Cyanobium* prevladavale su u plićim slojevima mora, dok je *Prochlorococcus* soja MIT9313 dominirao na dubinama većim od 50 m. Bacteroidetes su bili predstavljeni nekulturable linijama *NS4*, *NS5* i *NS9*. Najdublji slojevi bili su karakterizirani najvećim relativnim udjelima pripadnika koljena *Nitrospinae*. Spomenuto istraživanje objasnilo je veći utjecaj dubine nego područja na sastav mikrobne zajednice u ispitivanom području koje je ograničeno dušikom i fosforom, uz pozitivnu korelaciju mikrobne zajednice s porastom temperature.

Prva istraživanja zajednice AAF u Jadranskom moru bila su usredotočena na njihovu brojnost procijenjenu iz koncentracija pigmenta BChl *a* mjenog duž latitudinalnog transekta (Celussi *i sur.*, 2015) te na njihove brojnosti i raspodjelu ljeti u obalnim i estuarijskim područjima duž istočne obale Jadrana korištenjem infracrvene epifluorescentne mikroskopije (Šantić *i sur.*, 2017). Prvo istraživanje koje je proveo Celussi *i sur.* (2015.) obuhvaćalo je područje cijelog otvorenog Jadranskog mora od sjevera do Otranta s naglaskom na utjecaj svjetla na asimilaciju organskog ugljika i dinamiku koncentracije BChl *a*. Ustanovljeno je da AAF sačinjavaju do 10% ukupne prokariotske zajednice Jadrana. Istraživanje Šantić *i sur.* (2017.) odredilo je brojnost i raspodjelu zajednice AAF ljeti u obalnim i prijelaznim vodama srednjeg i južnog Jadrana. Srednje apsolutne vrijednosti brojnosti iznosile su $66,9 \pm 66,8 \times 10^3$ stanica mL⁻¹, a njihov relativni udio u bakterioplanktonu prosječne vrijednosti $7,3 \pm 4,3\%$ bio je sličan u obalnim i prijelaznim vodama. Brojnost zajednice AAF povećavala se porastom trofičkog statusa područja, odnosno pokazala je pozitivnu korelaciju s koncentracijom Chl *a* i nitrita kao i s heterotrofnim bakterijama te s vrijednostima temperature mora.

Naknadno istraživanje temeljilo se na jednogodišnjem uzorkovanju duž trofičkog gradijenta gdje je opisana prostorna i vertikalna distribucija brojnosti AAF s maksimalnom brojnošću zabilježenom u kasnu zimu (mjesec travanj) na svim ispitivanim postajama (Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2019). Apsolutne AAF brojnosti varirale su od $0,26 \times 10^4$ na otvorenom moru do

$23,45 \times 10^4$ stanica mL^{-1} u estuariju s njihovim relativnim brojnostima od 0,13% do 23,88%. Izračunata je i biomasa AAF koja je iznosila u rasponu od 0,07 do 6,24 $\mu\text{gC L}^{-1}$ s najvišim vrijednostima zabilježenim ljeti u estuariju rijeke Krke te najnižim vrijednostima tijekom zime na otvorenom moru. Također je uočen pad njihove brojnosti i biomase prema oligotrofnijem području otvorenog mora, a ograničenje fosforom predložilo se kao potencijalno značajan kontrolirajući čimbenik njihove brojnosti.

U nedavno objavljenom preglednom članku objedinjeni su podatci prikupljeni tijekom sedam godina s 34 lokacije u Jadranskom moru kako bi se dobio detaljniji uvid u raspodjelu zajednice AAF i čimbenike kontrole njihove populacije (Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2023b). Salinitet, temperatura, koncentracije nitrata, Chl *a*, amonijaka i otopljenog reaktivnog fosfora izdvojeni su kao najvažniji abiotički čimbenici koji utječu na njihovu brojnost. Također je pokazano da je biovolumen njihovih stanica u prosjeku 1,2 puta veći od prosječnog biovolumena heterotrofnih bakterija Jadranskog mora.

Nedavnim istraživanjem u Jadranu izmjerena je njihova dosad rekordna zastupljenost u morskom bakterioplanktonu i to nakon epizoda požara u površinskom mikrosloju mora obogaćenom visokim koncentracijama amonijaka i nitrata (Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2023a). Površinski mikrosloj mora razdjelnica je između same površine oceana i atmosfere, debljine manje od 1 mm, a navedenim istraživanjem utvrđena je nadprosječna apsolutna brojnost AAF od čak $55,86 \times 10^4$ stanica mL^{-1} te njihova prosječna relativna brojnost od 29,78% ukupne prokariotske zajednice.

Međutim, sveobuhvatna i detaljna analiza sastava zajednice AAF u Jadranskom moru uz njene kontrolirajuće čimbenike do sada nije opisana, kao ni njihova prostorno-vremenska raspodjela na finijim taksonomskim razinama.

1.7. Cilj i temeljne hipoteze istraživanja

U svrhu bolje procjene odgovora mikrobnih zajednica na promjene u okolišu, nužno je poznavati strukturu i brojnost njenih članova (Caroppo *i sur.*, 2022). Prethodno su provedena istraživanja o udjelu pojedinih mikrobnih skupina u specifičnim i kontroliranim uvjetima (Fecskeova *i sur.*, 2021), ali malo je podataka o cjelogodišnjem kvalitativnom i kvantitativnom odgovoru članova mikrobne zajednice u Jadranskom moru, a pogotovo na finijim taksonomskim razinama (Šantić *i sur.*, 2021). Uz navedeno, sastav zajednice AAF kao i njena prostorno-vremenska raspodjela na detaljnijim taksonomskim razinama do sada nije poznata.

Cilj ove doktorske disertacije je odrediti sezonsku i prostornu dinamiku ukupne mikrobne zajednice na finijim taksonomskim razinama u srednjem Jadranskom moru tijekom godine dana s naglaskom na aerobne anoksiogene fototrofe u svrhu određivanja brojnosti, sastava i dinamike glavnih bakterijskih skupina te njihove bioraznolikosti kao i najznačajnijih okolišnih čimbenika koji utječu na navedene zajednice.

Dodatni cilj je detaljna usporedba različitih metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a na uzorcima „mock“ i morske mikrobne zajednice kao početnog koraka u istraživanjima temeljnim na metabarkodiranju.

Temeljne hipoteze postavljene u ovom istraživanju:

Hipoteza 1: Promjene u okolišnim čimbenicima ne utječu na obrasce, strukturu i raznolikost ukupne mikrobne zajednice u srednjem Jadranu.

Hipoteza 2: Promjene u okolišnim čimbenicima ne utječu na obrasce, strukturu i raznolikost zajednice aerobnih anoksiogenih fototrofa u srednjem Jadranu.

Hipoteza 3: Nema razlike u kvaliteti i količini izolirane DNA s obzirom na korištenu metodu izolacije.

Hipoteza 4: Nema razlike u relativnom sastavu mikrobnih zajednica određenih metodom 16S metabarkodiranja s obzirom na korištenu metodu izolacije DNA ili izravni PCR pristup.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Područje istraživanja, prikupljanje uzoraka i analiza okolišnih čimbenika

Uzorci su prikupljeni uglavnom mjesečno, kroz razdoblje od jedne godine (od veljače 2021. do siječnja 2022. godine), istraživačkim brodom BIOS DVA. Uzorkovanja su provedena u veljači, ožujku, travnju, svibnju, lipnju, kolovozu, studenom i prosincu 2021. godine te siječnju 2022. godine. Uzorkovanje se odvijalo uvijek na istim dubinama osim dubine dubokog klorofilnog maksimuma (dChlMax, engl. *deep chlorophyll maximum*) na postaji otvorenog mora CJ009.

Uzorkovanjem su obuhvaćene tri postaje srednjeg Jadranskog mora različitih fizikalno-kemijskih obilježja ekosustava: postaja priobalnog područja Kaštelanskog zaljeva ST101 (43° 31' 06", 16° 22' 54"; dubine 0 m i 35 m), prijelazna postaja CJ007 u Splitskom kanalu (43° 25' 36", 16° 23' 54"; dubine 0 m, 30 m i 50 m) te postaja otvorenog mora CJ009, Stončica (43° 00' 00", 16° 20' 00"; standardne oceanografske dubine 0 m, 30 m, 50 m, 75 m, 100 m i duboki klorofilni maksimum) (Slika 2.1).

Za DNA analize, morska voda je prikupljena Niskinovim crpcem volumena 5 L, odmah prefiltrirana kroz planktonsku mrežicu veličine pora 20 µm te su volumeni od 1 L do 2 L odmah nakon uzorkovanja vakuumski filtrirani kroz polietersulfonske membranske filtere (PES, promjer 47 mm, FiltraTECH, Francuska) veličine pora promjera 0,22 µm. Odmah nakon filtracije, filteri su smrznuti tekućim dušikom te pohranjeni pri temperaturi od -80°C do daljnje obrade.

Alikvoti morske vode za određivanje brojnosti AAF bakterija, CARD- i IC-FISH metode odmah su nakon uzorkovanja fiksirani formalinom (f. c., konačna koncentracija, engl. *final concentration* 2%), dobro promiješani, inkubirani u mraku najmanje 1 h te profiltrirani kroz polikarbonatne filtere veličine pora 0,22 µm unutar maksimalno 24 h, nakon čega su pohranjeni pri temperaturi od -20°C do daljnje obrade.

Za određivanje brojnosti autotrofnih stanica protočnom citometrijom, 2 mL morske vode je fiksirano glutaraldehidom (f. c. 0,5%) te odmah zamrznuto i pohranjeno pri temperaturi od -80°C do analize na Cytoflex citometru. Za određivanje brojnosti heterotrofnih bakterija, bakterija s visokim sadržajem nukleinske kiseline (HNA), bakterija s niskim sadržajem nukleinske kiseline (LNA) i heterotrofnih nanoflagelata (HNF), uzorci su odmah nakon uzorkovanja fiksirani formalinom (f. c. 2%) i pohranjeni pri +4°C do analize na Cytoflex citometru.

Abiotički okolišni čimbenici prikupljeni su na slijedeći način: temperatura, salinitet i koncentracije hranjivih tvari izmjerene su u Laboratoriju za kemijsku oceanografiju i sedimentologiju Instituta za oceanografiju i ribarstvo. Temperatura i salinitet izmjereni su SeaBird

25 CTD sondom s točnošću $> \pm 0,01^\circ\text{C}$ odnosno $\pm 0,02$. Koncentracije anorganskih hranjivih tvari, nitrata- NO_3^- , nitrita- NO_2^- , amonijevih iona- NH_4^+ , otopljenog reaktivnog fosfora (SRP, engl. *soluble reactive phosphorus*) odnosno ortofosfata- HPO_4^{2-} , ortosilikata- SiO_4^{4-} i ukupnog anorganskog dušika-DIN, su određene modificiranom autoanalizatorskom metodom (Koroleff & Grasshoff, 1976) u Laboratoriju za kemijsku oceanografiju i sedimentologiju Instituta za oceanografiju i ribarstvo. Granice detekcije metode iznosile su $0,001 \mu\text{molL}^{-1}$ za nitrite (NO_2^-), $0,01 \mu\text{molL}^{-1}$ za nitrata (NO_3^-), $0,0002 \text{mgL}^{-1}$ za amonijev ion (NH_4^+) i $0,02 \mu\text{molL}^{-1}$ za ortofosfat (HPO_4^{2-}). Kriteriji stehiometrijske ograničenosti nutrijenata temeljeni su na idućim omjerima: $\text{Si/N} = 1$ i $\text{Si/P} = 10$ za Si limitiranost; $\text{N/P} = 22$ i $\text{Si/P} = 22$ za P limitiranost; $\text{N/P} = 10$ i $\text{Si/N} = 1$ za N limitiranost (Justić *i sur.*, 1995). Koncentracija klorofila *a* (Chl *a*) odredila se fluorometrijski metodom ekstrakcije acetonom (Strickland & Parsons, 1972) pomoću Turner TD -700 laboratorijskog fluorometra kalibriranog čistim Chl *a* u okviru rada Laboratorija za plankton i toksičnost školjkaša Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

Međuzavisnosti između abiotičkih varijabli procijenjene su korištenjem korelacijskih (Draftsman) dijagrama u programu PRIMER7 (Clarke & Gorley, 2015) kako bi se procijenilo treba li određenu varijablu isključiti iz daljnje analize u slučaju jake korelacije.



Slika 2.1. Područje istraživanja i prikaz postaja ST101, CJ007 i CJ009 srednjeg Jadrana.

Godišnja doba u moru određena su prema kriterijima skupa povijesnih hidrografskih podataka o Jadranskom moru, pri čemu su se mjeseci od siječnja do travnja smatrali zimom, svibanj i lipanj proljećem, srpanj do listopada ljetom te studeni i prosinac jesen (Artegiani *i sur.*, 1997).

2.2. Optimizacija postupka određivanja strukture bakterijskih zajednica metabarkodiranjem 16S rRNA gena u uzorcima mora

U svrhu usporedbe različitih metoda izolacije i izravne PCR amplifikacije, pet protokola izolacije DNA i izravna PCR amplifikacija testirani su na uzorcima umjetno stvorene „mock“ zajednice i uzorcima morske vode iz priobalnog područja srednjeg Jadrana. Kao negativne kontrole korišteni su prazni PES membranski filteri veličine pora promjera 0,22 μm koji su prošli proces filtracije, samo što je u ovom slučaju bila filtrirana čista (miliQ) voda umjesto uzorka. Za svaku metodu je određena dobivena koncentracija i čistoća izolirane DNA, uspješnost amplifikacije 16S rRNA gena te rezultati sekvenciranja.

2.2.1. Priprema „mock“ zajednica i prikupljanje uzoraka morskog okoliša za testiranje metoda izolacije DNA

Devet bakterijskih vrsta podrijetlom iz različitih morskih okoliša koje bi se mogle pojaviti i u Jadranskom moru nabavljene su kao čiste kulture iz „*The Roscoff Culture Collection*“ (Francuska) u svrhu stvaranja „mock“ zajednice, uključujući *Synechococcus sp.* (RCC48), *Roseovarius tolerans* (RCC1914), *Flavobacteriaceae sp.* (RCC5730), *Bacillus sp.* (RCC6828), *Pseudoalteromonas undina* (RCC4305), *Microbacterium sp.* (RCC4176), *Vibrio sp.* (RCC4144), *Erythrobacter sp.* (RCC1876), i *Glaciecola sp.* (RCC4342).

Koncentracija stanica u svakoj kulturi izmjerena je CytoFLEX protočnim citometrom opremljenim laserskom emisijom na valnoj duljini od 488 nm (The Beckman Coulter). Bakterijski izolati temeljito su resuspendirani u 1 mL sterilne umjetne morske vode (37 g NaCl otopljenog u 1 L Milli-Q, dvaput autoklavirano) te su razrijeđeni do ciljanih konačnih koncentracija kako bi omjeri svih vrsta u otopini bili jednaki. Resuspendirane bakterije su nakon razrijeđenja do ciljanih koncentracija pomiješane u 1 L sterilne umjetne morske vode u boci od borosilikatnog stakla (SCHOTT, Velika Britanija). Finalna koncentracija stanica iznosila je $3,053 \times 10^4$ stanica mL^{-1} . Ovaj broj usporediv je s najmanjim brojem bakterija mL^{-1} zabilježenim u južnom Jadranu (Šantić *i sur.*, 2021). Alikvoti od 50 mL predstavljali su tehničke replike i vakuumski su filtrirani kroz polietersulfonske membranske filtere veličine pora 0,22 μm (PES, promjer 47 mm, FiltraTECH, Francuska) koji su odmah nakon filtracije pohranjeni pri -80°C do izolacije DNA (u roku od 2 tjedna).

Uzorci mora prikupljeni su s dva mjesta u istočnom dijelu srednjeg Jadranskog mora blizu grada Splita u listopadu 2020. u Kaštelanskom zaljevu (43,52 N; 16,37 E, ~300 m od obale) i u veljači 2022. na plaži Strožanac (43,50 N; 16,53 E). Približno 32 L površinskog sloja mora

(gornjih ~30 cm) sakupljeno je s ova dva mjesta u boce i odmah prefiltrirano kroz planktonsku mrežu veličine pora 20 μm . Unutar 1 h od uzorkovanja, alikvoti volumena 1 L vakuumski su filtrirani kroz polietersulfonske membranske filtere veličine pora 0,22 μm (PES, promjer 47 mm, FiltraTECH, Francuska). Kako bi se osigurala bolja međusobna usporedivost metoda, 1 L odabrana je kao fiksni volumen filtracije za sve uzorke (Boström *i sur.*, 2004). Nakon filtracije morske vode, filteri su odmah zamrznuti pri -80°C do daljnje izolacije DNA (u roku od 2 tjedna). Jedna litra čiste (Milli-Q) vode predstavljala je negativnu kontrolu (ukupno pet filtera, jedan PES filter kao negativna kontrola po metodi izolacije).

2.2.2. Metode izolacije DNA, amplifikacija ciljanog gena i izravni PCR

Pet protokola izolacije DNA (tri zasnovane na biokemijskim metodama, skraćenice B1, B2, B3 te dvije zasnovane na kitu, skraćenice K1, K2) i izravni PCR (skraćenica P) (Tablica 2.1) testirani su na ukupno 26 uzoraka „mock“ zajednice i 31 uzorku morske vode iz okoliša s dvije različite lokacije srednjeg Jadrana. Sve tehničke replike filtracije (najmanje dvije za morske uzorke prikupljene 2020., najviše šest za „mock“ zajednicu) unutar svake metode potječu iz iste prikupljene morske vode odnosno iste mješavine „mock“ zajednice. Volumen elucije/otapanja fiksiran je na 35 μL za sve metode izolacije kako bi se omogućila standardizacija prinosa/koncentracije DNA korištena za procjenu učinkovitosti svake metode. Filtraciju, sve izolacije DNA i PCR amplifikacije izvršila je ista osoba u istom laboratoriju.

Tablica 2.1. Skraćeni pregled značajki ispitivanih metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a.

Metoda	Skraćenica	DNA izolacija	Metoda lize stanica	DNA polimeraza u PCR amplifikaciji	Prednosti	Nedostatci
Fenol/kloroform/izoamil	B1	Da	Toplina, biokemijska	Q5 [®] High-Fidelity (NEB)	Mala cijena po uzorku, zadovoljavajuća kvaliteta i prinos DNA	Organska otapala opasna za okoliš i laboratorijsko osoblje, dug protokol (2 dana)
Precipitacija izopropanolom	B2	Da	Toplina, biokemijska	Q5 [®] High-Fidelity (NEB)	Netoksično, mala cijena po uzorku, zadovoljavajuća kvaliteta i prinos DNA	Dug protokol (2 dana)
Precipitacija etanolom	B3	Da	Toplina, biokemijska	Q5 [®] High-Fidelity (NEB)	Netoksično, mala cijena po uzorku, zadovoljavajuća kvaliteta i prinos DNA	Dug protokol (2 dana)
DNeasy PowerWater Kit (Qiagen)	K1	Da	Mehanička, kemijska	Q5 [®] High-Fidelity (NEB)	Brz i jednostavan protokol	Visoka cijena po uzorku, niski prinos, značajan broj okolišnih bakterija nedetektiran
Modificirani DNeasy PowerWater Kit (Qiagen)	K2	Da	Mehanička, kemijska	Q5 [®] High-Fidelity (NEB)	Brz i jednostavan protokol	Visoka cijena po uzorku, niski prinos, značajan broj okolišnih bakterija nedetektiran
Platinum Direct PCR Universal Master Mix (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)	P	Ne	Toplina, kemijska	Invitrogen Platinum II Taq Hot-Start	Brz, robustan i unaprijed optimiziran protokol, mala cijena po uzorku, preskočen korak DNA izolacije	Nedostatak izolirane DNA za ostale svrhe (qPCR, metagenomika)

2.2.2.1. Izolacija fenolom/kloroformom/izoamilom (metoda jedan - B1) i PCR amplifikacija

Često korištena metoda izolacije DNA temeljena na standardnom protokolu u kojem se koristi fenol/kloroform/izoamilni alkohol bila je prva izabrana i testirana metoda (Renshaw *i sur.*, 2015; Djurhuus *i sur.*, 2017; McKiernan & Danielson, 2017).

Ukratko, PES filteri su prepolovljeni steriliziranim skalpelom na pola te na manje dijelove i 750 μ L TEN pufera za lizu (1 M Tris-HCl, 1 M NaCl, 500 mM EDTA) dodano je u svaku tubicu te inkubirano 1 h pri sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 25 μ L lizozima (f. c. 1 mg/mL) i uzorci su inkubirani pri 37°C tijekom 1,5 h. Dodano je osam μ L proteinaze K (f. c. 0,2 mg/mL) i 40 μ L 20% SDS-a te je reakcijska smjesa inkubirana 1 h pri 65°C u grijaćem bloku, nakon čega je uslijedilo zagrijavanje pri 95°C tijekom 10 min. Nakon toga, dodano je 750 μ L fenol/kloroform/izoamilnog alkohola (omjera 25:24:1, BioUltra, Sigma Aldrich-Merck, Njemačka), uzorci su snažno protreseni i centrifugirani 10 min na 18000 RCF. Gornji sloj prebačen je u novu tubicu (~700 μ L), pomiješan s kloroform/izoamilnim alkoholom (omjera 24:1) i centrifugiran 10 min na 18000 RCF. Gornja vodena faza koja je sadržavala DNA (~600 μ L) prebačena je u novu tubicu, pomiješana s 1400 μ L ledeno-hladnog apsolutnog etanola, miješana 5 s na vorteksu te inkubirana preko noći pri -20°C. Sljedećeg dana, uzorci su centrifugirani 30 min na 20000 RCF pri +4°C i isprani dva puta s 500 μ L hladnog 70% etanola nakon čega je uslijedilo centrifugiranje 10 min na 20000 RCF pri +4°C. Etanol je pažljivo uklonjen i talozi su osušeni pri 37°C 5 min. Kompletно suhi talozi resuspendirani su u 35 μ L 1 \times TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH ~8,0) pufera.

Ukupna izolirana genomska DNA je kvantificirana te je čistoća (omjeri apsorbancija A260/A280 i A260/A230) izolata određena spektrofotometrom DS-11 (Denovix, SAD) prema uputama proizvođača. Negativne kontrole pokazale su koncentracije ispod granice detekcije spektrofotometra. DNA se smatrala čistom za naknadne analize ukoliko je omjer apsorbancija A260/A280 nm bio između 1,8 i 2,0 (Hermans *i sur.*, 2018). Za vizualizaciju izolirane DNA, provedena je rutinska elektroforeza podskupa uzoraka u 1% agaroznom gelu.

DNA izolirana iz „mock” zajednica i okolišnih uzoraka umnožena je upotrebom para početnica 515F-Y (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') i 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') koji cilja V4-V5 hipervarijabilne regije 16S rRNA gena (Parada *i sur.*, 2016). Ova kombinacija početnica korištena je zbog dokazano najmanje pristranosti prema određenim morskim bakterijskim skupinama, jer standardno korišten par početnica 515F (515F-C) i 806R značajno podcjenjuje (SAR11) odnosno precjenjuje (razred Gammaproteobacteria) učestale morske bakterijske grupe (Parada *i sur.*, 2016). Svaka tehnička

replika izolacije umnožena je u triplicatu gdje je 25 μL reakcijske smjese za svaki uzorak sadržavalo 12,5 μL Q5[®] High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, SAD), 1,25 μL svake početnice u konačnoj koncentraciji 0,5 μM , 1 μL DNA kalupa (koncentracije 1 ng/ μL) i 9 μL sterilne vode bez nukleaza. Uvjeti reakcije bili su sljedeći: početna denaturacija pri 98°C tijekom 30 s, praćena s 25 ciklusa amplifikacije pri 98°C tijekom 7 s, 60°C tijekom 30 s i 72°C tijekom 30 s te 2 min konačne elongacije pri 72°C (T100 termalni cikler, Biorad, SAD).

2.2.2.2. Modificirana izolacija fenolom/kloroformom/izoamilom (protokoli taloženja izopropanolom i etanolom - metode dva i tri, B2 odnosno B3)

Slično prethodno opisanom B1 protokolu, procijenjene su i njegove modificirane, kraće i manje toksične verzije bez korištenja fenola/kloroforma/izoamilnog alkohola i kloroforma/izoamilnog alkohola (Harding *i sur.*, 2011). Svi koraci protokola prije koraka dodavanja fenola/kloroforma/izoamila bili su identični kao što je opisano u metodi B1. Nakon inkubacije pri 95°C, uzorci su centrifugirani 20 min na 18000 RCF. Supernatant (~700 μL) je pažljivo prebačen u novu tubicu, oprezno izbjegavajući stanične ostatke odnosno talog. Polovica uzoraka istaložena je jednim volumenom izopropanola (protokol B2), a druga polovica s dva volumena ledeno hladnog apsolutnog etanola (protokol B3). Nakon prekonoćne inkubacije pri -20°C, istaložena DNA je isprana etanolom, osušena i resuspendirana identično kao u B1. Detaljan protokol opisan je u Prilogu S1. Kontrola kvalitete izolirane DNA i PCR amplifikacija provedeni su kako je opisano za metodu B1.

2.2.2.3. DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) (metoda četiri - K1)

Izolacije DNA DNeasy PowerWater Kitom (QIAGEN, Nizozemska) izvedene su prema uputama proizvođača uz manje izmjene u svrhu poboljšanja prinosa DNA. Uzorci su umjesto 5 min miješani 15 min na vorteksu pri maksimalnoj brzini (Korak 7 u „*Quick-Start Protocol*”). Tubice s kuglicama postavljene su horizontalno tijekom vorteksiranja, a konačni volumen elucije otopinom EB iznosio je 35 μL (korak 21 u „*Quick-Start Protocol*”). Važno je napomenuti da je proizvođač QIAGEN, zbog prestanka proizvodnje uslijed problema u opskrbnom lancu tijekom 2021. godine, granatne kuglice zamijenio keramičkim kuglicama različitih promjera (tehnologija PowerBead Pro) uz izjavu da su performanse usporedive ili čak bolje od performansi granatnih kuglica. Uzorci prikupljeni 2020. obrađeni su stoga serijom 2020. (LOT 166020493) u kojoj su korištene vidljivo veće kuglice, dok su uzorci prikupljeni 2022., kao i uzorci „mock” zajednice, obrađeni serijom 2022. (LOT 169044629) s mješavinom

keramičkih kuglica raznih veličina. Kontrola kvalitete izolirane DNA kao i PCR amplifikacija provedeni su kako je opisano za metodu B1.

2.2.2.4. Modificirani protokol DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) (metoda pet - K2)

U pokušaju dodatnog poboljšanja inače malenog prinosa DNA nakon izolacije metodom K1, modificirani protokol testiran je sa sljedećim izmjenama: keramičke kuglice MagNA Lyser Green Beads (Roche, Švicarska, promjer 1,4 mm) korištene su umjesto proizvođačevih tubica s kuglicama. PES filteri prerezani su na pola steriliziranim skalpelom i stavljani u tubice volumena 1,5 mL ispunjene keramičkim zrnima nakon čega je uslijedila homogenizacija na MagNALyser instrumentu (Roche, Švicarska), dva puta po 20 s na 9000 RCF. Nakon homogenizacije, tubice su centrifugirane 1 min na 5600 RCF. Supernatant je prebačen u čistu tubicu volumena 2 mL i protokol je nastavljen prema uputama proizvođača (od koraka 8 u „*Quick-Start Protocol*”). Elucija DNA sa silikatnih kolona provedena je korištenjem 35 μ L otopine EB kao u K1. Kontrola kvalitete i uvjeti PCR amplifikacije provedeni su kako je opisano za B1.

2.2.2.5. Izravni PCR pomoću Platinum Direct PCR Universal Master Mix-a (metoda šest - P)

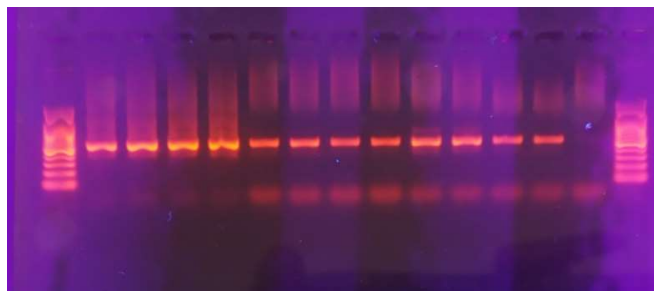
Za izravno umnažanje V4-V5 regije 16S rRNA gena iz uzoraka bez prethodnog koraka DNA izolacije, korišten je Platinum Direct PCR Universal Master Mix (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Protokol kratke lize koji je predložio proizvođač proveden je za svaki filter kako slijedi: 3 μ L proteinaze K dodano je u 100 μ L pufera za lizu osiguranog od strane proizvođača, otopina je kratko promiješana vorteksiranjem te centrifugirana. Sićušni komadić PES filtera (otprilike 1/10 filtera, odrezan od sredine prema rubovima) u cijelosti je bio uronjen u otopinu za lizu, inkubiran na sobnoj temperaturi 5 min, a zatim 1 min pri 98°C. Odabir korištenja malog komadića filtera napravljen je u skladu sa smjericama proizvođača za veličinu početnog materijala. Također, 1 μ L morske vode mogao se direktno koristiti kao početni materijal umjesto PES filtera u puferu za lizu, no navedeno bi dovelo do još veće pristranosti u odnosu na druge testirane metode, stoga je PES filter korišten kao početni materijal. Usporedno, čisti filter poslužio je kao negativna kontrola metode za izravnu PCR amplifikaciju (uz NTC kontrolu). Lizat je kratko centrifugiran te je 1 μ L supernatanta korišten kao DNA kalup za pripremu PCR reakcijske smjese za amplifikaciju V4–V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena s parom početnica 515F-Y (5'-

GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') i 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT -3')(Parada *i sur.*, 2016). Sve PCR reakcije izvedene su u triplikatu. Za svaki uzorak, reakcijska smjesa volumena 20 μ L sastojala se od 10 μ L 2X Platinum Direct PCR Universal MasterMix-a (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD), 0,4 μ L svake početnice u konačnoj koncentraciji 0,2 μ M, 1 μ L supernatanta lizata kao DNA kalupa te 8,2 μ L sterilne vode bez nukleaza. Reakcije su izvedene prema uputama proizvođača: 94°C tijekom 2 min, nakon čega je slijedilo 35 ciklusa pri 94°C tijekom 15 s, 60°C tijekom 15 s i 68°C tijekom 20 s (T100 termalni cikler, Biorad, SAD).

2.2.3. Pročišćavanje PCR amplikona, priprema knjižnica i sekvenciranje

Kako bi se vizualizirali PCR produkti i negativne kontrole, provedena je elektroforeza na agaroznom gelu (1,5%, obojen s bojom GelRed, Sigma Aldrich, SAD) u 1 x TAE puferu. Primjer rezultata elektroforeze nakon izravnog PCR-a na okolišnim uzorcima mora prikazan je na Slici 2.2. Sve kontrolne izolacije i kontrolne amplifikacije bez dodanih kalupa bile su negativne. Triplikati za svaki uzorak sakupljeni su i pročišćeni korištenjem GeneJET PCR Purification Kit-a (Thermo Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Za određivanje koncentracija pročišćenih amplikona, korišten je spektrofotometar DS-11 (Denovix, SAD) prema uputama proizvođača.

Pripremu knjižnica i sekvenciranje uparenih krajeva (2×250 bp) amplikona V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena na Illumina MiSeq-u izvršio je „*The Genomics Core Facility Universitat Pompeu Fabra*” (Barcelona, Španjolska), prema smjernicama iz priručnika „*Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (15044223Rev.B, https://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html)*”. Svaka tehnička replika sekvencirana je kao pojedinačni uzorak.



Slika 2.2. Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu (1,5%, obojen s bojom GelRed, Sigma Aldrich) nakon amplifikacije V4-V5 regije 16S rRNA izravnim PCR-om u okolišnim morskim uzorcima pomoću Platinum Direct PCR Universal Master Mix-a (Invitrogen).

2.2.4. Bioinformatička obrada podataka i statistička analiza

Kako bi se usporedila statistička značajnost razlika u prinosu DNA između različitih metoda izolacije, neparametrijski Kruskal–Wallisov test praćen post-hoc Dunnovim testom višestrukih usporedbi proveden je u programskom jeziku R v4.2.2 (<https://cran.r-project.org/>).

Ukupno 2029701 sirovih sekvenci iz dva ciklusa sekvenciranja Illumina MiSeq uređaja korišteno je u bioinformatičkim analizama. Kvaliteta sekvenci procijenjena je pomoću programa FastQC v0.11.9. Nakon uklanjanja MiSeq adaptera i barkodova, početnice su odstranjene pomoću programa cutadapt v4.1 (Martin, 2011). Nakon toga, obrada podataka provedena je u okruženju programskog jezika R/Bioconductor pomoću paketa dada2 v1.16.0 (Callahan *i sur.*, 2016). Uzorci „mock” zajednice i uzorci mora analizirani su odvojeno zbog specifičnog parametrijskog modela pogrešaka u funkciji *learnErrors* koju dada2 koristi za razlikovanje stopa pogrešaka sekvenciranja između različitih tipova uzoraka (Caporaso *i sur.*, 2010b). Ukratko, funkcijom *filterandTrim* (postavki „*truncLen=c(230,225)*, *maxN = 0* (nije dopušteno *N*), *maxEE = c(2, 2)*, *truncQ = 2*, *rm.phix = TRUE*”) su uklonjene sekvence i krajevi sekvenci loše kvalitete (prosječni *Q*-rezultat <30). Nakon procesa učenja pogrešaka i primjene *dada* algoritma, preklopljeni su upareni krajevi „*forward*” i „*reverse*” očitavanja sekvenci, što je konačno rezultiralo matricom brojnosti svake varijante sekvenci amplikona (ASV). Zadana funkcija *removeBimeraDenovo* s „*pooled*” metodom korištena je za uklanjanje kimera, koje su pridonijele od 2,22% do 2,81% ukupnog broja sekvenci za uzorke „mock” zajednica odnosno uzorke iz okoliša (Prilog S2). Funkcija *assignTaxonomy* koja primjenjuje metodu naivnog Bayesovog klasifikatora korištena je za taksonomsku identifikaciju svakog ASV-a pomoću baze podataka Silva v138.1, ažurirane 10. ožujka 2021. (Wang *i sur.*, 2007; Quast *i sur.*, 2013). Nakon stvaranja *phyloseq* objekta iz taksonomske, opisne i ASV matrice pomoću *phyloseq* paketa v1.32.0 za R, ASV-ovi klasificirani kao kloroplasti ili mitohondriji su odbačeni iz daljnjih analiza (McMurdie & Holmes, 2013). Rijetki ASV-ovi koji nisu bili zastupljeni s najmanje pet sekvenci u tri uzorka (najmanja eksperimentalna skupina po metodi) uklonjeni su iz daljnjih analiza te su preostali ASV-ovi aglomerirani na razinu roda. Skup podataka za „mock” zajednicu dodatno je filtriran posebno na „mock” taksone kako bi se dobila isključivo umjetno stvorena zajednica bez ikakvih kontaminanata, nakon čega je uslijedila aglomeracija ASV-ova na razinu obitelji. Ovo je korišteno za analizu isključivo „mock” taksona. Nekoliko „mock” ASV-ova klasificiranih kao red Bacillales u bazi podataka Silva v138.1, ali bez taksonomske identifikacije na razini roda, ručno je anotirano pomoću *blastn*

algoritma na NCBI portalu kao *Bacillus sp.* (postavke „*query coverage 100%, E-value 0.0 & percent identity 100.0*”), u skladu s taksonom koji se koristio za stvaranje „mock” zajednice.

S obzirom da sekvenciranje amplikona ne rezultira podjednakim brojem sekvenci u svim uzorcima, broj sekvenci koje su zabilježene za svaki ASV se ne može smatrati njegovom direktnom abundancijom prije normalizacije i usklađivanja uzoraka. U ekološkim se istraživanjima u ovakvim slučajevima radi rarefakcija, odnosno nasumični probir zabilježenih varijanti na način da se svi uzorci svedu na istu razinu, odnosno isti ukupan broj zabilježenih sekvenci po uzorku koji mora biti prilagođen najmanje sekvenciranim uzorcima. Rarefakcija postiže normalizaciju, međutim ujedno predstavlja značajan gubitak podataka (McMurdie & Holmes, 2014). U analizi podataka u ovom istraživanju je primijenjen kompozicijski pristup (engl. *compositional data analysis*) (Fernandes *i sur.*, 2014; McMurdie & Holmes, 2014; Gloor *i sur.*, 2017). Kompozicijska analiza postaje sve popularniji pristup obradi ovakvog tipa podataka u kojem se primjenjuje transformacija centriranog logaritamskog omjera (clr, engl. *centered log-ratio*) koja omogućava da se i bez rarefakcije relativni udjeli različitih taksona u uzorcima direktno mogu usporediti između uzoraka (Tsilimigras & Fodor, 2016; Gloor *i sur.*, 2017; Sisk-Hackworth & Kelley, 2020; Harrison *i sur.*, 2021). Ovakvi skupovi podataka i jesu kompozicijske prirode. Transformacija centriranog logaritamskog omjera napravljena je prema niže navedenoj formuli, odvojeno za „mock” i okolišne skupove podataka. Računa se logaritam omjera svake vrijednosti i geometrijskog srednjaka svih očitavanja za taj uzorak. Clr-transformirani skup podataka na ovaj način postaje „*scale-invariant*” (Aitchison, 1982; Gloor *i sur.*, 2017; Sisk-Hackworth & Kelley, 2020):

$$clr(x_i) = \left[\log\left(\frac{x_{1i}}{g(x_i)}\right), \dots, \log\left(\frac{x_{yi}}{g(x_i)}\right) \right]$$

gdje je x_i uzorak u skupu podataka, $g(x_i)$ predstavlja geometrijski srednjak svih očitavanja sekvenci x_i uzorka, x_{1i} je prva vrijednost, a x_{yi} zadnja vrijednost očitavanja sekvenci za taj uzorak (Gloor *i sur.*, 2017; Sisk-Hackworth & Kelley, 2020).

Funkcija *transform* R paketa *microbiome* v1.10.0 korištena je za clr transformaciju podataka (Lahti *i sur.*, 2017). Prije logaritmiranja uzoraka, ova funkcija uvodi pseudo-vrijednosti umjesto nula u matrici brojnosti ASV-ova, takve da uzima minimalne relativne brojnosti ASV matrice podijeljene s 2.

Kako bi se testirao značaj učinka različitih metoda izolacije DNA na sastav bakterijske zajednice, provedena je permutacijska multivarijatna analiza varijance (PERMANOVA) na

temelju Aitchisonovih udaljenosti u programu PRIMER7 (Clarke & Gorley, 2015). Aitchisonove udaljenosti su zapravo euklidske udaljenosti na clr-transformiranom skupu podataka. U PERMANOVA analizi metoda izolacije DNA je tretirana kao fiksni faktor (postavke: „9999 permutations, sums of squares type: Type III (partial), permutation method: Unrestricted permutation of raw data”) (Anderson, 2017). Kontrasti za usporedbu različitih metoda dizajnirani su u skladu s glavnim eksperimentalnim pitanjima, odnosno prvenstveno su se uspoređivale glavne grupe metoda: izravna PCR amplifikacija (P), metode izolacije DNA temeljene na kitu (K1 – K2) te biokemijske metode (B1 – B3).

Aitchisonove udaljenosti (Aitchison *i sur.*, 2000) su korištene i za analize beta raznolikosti u podacima, analizu glavnih komponenti (PCA, engl. *principal component analysis*) za određenu taksonomsku razinu (rod ili obitelj) pomoću R paketa *microViz* v0.10 (Gloor *i sur.*, 2017; Barnett *i sur.*, 2021). Prikaz toplinske karte sastava zajednica stvoren je pomoću funkcije *heatmap.2* paketa *gplots* v3.1.3 na temelju Aitchisonovih udaljenosti i Ward.D2 metode izrade dendrograma (Warnes *i sur.*, 2022). Za kvalitativne usporedbe relativnog sastava mikrobne zajednice, broj taksonomskih jedinica prikazan je kao relativna brojnost određenog taksona (Harrison *i sur.*, 2021). R paketi *ggplot2* v3.3.5 i *patchwork* v1.1.2 korišteni su za sve vizualizacije (Wickham, 2016; Pedersen, 2022).

Za usporedbu broja dijeljenih ASV-ova između metoda, Vennovi dijagrami generirani su pomoću funkcije *ps_venn* R paketa *MicEco* v0.9.18 na nefiltriranim i filtriranim skupovima podataka (Russel, 2022).

2.3. Analiza pikoplanktonske zajednice

2.3.1. Određivanje brojnosti članova pikoplanktonske zajednice protočnom citometrijom

Svi članovi pikoplanktonske zajednice [cijanobakterije *Synechococcus* i *Prochlorococcus*, pikoeukarioti, heterotrofne bakterije, bakterije s visokim (HNA, engl. *high nucleic acid content*) odnosno niskim sadržajem nukleinske kiseline (LNA, engl. *low nucleic acid content*) uključujući heterotrofne nanoflagelate (HNF)] određeni su direktnim brojanjem stanica metodom protočne citometrije (Gasol & Morán, 2015).

Ukratko, za brojanje autotrofnih stanica korišteno je 2 mL morskih uzoraka fiksiranih glutaraldehidom (f. c. 0,5%), zamrznutih pri temperaturi od -80°C do analize na Cytoflex citometru (Beckman Coulter). Autotrofne stanice podijeljene su u skupine: *Synechococcus*, *Prochlorococcus* i pikoeukariote koji se razlikuju prema raspršenju svjetlosti, a zbog autofluorescencije karakterističnih pigmenata uzorke nije bilo potrebno umjetno bojati. Stanice

su razlikovane prema crvenoj emisiji staničnog klorofila roda *Prochlorococcus* odnosno po narančastoj emisiji stanica bogatih fikoeritriinom roda *Synechococcus*. Njihova ukupna brojnost izražena je kao broj stanica mL⁻¹, a citometar je automatski izračunava ovisno o zadanom trajanju analize (s) i odabranoj brzini protoka (μL s⁻¹).

Za određivanje ukupne brojnosti heterotrofnih bakterija nakon fiksacije uzoraka formalinom (f. c. 2%) i pohrane pri +4°C do citometrijske analize, uzorke je bilo potrebno obojati DNA bojom SYBR Green I (Molecular Probes Inc., SAD) razrjeđenja 1:10000 te inkubirati 30 min u mraku. Zbog poznatog položaja ovih stanica na dvoparametrijskom citogramu gdje je na osi x signal veličine stanica, a na osi y intenzitet fluorescencije SYBR Green I, moguće je razlikovati heterotrofne bakterije od ostalih pripadnika mikrobne zajednice. Nakon analize na Cytoflex citometru, brojnost se izražavala kao broj stanica mL⁻¹.

Određivanje postotka HNA te LNA skupina heterotrofnih bakterija također je provedeno citometrijskom analizom gdje se razdvajanje ovih skupina temelji na različitim intenzitetima fluorescencije navedenih grupa zbog razlike u količini stanične DNA. HNA bakterije emitiraju veći intenzitet fluorescencije zbog veće količine stanične DNA, dok suprotno vrijedi za LNA bakterije (Gasol & Morán, 2015).

Za određivanje brojnosti HNF u uzorcima prethodno fiksiranim formalinom (f. c. 2%) i pohranjenima pri +4°C do citometrijske analize, uzorke je bilo potrebno umjetno obojati. Jedan mL uzoraka obojan je bojom SYBR Green I (Molecular Probes Inc., SAD) do konačnog razrjeđenja 1:10000 te inkubiran 30 min u mraku prije analize na Cytoflex citometru. Zbog poznatog položaja ovih stanica na dvoparametrijskom citogramu gdje je na osi x signal veličine, a na osi y intenzitet fluorescencije SYBR Green I, moguće ih je razlikovati od ostalih čestica. Nakon analize na Cytoflex citometru, brojnost se izrazila kao broj stanica mL⁻¹.

2.3.2. Određivanje bakterijske proizvodnje

Metoda bakterijske proizvodnje temelji se na praćenju sinteze DNA ugradnjom radioaktivnog 3H-timidina, gdje se količina sintetizirane DNA, proporcionalna količini ugrađenog radioaktivnog timidina, koristi kao mjera rasta bakterijske populacije (Fuhrman & Azam, 1982). U uzorke se dodaje poznata koncentracija radioaktivnog timidina koji se ugrađuje u rastući lanac DNA, a radioaktivni timidin koji se ne otopi u trikloroetenoj kiselini (TCA) određuje količinu ugrađenog radioaktivnog timidina.

Ukratko, u prikupljene uzorke mora volumena 10 mL dodan je radioaktivni timidin (f. c. 10 nmol) (Amercham, SA 86 Ci mmol⁻¹), a u kontrolne uzorke paralelno formalin (f. c.

0,5%). Nakon inkubacije 1 h u mraku pri sobnoj temperaturi, ugradnja radioaktivnog timidina u uzorcima je zaustavljena dodatkom formalina (f. c. 0,5%). Uzorci su potom profiltrirani kroz celuloza-nitratne filtere veličine pora 0,2 μm te isprani 10 puta s 1 mL ledeno-hladne TCA kako bi se ekstrahirala TCA-netopljiva frakcija. Nakon stavljanja u scintilacijske posudice, dodano je 5 mL scintilacijskog koktela (Filter-count TM, Packard), a mjerenja su izvršena na instrumentu Tri-Carb 4910 TR, Liquid Scintillation Analyzer (Perkin Elmer, SAD). Broj molova ugrađenog timidina (UT, $\text{mmolL}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) izračunat je na slijedeći način: razlika broja radioaktivnih raspada u minuti u uzorku i broja radioaktivnih raspada u minuti u kontroli podijeljena je s umnoškom volumena uzorka (L), vremena inkubacije (h) i specifične aktivnosti timidina (dpm nmol^{-1}) ($1 \mu\text{Ci} = 2,22 \times 10^6 \text{ dpm}$). Pretvorba UT u proizvodnju stanica (izražena kao $\text{st L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) izvršena je umnoškom UT i faktora konverzije (FK, $1,7 \times 10^{18} \text{ st mol}^{-1}$) (Krstulović & Šolić, 2006).

2.3.3. Fluorescencijska *in situ* hibridizacija kataliziranim taloženjem reportera (CARD-FISH, engl. *catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization*)

U ovom istraživanju, CARD-FISH i epifluorescentna mikroskopija koristili su se za određivanje broja općih bakterija (proba EUB338 I-III) (Daims *i sur.*, 1999) te pet najbrojnijih bakterijskih skupina u morskom okolišu: SAR11 (proba SAR11441R) (Morris *i sur.*, 2002), Alphaproteobacteria (proba ALF968), Gammaproteobacteria (proba GAM42a i kompetitor Bet42a) (Manz *i sur.*, 1992), pripadnici koljena Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (proba CF319a) (Manz *i sur.*, 1996) i klad *Roseobacter* (proba ROS537) (Eilers *i sur.*, 2001). Sve oligonukleotidne probe obilježene su enzimom HRP na 5' kraju. Primjer rezultata prikazan je na Slici 2.3, a nukleotidni slijed korištenih proba naveden je u Tablici 2.2.

Tablica 2.2. Prikaz DNA proba s odgovarajućim udjelom (%) formamida u hibridizacijskom puferu i volumenom 5M NaCl-a korištenog u protokolu CARD-FISH metode.

DNA proba	Oligonukleotidni slijed probe obilježene s HRP* na 5' kraju	% formamida u hibridizacijskom puferu	Volumen 5M NaCl u puferu za ispiranje (µl)
EUB 338 I-III	5'-gcw gcc wcc cgt agg wgt -3'	55	30
ALF968	5'-ggt aag gtt ctg cgc gtt -3'	45	160
SAR 11-441R	5'-tac agt cat ttt ctt ccc cga c-3'	45	160
GAM42a	5'-gcc ttc cca cat cgt tt-3'	55	30
CF319a	5'-tgg tcc gtg tet cag tac -3'	55	30
ROS 537	5'-caa cgc taa ccc cct cc-3'	55	30
NON338	5'-act cct acg gga ggc agc -3'	55	30

*peroksidaza iz korijena hrena

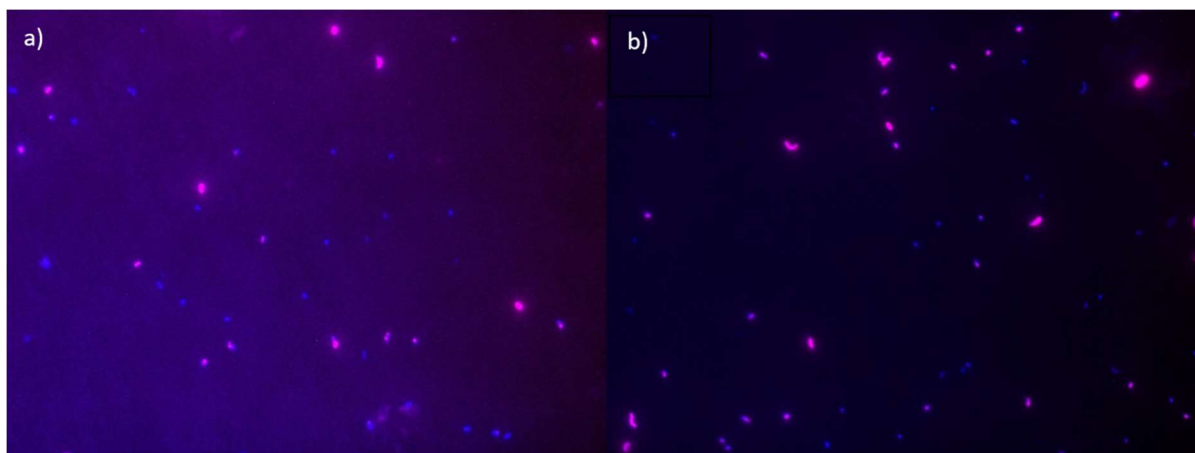
Primijenjen je standardni protokol za CARD-FISH uz manje izmjene (Pernthaler *i sur.*, 2002). Nakon fiksacije uzoraka formaldehidom (f. c. 2%) i inkubacije sat vremena u mraku, uzorci su profiltrirani na bijelim polikarbonatnim filterima veličine pora 0,2 µm (promjer 47 mm, Whatman® Nuclepore™ Track-Etched, Merck) koji su odmah nakon filtracije pohranjeni pri -20°C do daljnjih analiza.

Filteri su kratko uronjeni u otopljenu, ali ne prevruću agarozu (f. c. 0,1%) te osušeni pri 37°C 30 min, nakon čega su tretirani lizozimom (f. c. 10 mg/mL, 1 h pri 37°C). Nakon ispiranja PBS-om te inkubacije u 0,01 M HCl-u 10 min pri sobnoj temperaturi, uzorci su isprani čistom (Mili-Q) vodom i apsolutnim etanolom te pohranjeni pri -20°C do daljnje manipulacije (uglavnom sutradan). Hibridizacija s HRP obilježenim probama otopljenima u hibridizacijskom puferu (3600 µl 5 M NaCl; 400 µl 1 M Tris/HCl, pH 7,4; 2 g dekstran sulfata, otopljeno i ohlađeno na +4°C, dodani volumen čiste vode i formamida ovisi o probi; 2000 µl blokirajućeg reagensa, 20 µl SDS, alikvotirano i pohranjeno na -20°C) provedena je 2 h pri 35 °C u mraku. Nakon hibridizacije, uzorci su ispirani u puferu za ispiranje tijekom 30 min (500 µl 0,5 M EDTA, pH 8; 1 mL 1 M Tris/HCl, pH 7,4; 5 M NaCl volumena ovisnog o koncentraciji formamida u hibridizacijskom puferu, 50 mL čiste vode te 50 µl SDS).

Za detekciju i pojačavanje signala dodan je fluorescein tiramid u amplifikacijskom puferu (4 ml 10 x PBS; 16 ml 5 M NaCl; 4 g dekstran sulfata, potpuno otopljeno i ohlađeno na +4°C; 0,4 ml blocking reagesa i nadopunjeno do 40 mL čistom vodom te pohranjeno pri +4°C) uz dodatak 0,15% H₂O₂, 30 min pri 37°C. Nakon završnog ispiranja PBST-om 15 min te vodom i apsolutnim etanolom, filteri su nakon sušenja obojani 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, f. c. 1 µg/mL) koristeći 3:1 mješavinu Citifluor™ AF1 i Vectashield®.

Za procjenu prisutnosti nespecifičnog vezanja probi i nespecifične reakcije supstrata s endogenim enzimima ili aktivnostima pseudoperoksidaze, korištena je proba NON338 kao negativna kontrola.

Bakterije su izbrojane na epifluorescentnom mikroskopu Olympus BX51 (najmanje 600 stanica). Brojnost svake bakterijske skupine izračunata je kao omjer hibridiziranih stanica i stanica obojanih DAPI-jem.



Slika 2.3. Rezultati CARD-FISH metode. A) Signali hibridizirane HRP-oligonukleotidne probe SAR11441R (ružičasta boja) za klad SAR11. B) Signali hibridizirane HRP-oligonukleotidne probe EUBI-IIIa (ružičasta boja) za bakterije općenito.

2.3.4. Izolacija DNA, PCR amplifikacija i sekvenciranje sljedeće generacije

Uzorci su prikupljeni kao što je opisano u poglavlju 2.1., a izolacija DNA je provedena prema prethodno opisanom modificiranom protokolu DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) (metoda pet, skraćenica K2). Koncentracija i čistoća DNA u izolatima određene su spektrofotometrom DS-11 (Denovix, SAD) prema uputama proizvođača.

Izolirana DNA poslana je tvrtki Novogene Europe (Cambridge, UK), gdje je izvršena PCR amplifikacija, priprema knjižnica te sekvenciranje uparenih krajeva (2 x 250 bp) na uređaju Illumina NovaSeq 6000. Za amplifikaciju V4-V5 hipervarijabilnih regija gena 16S rRNA korišten je par početnica 515F-Y (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') i 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') (Parada *i sur.*, 2016). Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, SAD) korišten je za PCR amplifikaciju u jednom koraku. Broj neobrađenih sekvenci po uzorku iznosio je od 58138 do 291926 (srednja vrijednost \pm st. dev, 134328 \pm 38181).

2.3.5. Bionformatička obrada podataka, izračun indeksa raznolikosti i statistička analiza

S obzirom da u trenutku analize ovih podataka *dada* algoritam nije bio potpuno kompatibilan i prilagođen za korekciju grešaka s drugih Illumina platformi osim MiSeq-a (Callahan *i sur.*, 2016), za ove podatke dobivene sekvenciranjem 16S rRNA amplicona s Illumina Novaseq platforme primijenjen je pristup temeljen na OTU-ovima.

Prvotna obrada sirovih sekvenci napravljena je od strane tvrtke Novogene. Ukratko, nakon uklanjanja barkodova i početnica korišten je program FLASH v1.2.7 za sparivanje preklapljenih „forward“ i „reverse“ sekvenci (Magoč & Salzberg, 2011). QIIME v1.7.0 je primijenjen za filtriranje sekvenci loše kvalitete (Caporaso *i sur.*, 2010a). Nakon kontrole kvalitete, čiste sekvence uspoređene su s bazom podataka Silva v138.1 pomoću UCHIME algoritma v7.0.1001 za detekciju i uklanjanje kimera (Edgar *i sur.*, 2011). Klasteriranje sekvenci u OTU-ove na temelju praga sličnosti od 97% izvršeno je pomoću programa Uparse v7.0.1001 (Edgar, 2013). Reprezentativna sekvenca dodijeljena svakom OTU korištena je za daljnju taksonomsku anotaciju s rRNA bazom podataka Silva v138.1 pomoću metode koja se temelji na naivnom Bayesovom klasifikatoru (Wang *i sur.*, 2007; Schloss *i sur.*, 2009). OTU matrica i dodijeljena taksonomska tablica uvedene su u R statistički softver za stvaranje phyloseq objekta pomoću paketa phyloseq v1.32.0 (McMurdie & Holmes, 2013). Nebakterijski OTU-ovi klasificirani kao kloroplasti ili mitohondriji, kao i rijetki OTU-ovi koji su se pojavili manje od deset puta u najmanje tri uzorka (najmanja eksperimentalna grupa), odbačeni su iz daljnjih analiza. OTU matrica konačno je rareficirana na 39680 sekvenci po uzorku (prema uzorku s najmanjim brojem sekvenci) pomoću funkcije *rarefy_even_depth* paketa phyloseq (rngseed = 150517, argument *set.seed* postavljen za ponovljivost).

Konačni broj dobivenih OTU-ova iznosio je 814 dok je konačni broj sekvenci iznosio 3531520. Za grafički prikaz sastava bakterijske zajednice na određenoj taksonomskoj razini korišten je R paket ggplot2 v3.3.5 (Wickham, 2016).

Za izračun ukupnog opaženog broja arhealnih i bakterijskih OTU-ova, Shannonovih (H') i Pielouovih (J') indeksa raznolikosti na temelju rareficirane, ali netransformirane OTU matrice, korišten je R paket vegan v2.5.7 (Oksanen *i sur.*, 2020).

Kako bi se odredilo postoje li statistički značajne razlike u prostorno-vremenskim obrascima ukupne mikrobne zajednice, provedena je permutacijska multivarijantna analiza varijance (PERMANOVA) na podacima dobivenim sekvenciranjem 16S rRNA gena (Anderson, 2017). PERMANOVA je napravljena na Bray-Curtis udaljenostima rareficiranog i

$\log(X+1)$ transformiranog skupa podataka korištenjem programa PRIMER7 sa „sezonom” i „regijom” kao fiksnim faktorima te „slojem” [definiranim kao L1 (0-30 m), L2 (31-50 m), L3 (51-75 m) i L4 (76-100 m)] kao faktorom smještenim (engl. *nested*) unutar „regije” (postavke: „9999 permutations, sums of squares type: Type III (partial), permutation method: Unrestricted permutation of raw data”) (Clarke & Gorley, 2015; Anderson, 2017). Uz PERMANOVA analizu, na istom skupu podataka proveden je i PERMDISP test za procjenu homogenosti multivarijantnih varijanci (9999 permutacija, odstupanja od centroida). Značajan rezultat PERMDISP-a ($p < 0,05$) ukazuje na razlikovanje grupa u disperziji (Anderson, 2006).

Za povezivanje promjena u strukturi mikrobnih zajednica s različitim biotičkim i abiotičkim okolišnim čimbenicima, korištena je metoda strojnog učenja, algoritam umjetne neuronske mreže koji se svrstava u metode samoorganizirajuće mape (SOM, engl. *self-organizing map*) nazvan *neural gas* (NG) (Kohonen, 2013). NG samostalnim učenjem trenira proizvoljan broj pojedinačnih neurona zvanih „jedinice najboljeg podudaranja” (BMUs, engl. *best match units*) (Martinetz *i sur.*, 1993; Kohonen, 2013). Ovaj algoritam ne zahtijeva prethodno znanje o topološkoj strukturi skupa podataka, a neuronske jedinice mogu se slobodno kretati kroz podatkovni prostor, što NG čini prikladnim alatom za modeliranje anomalija i srednje distribucije analiziranih mikrobioloških parametara (Kohonen, 2013; Šolić *i sur.*, 2018). NG algoritam uspješno je korišten u prethodnim istraživanjima na mikrobiološkim podacima (Šolić *i sur.*, 2018; Šantić *i sur.*, 2021).

U ovom istraživanju izrađena su dva NG modela temeljena na podacima CARD-FISH relativnih brojnosti, odnosno podacima sekvenciranja, koji opisuju bakterijsku zajednicu na različitim taksonomskim razinama te ju povezuju s različitim okolišnim čimbenicima. Za izgradnju navedenih modela korišten je SOM Toolbox v2.0 za MATLAB (E. Alhoniemi, J. Himberg, J. Parhankangas, & J. Vesanto, Helsinki University of Technology, Finland: <http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox>). Prvi model, nazvan *CARD-FISH best match units* (CFBMU), konstruiran je za izdvajanje devet karakterističnih distribucija pikoplanktonske zajednice temeljenih na brojnostima glavnih bakterijskih skupina određenih CARD-FISH metodom, a drugi, nazvan *PHYLA best match units* (PHBMU), za izdvajanje četiri karakteristične distribucije bakterijskih i arhealnih koljena temeljenih na podacima sekvenciranja 16S gena.

Kako bi se izdvojilo devet, odnosno četiri karakteristična pobjednička (engl. *winning*) neurona, NG algoritam je proveden koristeći kao ulazne podatke samo CARD-FISH matricu brojnosti ispitivanih bakterijskih grupa, odnosno završnu rareficiranu OTU matricu dobivenu sekvenciranjem za kvantificiranje podatkovnog prostora. Oba NG modela inicijalizirana su

postavljanjem broja epoha treniranja (engl. *training epochs*) na 1000, početne veličine koraka (engl. *initial step size*) na 0,5 i početne konstante opadanja (engl. *initial decay constant*) na 4,5 u SOM Toolbox v. 2.0 za MATLAB.

Za sve modele, izračunati su i prikazani prosjeci okolišnih parametara (biotički i abiotički) za određeni BMU prostor.

2.4. Analiza sastava zajednice aerobnih anoksigenih fototrofa (AAF)

2.4.1. Određivanje brojnosti aerobnih anoksigenih fototrofa (AAF) epifluorescentnom mikroskopijom

Za određivanje brojnosti AAF stanica u triplicatima, uzorci mora su fiksirani formalinom (f. c. 2%) te nakon inkubacije 1 h u mraku filtrirani na 0,2 μm polikarbonatnim filterima. Nakon filtracije i sušenja, filteri su obojani pomoću 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI, f. c. 1 $\mu\text{g/mL}$) pomiješanog sa Citifluor™ AF1 i Vectashield® (omjera 3:1) (Mašin *i sur.*, 2008).

Za određivanje brojnosti AAF stanica korišten je epifluorescentni mikroskop Olympus BX51 opremljen Olympus UPlanSApo 100 \times /1.40 OIL, IR objektivom i softverom za analizu slika (CellSens). Fluorescentne slike su snimljene kamerom XM10-IR. Korištena su tri epifluorescentna filtera: DAPI, IR i klorofil. Za svaki okvir uzorka, prvo su fotografirane slike pod DAPI ekscitacijom u plavom dijelu spektra, nakon toga slike pod IR ekscitacijom (AAF i fitoplankton) u infracrvenom dijelu spektra, te na kraju autofluorescencija Chl *a*. U CellSens softveru za analizu slika, stvorena je kompozitna slika putem umjetno obojenih prethodno snimljenih fotografija sa kanala DAPI, IR i Chl *a* (Mašin *i sur.*, 2006).

Za svaki uzorak fotografirano je 8 do 12 okvira u sva tri kanala, a izbrojano je 400-600 DAPI obojenih stanica. Zbog spektra pigmenta Chl *a*, gdje se jedan vršni signal nalazi i u IR dijelu spektra BChl *a* signala, Chl *a* signal oduzet je od IR slike kako bi se eliminirao fitoplankton, a dobio neto broj isključivo AAF stanica (Vrdoljak Tomaš, 2020). Postotak broja AAF u ukupnim prokariotima izračunat je iz omjera broja stanica IR i DAPI kanala.

Ukupna brojnost AAF izražena je kao broj stanica po mililitru, a izračunata je umnoškom prosječnog broja stanica po slici i faktora mikroskopa podijeljenog s filtriranim volumenom (Vrdoljak Tomaš, 2020). Faktor mikroskopa izračunat je prema formuli:

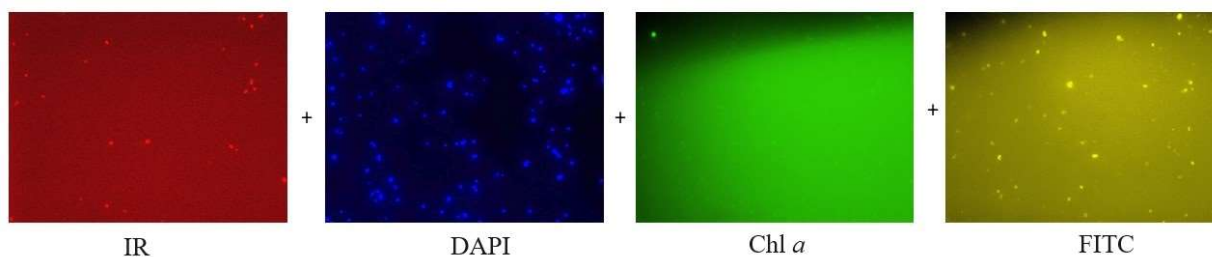
$$(\text{povećanje objektiva})^2 \times \pi \times (\text{unutarnja površina lijevka}/2) / (\text{veličina čipa kamere}).$$

2.4.2. Fluorescencijska *in situ* hibridizacija u kombinaciji s infracrvenom epifluorescentnom mikroskopijom (IC-FISH, engl. *fluorescence in situ hybridization-infrared epifluorescence-based microscopy (FISH-IR)*)

Kombinacija dviju metoda temeljenih na epifluorescenciji, infracrvene epifluorescentne mikroskopije i fluorescencijske *in situ* hibridizacije (FISH), korištena je za simultanu detekciju infracrvenih signala Bchl *a* aerobnih anoksigenih fototrofa te signala dvostruko obilježenih fluorescentnih oligonukleotidnih proba, uz manje izmjene referentnog protokola (Mašin *i sur.*, 2008; Kasalický *i sur.*, 2018). Ukratko, nakon fiksacije uzoraka formaldehidom (pH 7,5, f. c. 2%) i inkubacije u mraku tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi ili preko noći pri +4 °C, uzorci su profiltrirani na bijelim polikarbonatnim filterima veličine pora promjera 0,2 µm (47 mm, Whatman® Nuclepore™ Track-Etched, Merck). Filteri su odmah nakon filtracije pohranjeni pri -20°C do daljnjih analiza.

Fluorescentne oligonukleotidne probe dvostruko obilježene fluorescein-izotiocijanatom (FITC) na 5' i 3' krajevima probi, koje su specifične za razrede Alphaproteobacteria (ALF968), Gammaproteobacteria (GAM42a) te klad *Roseobacter* (ROS537), hibridizirane su s uzorcima pri 35°C tijekom 150 min (f. c. 45% formamida u hibridizacijskom puferu za probu ALF968 i 55% formamida za probe GAM42a i ROS37) (Manz *i sur.*, 1992; Eilers *i sur.*, 2001). Oligonukleotidni slijed probi isti je kao za CARD-FISH metodu (Tablica 2.2.).

Nakon hibridizacije, uzorci su isprani puferom za ispiranje i sterilnom deioniziranom vodom, a nikad alkoholom zbog razgradnje Bchl *a* (Kasalický *i sur.*, 2018). Nakon sušenja, filteri su obojani 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI, f. c. 1 µg/mL) koristeći 3:1 mješavinu Citifluor™ AF1 i Vectashield®. Stanice su izbrojane pomoću Olympus BX51 epifluorescentnog mikroskopa opremljenog Olympus UPlanSApo 100×/1.40 OIL objektivom, IR objektivom i CellSens softverom za analizu slika. Zbog brzog izbjeljivanja autofluorescencije Bchl *a*, primijenjena su četiri kompleta epifluorescentnih filtera redoslijedom kanala: IR, FITC, DAPI i Chl *a* te se nakon snimanja fotografija napravila kompozitna slika. Signal Chl *a* oduzet je of IR signala kako bi se dobio konačni neto broj AAF stanica po mililitru (izračunat kao i u poglavlju 2.4.1.), istovremeno detektirajući signale hibridiziranih fluorescentnih proba za svaku AAF stanicu u FITC kanalu. Za svaki uzorak snimljeno je i analizirano 10 do 12 okvira (400 do 600 DAPI obojenih stanica) za svaki kanal nasumično odabranih u raznim dijelovima filtera. Primjer rezultata IC-FISH metode prikazan je na Slici 2.4.



Slika 2.4. Rezultati IC-FISH metode s prikazom četiri kompleta epifluorescentnih filtera za jedan okvir. Redom: AAF stanice i fitoplankton u infracrvenom dijelu spektra (IR), bakterijske stanice obojane DAPI bojom, autofluorescencija fitoplanktona (signal Chl *a*) te fluorescentni signal probe GAM42a.

2.4.3. Izolacija DNA, amplifikacija *pufM* gena i pročišćavanje PCR amplikona

Kao što je prethodno opisano u poglavlju 2.1., morska voda za analize DNA prikupljena je Niskinovim crpcem te prefiltrirana kroz planktonsku mrežicu veličine pora 20 μm . Volumeni mora od 1 do 2 L vakuumski su profiltrirani na brodu kroz polietersulfonske membranske filtere veličine pora 0,22 μm (PES, promjer 47 mm, FiltraTECH, Francuska). Filteri su potom odmah zamrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni pri -80°C do daljnje analize.

Za izolaciju DNA korišten je modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) prema poglavlju 2.2.2.4. budući da su brojni pokušaji izolacije DNA konvencionalnim protokolom temeljenim na fenolu/kloroformu/izoamilu rezultirali neuspješnim PCR amplifikacijama *pufM* gena u okolišnim uzorcima. Ukratko, PES filteri su prerezani na pola te na manje komade steriliziranim skalpelom i stavljeni u tubice volumena 1,5 mL ispunjene keramičkim kuglicama (MagNA Lyser Green Beads, Roche, Švicarska), nakon čega je uslijedila homogenizacija filtera MagNALyser instrumentom, dva puta po 20 sekundi na 9000 RCF. Nakon homogenizacije, tubice su centrifugirane 1 min na 5600 RCF. Supernatant je prebačen u čistu tubicu, a protokol je izveden prema uputama proizvođača od Koraka 8 u „Quick-Start Protocol“. DNA je konačno eluirana s kolone s 35 μL otopine EB.

Ukupna genomska DNA je kvantificirana te su omjeri apsorbancija A260/A280 kao i A260/A230 izmjereni korištenjem spektrofotometra DS-11 (Denovix, SAD).

Kako bi se analizirao sastav zajednice AAF, provedena je PCR amplifikacija *pufM* gena (veličine amplikona ~ 204 bp) korištenjem para početnica UniF (5'-GGNAAYYTNTWYTAYAAAYCCNTTYCA) i WAW(5'-AYNGCRAACCACCANGCCCA) (Béjà *i sur.*, 2002; Yutin *i sur.*, 2005; Fecskeová *i sur.*, 2021). Svi su uzorci umnoženi u

triplikatima, pri čemu je 25 µL reakcijske smjese za svaki uzorak sadržavalo 12,5 µL Q5® High-Fidelity 2X Master Mix-a (New England Biolabs, SAD), 1,25 µL svake početnice u konačnoj koncentraciji od 0,5 µM, 2 µL DNA kalupa (10 ng/µL, konačna masa DNA u reakciji 20 ng) i 8 µL sterilne vode bez nukleaza. Uvjeti reakcije bili su sljedeći: početna denaturacija pri 98°C tijekom 30 s, nakon čega je uslijedilo 35 ciklusa amplifikacije pri 98°C tijekom 7 s, 58°C tijekom 30 s i 72 °C tijekom 30 s, s konačnom elongacijom od 2 min pri 72°C (T100 termalni cikler, Biorad, SAD). Amplikoni su vizualizirani elektroforezom na agaroznom gelu (2,0%). Triplikati su ujedinjeni u jedan uzorak i pročišćeni iz agaroznog gela korištenjem Wizzard SV Gel i PCR clean sustava (Promega, SAD) prema uputama proizvođača. Nakon pročišćavanja, uslijedila je kvantifikacija DS-11 spektrofotometrom (Denovix, SAD). Pripremu knjižnice i sekvenciranje amplikona uparenih krajeva (2×250 bp) na Illumina MiSeq-u izvršio je „*The Genomics Core Facility Universitat Pompeu Fabra*“, Barcelona, Španjolska.

2.4.5. Bioinformatika, izračun raznolikosti AAF i statistička analiza

Ukupno je dobiveno 7823083 sirovih sekvenci nakon sekvenciranja na Illumina Miseq uređaju. Kvaliteta sirovih „*forward*” i „*reverse*” sekvenci ispitana je pomoću programa FastQC v0.11.9. Nakon uklanjanja adaptera i barkodova, početnice su odstranjene pomoću programa cutadapt v4.1 (Martin, 2011). Daljnja obrada podataka provedena je u R statističkom softveru v4.2.2 pomoću paketa dada2 v1.16.0 (Callahan *i sur.*, 2016). Ukratko, funkcijom *filterandTrim* (postavke parametara: „*truncLen = c(200, 200), maxN = 0, maxEE = c(2, 2), truncQ = 2, rm.phix = TRUE*“) uklonjene su sekvence i rubovi sekvenci prosječne kvalitete $Q < 30$. Nakon provedbe *dada* algoritma, preklapljeni su upareni krajevi sekvenci te je kreirana tablica varijanti sekvenci amplikona (ASV). Funkcija *removeBimeraDenovo* s „*pooled*” metodom korištena je za uklanjanje kimera, koje su činile ukupno 5,8% spojenih sekvenci. Metoda naivnog Bayesovog klasifikatora (Wang *i sur.*, 2007) korištena je za dodjelu taksonomije funkcijom *assignTaxonomy*. Identifikacija je napravljena na temelju do danas najpotpunije taksonomske baze podataka za AAF zajednicu koja je nastala kao rezultat dugogodišnjih znanstveno-istraživačkih napora, a koja sadrži 3363 *pufM* sekvenci i njihovu taksonomiju (Villena-Alemaný *i sur.*, 2023b).

Zbog visokog udjela neklasificiranih sekvenci na razini roda (čak i 50% u nekim uzorcima) nakon *dada* taksonomske anotacije, dodatno je provedena filogenetska analiza neklasificiranih ASV-ova. ASV-ovi koji su pokazali loše poravnanje sa sekvencama iz baze (engl. *alignment*) uklonjeni su iz daljnje analize (Villena-Alemaný *i sur.*, 2023b). Sekvence

proteina poravnate su pomoću programa MAFFT v7.453 (parametri: -- *maxiterate 1000 – localpair*) (Kato & Standley, 2013). Stablo maksimalne vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood tree*) napravljeno je korištenjem programa IQ-TREE 2 (Minh *i sur.*, 2020), s uključenim automatskim odabirom modela uz pomoć programa ModelFinder (Kalyaanamoorthy *i sur.*, 2017) i 1000 iteracija ultrabrzog *bootstrapping* ponovnog uzorkovanja sa zamjenom s 1000 ciklusa SH-aLRT testiranja (parametri: *-alrt 1000 -B 1000*) (Hoang *i sur.*, 2018). Konačna poravnanja *pufM* nukleotida dobivena su povratnim prevođenjem poravnanja proteina pomoću programa trimAl (Capella-Gutiérrez *i sur.*, 2009). *The Evolutionary Placement* algoritam v0.3.5 (Barbera *i sur.*, 2019) korišten je za postavljanje ASV-ova u filogenetsko stablo, a program Gappa (Czech *i sur.*, 2020) za taksonomsku dodjelu ASV-a prema njihovom položaju u *pufM* filogenetskom stablu s pragom konsenzusa višim od 50%. Ovako dobivena taksonomska dodjela ASV-ova korištena je kao taksonomska matrica za daljnju analizu.

Nakon ujedinjavanja podataka o taksonomskom statusu, značajki uzoraka i matrice brojnosti svih ASV-ova pomoću R paketa phyloseq v1.32.0, rijetki ASV-ovi koji su se pojavili manje od 2 puta u najmanje 5% uzoraka kao i uzorci s neprihvatljivo niskim ukupnim brojem sekvenci ($N < 2000$) isključeni su iz daljnje analize (McMurdie & Holmes, 2013). Konačno, bioinformatička analiza rezultirala je sa 661 jedinstvenim ASV-om u 81 uzorku (medijan 58227, minimum 2039, maksimum 325210).

Relativni udjeli određenog taksona na razini razreda, reda i roda u uzorcima su grafički prikazani korištenjem R paketa ggplot2 v3.3.5 (Wickham, 2016).

Kao što je već spomenuto, budući da se smatra kako su podatci dobiveni sekvenciranjem zajednice mikrobioma kompozicijske prirode (Gloor *i sur.*, 2017; Sisk-Hackworth & Kelley, 2020), provedena je transformacija centriranog logaritamskog omjera (clr, engl. *centered log-ratio*) računanjem logaritma omjera svake vrijednosti i geometrijskog srednjaka svih očitanja za taj uzorak (Aitchison *i sur.*, 2000) prema formuli navedenoj u poglavlju 2.2.4. Transformacija je napravljena korištenjem funkcije *transform* R paketa microbiome v1.10.0 s prethodno uvedenim pseudobrojevima (minimalna relativna brojnost podijeljena s dva) umjesto nula u ASV matrici (Lahti *i sur.*, 2017).

Kako bi se odredilo postoje li statistički značajne razlike u prostorno-vremenskim obrascima AAF zajednice, provedena je permutacijska multivarijantna analiza varijance (PERMANOVA) (Anderson, 2017). PERMANOVA je napravljena na Aitchisonovim udaljenostima korištenjem programa PRIMER7 sa „sezonom” i „regijom” kao fiksnim faktorima te „slojem” [definiranim kao L1 (0-30 m), L2 (31-50 m), L3 (51-75 m) i L4 (76-100

m)] kao faktorom smještenim (engl. *nested*) unutar „regije” (postavke: „9999 permutations, sums of squares type: Type II (conditional), permutation method: Unrestricted permutation of raw data”) (Clarke & Gorley, 2015; Anderson, 2017). PCA na Aitchisonovim udaljenostima generirana je na temelju clr-transformiranih vrijednosti na razini roda sa zamjenom nula pseudo-vrijednostima pomoću R paketa *microViz* v0.10. Na istom skupu podataka proveden je i PERMDISP test (9999 permutacija, odstupanja od centroida) (Anderson, 2006).

Podatci o apsolutnoj brojnosti AAF te udjeli specifičnih bakterijskih grupa dobiveni IC-FISH metodom transformirani su kvadratnim korijenom. Stvoren je ordinacijski dijagram nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja (nMDS, engl. *non-metric multidimensional scaling*) temeljen na Bray-Curtisovim udaljenostima transformiranih podataka kako bi se vizualizirale sezonalne razlike u udjelima IC-FISH grupa. PERMANOVA je korištena za testiranje značajnosti uočenih razlika (postavke: „9999 permutations, sums of squares type: Type II (conditional), permutation method: Unrestricted permutation of raw data”) te PERMDISP test za homogenost multivarijatnih varijanci (9999 permutacija, odstupanja od centroida).

Umjetna neuronska mreža odnosno *neural gas* (NG) algoritam nenadziranog strojnog učenja napravljen je na clr-transformiranom skupu *pufM* podataka za procjenu karakterističnih AAF obrazaca povezanih s određenim biotičkim i abiotičkim čimbenicima okoliša (Martinetz *i sur.*, 1993). Dva NG modela napravljena su na dva odvojena clr-transformirana skupa *pufM* podataka: jedan je proveden na skupu podataka *pufM* sekvenci aglomeriranih na razinu reda (engl. *order*) te potom clr-transformiranih, a drugi na skupu podataka aglomeriranih na razinu roda (engl. *genus*) te clr-transformiranih. Ovi su podatci korišteni za kvantificiranje prostora podataka za stvaranje „jedinica najboljeg podudaranja” (BMU, engl. *best match units*). Oba NG modela inicijalizirana su postavljanjem broja epoha treniranja (engl. *training epochs*) na 1000, početne veličine koraka 0,5 (engl. *initial step size*) i početne konstante opadanja 4,5 (engl. *initial decay constant*) u SOM Toolbox v2.0 za MATLAB (E. Alhoniemi, J. Himberg, J. Parhankangas, & J. Vesanto, Helsinki University of Technology, Finland: <http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox>). Za oba modela, biotički i abiotički ekološki čimbenici izračunati su kao prosječne vrijednosti za određeni BMU prostor. Zbog sličnijih taksonomskih razina, za NG model temeljen na redovima dodatno su izračunati srednjaci IC-FISH vrijednosti, a za NG model temeljen na rodovima izračunati su i prosjeci mjera alfa raznolikosti (broj ASV-ova te Shannonovi i Pielouovi indeksi raznolikosti).

Za potrebe procjene alfa raznolikosti (izračuna indeksa bioraznolikosti), napravljena je rarefakcija podataka budući da su veličine knjižnica bile značajno različite, dok je prethodno

opisan kompozicijski pristup analizi podataka korišten za utvrđivanje statističke značajnosti i izgradnju NG modela na *pufM* skupu podataka, kao što je predloženo u literaturi (Gloor *i sur.*, 2017). Rarefakcija na veličinu najmanjeg broja sekvenci po uzorku napravljena je korištenjem funkcije *rarefy_even_depth* iz R paketa *phyloseq* ponavljanim poduzorkovanjem (prag rarefakcije=2000, broj ponavljanja poduzorkovanja=100). Iz ponavljanih poduzorkovanja pomoću R paketa *vegan* v2.5.7, izračunat je srednjak broja ASV-ova, Shannonov (H') i Pielouov (J') indeks raznolikosti (Oksanen *i sur.*, 2020).

2.5. Dostupnost podataka

Sve sirove sekvence zajedno s metapodacima o uzorcima su pohranjeni u NCBI SRA (Sequence Read Archive) bazi podataka i javno su dostupne pod brojem BioProject PRJNA912619.

Rezultati sekvenciranja 16S rRNA gena uzoraka vezanih za usporedbu različitih metoda DNA izolacije su dostupni pod pristupnim brojevima: SAMN32769568-SAMN32769624. Rezultati sekvenciranja 16S rRNA gena okolišnih uzoraka prikupljeni jednogodišnjim terenskim istraživanjem su dostupni pod pristupnim brojevima SAMN32245823-SAMN32245911, a rezultati sekvenciranja *pufM* gena okolišnih uzoraka su dostupni pod pristupnim brojevima: SAMN37596707-SAMN37596796.

3. REZULTATI

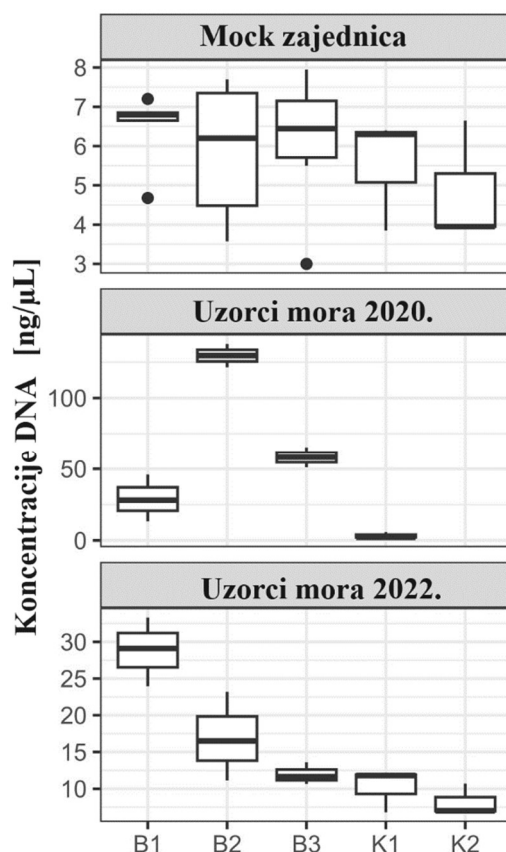
3.1. Procjena metoda izolacije DNA na uzorcima „mock“ zajednice

Pet protokola izolacije DNA (tri temeljena na biokemijskoj lizi stanica: B1, B2, B3 te dva temeljena na kitu: K1, K2) i izravna PCR amplifikacija (P) testirani su na uzorcima „mock“ zajednice sastavljene od istih omjera devet morskih bakterijskih vrsta koje potječu iz čistih akseničnih i neakseničnih kultura: *Synechococcus sp.*, *Roseovarius tolerans*, *Flavobacteriaceae*, *Bacillus sp.*, *Pseudoalteromonas undina*, *Microbacterium sp.*, *Vibrio sp.*, *Erythrobacter sp.* i *Glaciecola sp.*

3.1.1. Prinosi DNA i rezultati izravnog PCR-a na uzorcima „mock“ zajednice

Sve metode izolacije evaluirane u ovom istraživanju rezultirale su s DNA koja se mogla spektrofotometrijski kvantificirati. Svi su uzorci imali prihvatljivu čistoću DNA nužnu za uspješne PCR amplifikacije. Elektroforeza u agaroznom gelu ukupne izolirane genomske DNA pokazala je da je izolirana DNA dobivena protokolima B1, B2 i B3 cjelovita i visoke molekularne težine, dok je razmaz (engl. *smear*) primijećen za DNA dobivenu protokolima K1 i K2 (podatci nisu prikazani).

Nisu zabilježene statistički značajne razlike u prinosu DNA između pet različitih metoda izolacije ispitivanih na „mock“ zajednici (Kruskal-Wallisov test, hi-kvadrat = 2,9889, df = 4, p-vrijednost = 0,5597). Općenito, najniži prinosi primijećeni su za metode K1 i K2, temeljene na DNeasy PowerWater Kitu s tendencijom povećanja prinosa za metode B1, B2 i B3 (Slika 3.1, Tablica 3.1). Na temelju niza opaženih vrijednosti, B1 protokol pokazao je najveću ujednačenost u pogledu dobivenog prinosa DNA, dok je najveća varijacija među uzorcima uočena za metodu B2 (Slika 3.1).



Slika 3.1. Prinos (koncentracija, ng/μL) nakon izolacija DNA različitim metodama iz uzoraka „mock” zajednice i mora prikupljenih 2020. i 2022. godine. B1: standardna fenol/kloroform/izoamil izolacija, B2 i B3: izopropanol i etanol precipitacija, K1: DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), K2: modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN). Metoda K2 nije testirana na uzorcima prikupljenima 2020. godine.

Čistoće izoliranih DNA, omjeri apsorbancija A260/A280 bili su općenito viši (> 1,8), odnosno niži za omjer A260/A230 (< 2,0) nego što je uobičajeno prihvatljivo za uspješnu PCR amplifikaciju (Tablica 3.1). Unatoč navedenom, svi uzorci rezultirali su uspješnim umnažanjem 16S rRNA gena.

Što se tiče izravnog PCR-a (P), iako je za amplifikaciju 16S rRNA gena korišten samo 1 μL pufera za lizu koji je sadržavao DNA kalup od interesa, sve reakcije napravljene u triplikatu za svaku tehničku repliku bile su uspješne i optimizacija reakcija nije bila potrebna.

Tablica 3.1. Koncentracije DNA (ng/ μ L) po uzorku s prikazanim prosječnim vrijednostima i standardnom devijacijom za svaku metodu izolacije te omjeri apsorbancija A260/280 i A260/230. B1: standardna fenol/kloroform/izoamil izolacija, B2 i B3: izopropanol i etanol precipitacija, K1: DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), K2: modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN). Završni volumen elucije/ispiranja bio je identičan za sve metode i iznosio je 35 μ L.

ID uzorka	Metoda izolacije	Koncentracije DNA (ng/ μ L)	Prosječna koncentracija DNA po metodi (ng/ μ L)	Standardna devijacija	A260/280	A260/230
UZORCI „MOCK” ZAJEDNICE						
1-16S	K2	3,95	4,85	1,56	2,1	0,121
2-16S	K2	6,65			3,4	0,05
3-16S	K2	3,95			2,3	0,13
4-16S	K1	3,85	5,52	1,44	2,3	0,21
5-16S	K1	6,4			2,6	0,07
6-16S	K1	6,3			2,571	0,062
8-16S	B1	7,2	6,44	1,00	4,1	0,08
9-16S	B1	6,85			3,4	0,11
10-16S	B1	6,65			3,8	0,1
11-16S	B1	6,8			2,9	0,11
23-16S	B1	4,678			3,13	0,17
12-16S	B2	6,9	5,89	1,76	3,26	0,08
13-16S	B2	7,5			2,52	0,127
14-16S	B2	5,5			1,9	0,144
15-16S	B2	7,7			3,6	0,44
24-16S	B2	4,146			3,06	0,172
25-16S	B2	3,573			3,9	0,104
16-16S	B3	7,95	6,12	1,74	3,7	0,096
17-16S	B3	7,35			3,1	0,23
18-16S	B3	6,55			2,65	0,18
19-16S	B3	5,5			3,01	0,47
26-16S	B3	6,34			2,91	0,26
27-16S	B3	3			2,71	0,31
UZORCI MORA IZ 2022. GODINE						
29-16S	K1	6,8	10,22	2,96	1,789	0,925
30-16S	K1	12,05			2,042	0,115

31-16S	K1	11,8			1,86	0,268
32-16S	K2	6,9	8,20	2,17	1,76	0,715
33-16S	K2	7			1,8	0,296
34-16S	K2	10,7			1,981	0,169
35-16S	B1	23,95	28,78	4,68	1,988	2,325
36-16S	B1	29,1			1,914	1,83
37-16S	B1	33,3			1,947	1,903
38-16S	B2	23,2	16,95	6,04	1,617	1,805
39-16S	B2	16,5			1,634	1,976
40-16S	B2	11,15			1,828	0,746
41-16S	B3	11,642	11,96	1,50	1,642	1,705
42-16S	B3	13,6			1,732	1,609
43-16S	B3	10,65			1,7	1,127
UZORCI MORA IZ 2020. GODINE						
1	B1	13,300	29,12	16,38	1,834	2,031
2	B1	46,000			2,135	2,7
3	B1	28,050			1,962	2,892
4	B3	51,05	58,20	10,11	2	2
5	B2	121,5	129,63	11,49	2	2,6
6	B3	65,35			2	1,9
7	B2	137,75			2	2,3
8	K1	5,85	3,38	2,14	3,9	0,047
9	K1	2,1			1,7	0,3
10	K1	2,2			1,9	0,173

3.1.2. Rezultati sekvenciranja amplikona V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena

Najveći srednji broj sekvenci dobiven sekvenciranjem na MiSeq Illumina uređaju s najvećom varijabilnošću među uzorcima zabilježen je za metodu P ($177142,33 \pm SD 225884,66$), a slijedile su metode K1 i K2 ($132469 \pm SD 95090,78$, odnosno $114855,67 \pm SD 29117,05$). Prosječan broj sekvenci za metode B2 i B3 iznosio je $43789 \pm SD 37704,48$, odnosno $82594,50 \pm SD 104216,49$. Najniže srednje vrijednosti dobivenih sekvenci zabilježene su za metodu B1 (srednja vrijednost $5063,80 \pm SD 4599$), gdje je jedan uzorak odbačen iz daljnjih analiza jer je broj sekvenci bio neprihvatljivo malen (348) (Prilog S2).

3.1.3. Sastav „mock“ zajednice

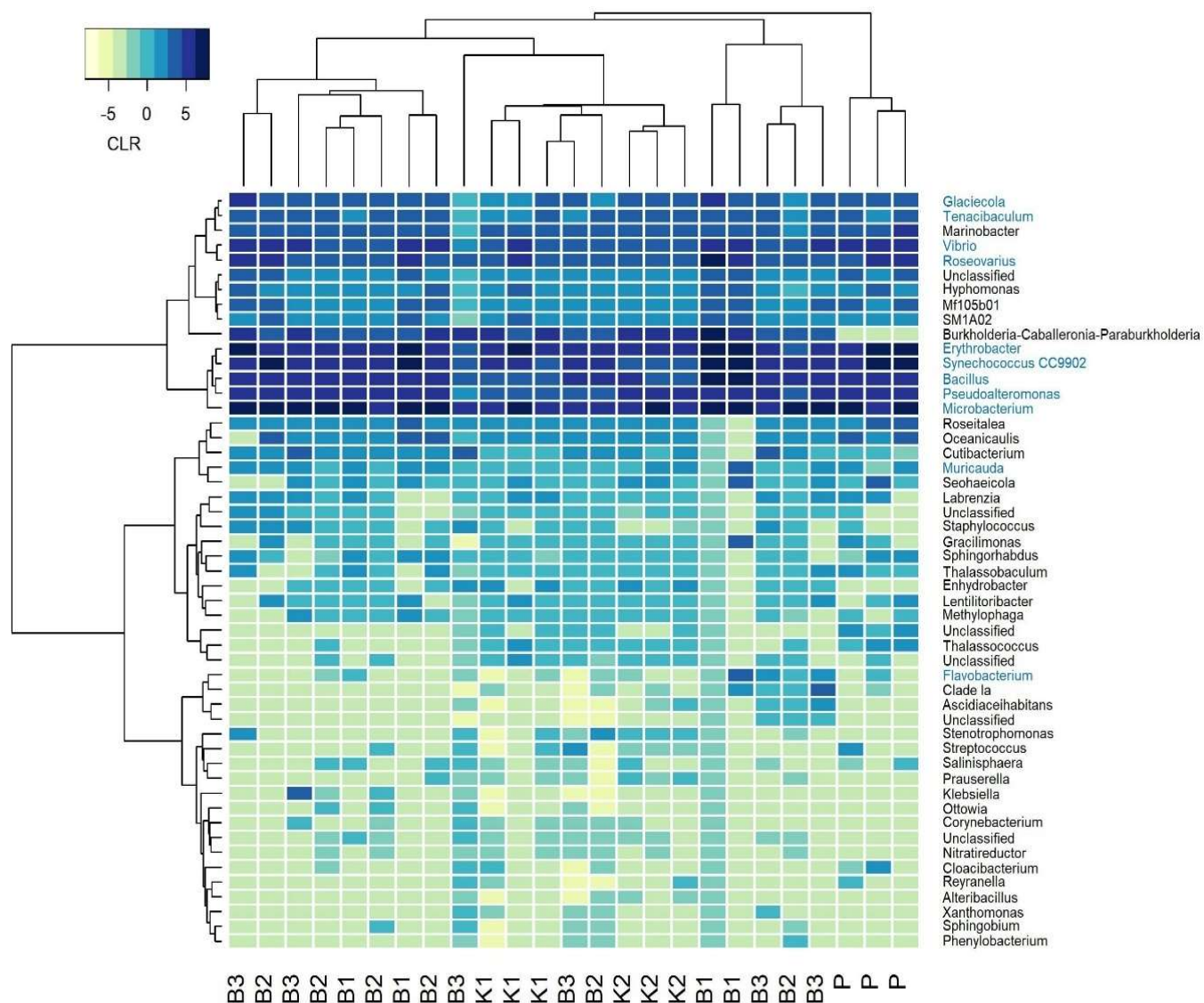
U svim uzorcima (sve metode izolacije DNA i izravni PCR) umjetno stvorene „mock“ zajednice točno definiranog kvalitativnog i kvantitativnog sastava, uspješno su zabilježeni svi dodani prokarioti na razini roda. Međutim, otkriveni su i brojni drugi neciljani odnosno kontaminantni taksoni specifični za svaku metodologiju (Slika 3.2).

Bioinformatička obrada podataka rezultirala je završnim brojem od ukupno 670 ASV-ova, od kojih je 140 imalo taksonomsku anotaciju ciljanih „mock“ taksona. Kako bi se ispitali odnosi između ciljanih i neciljanih taksona odnosno ASV-ova, nakon filtriranja rijetkih ASV-ova daljnje su analize primijenjene na dva skupa podataka:

1) prvi podskup uključivao je isključivo dodane „mock“ taksone aglomerirane na razinu obitelji, naziva „core mock“ (N = 9)

2) kompletan skup podataka aglomeriran na razinu roda (N = 52).

Potrebno je naglasiti da podskup podataka filtriran samo za „mock“ taksone predstavlja tek dio cjelokupnog seta podataka, što bi potencijalno moglo unijeti nedosljednosti u kompozicijskoj analizi (Gloor *i sur.*, 2017), no navedeni podskup predstavlja glavne, ciljane taksone koje je bilo potrebno proučiti izolirano od ostalih.



Slika 3.2. Prikaz sastava ukupne „mock“ zajednice na razini roda putem toplinske karte. Hijerarhijsko klasteriranje je napravljeno na Aitchisonovim udaljenostima, a dendrogram Ward. D2 metodom aglomeracije. Dodani pripadnici „mock“ zajednice označeni su plavom bojom. B1: standardna fenol/kloroform/izoamil izolacija, B2 i B3: izopropanol i etanol precipitacija, K1: DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), K2: modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), P: izravni PCR, Platinum Universal Master Mix (Invitrogen).

Aglomeracija podataka na razinu obitelji bila je neophodna za prikaz svih dodanih bakterijskih skupina kao jedinstvene cjeline „mock“ zajednice. Iako su pojedinačni bakterijski izolati pomiješani u jednakom teoretskom omjeru od 11,11%, primijećene su značajne razlike u njihovoj relativnoj brojnosti dobivenoj nakon sekvenciranja. Brojnosti su slično odstupale za sve metode (Slika 3.3 A).

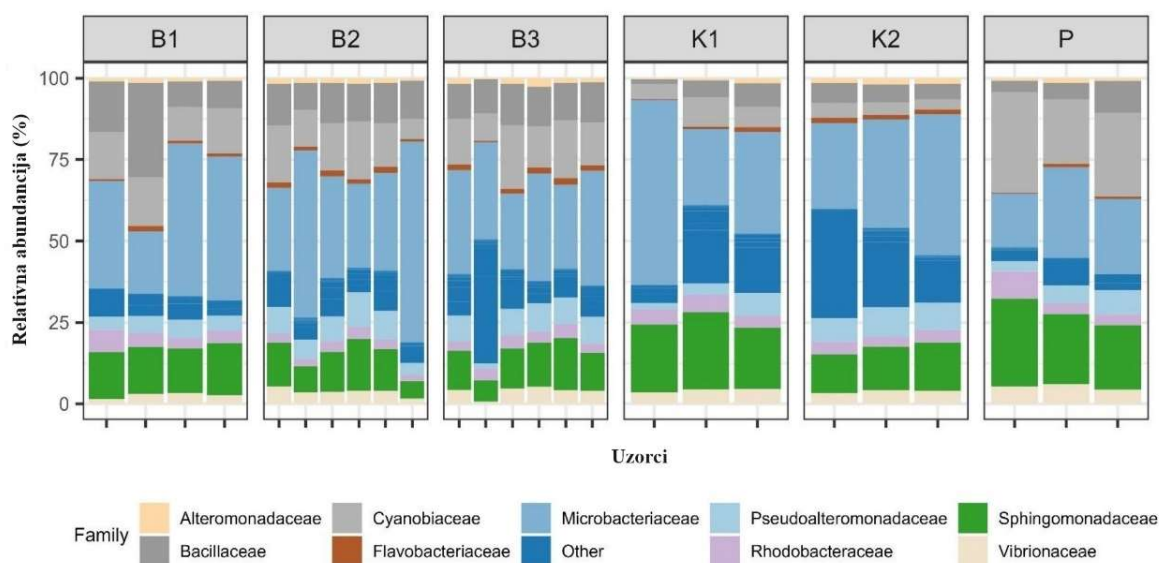
Relativni udio ostalih/neciljanih taksona kretao se od 4 do 38% po uzorku, s najmanjim prosječnim doprinosom zabilježenim za izravni PCR (5,9%), a najvećim prosječnim doprinosom za metodu K2 temeljenu na kitu (24,2%).

Općenito, relativne brojnosti bakterije *Microbacterium sp.* bile su najviše u svim ispitivanim metodama, dominirajući sastavom „mock“ zajednice s prosječnom relativnom brojnošću od 33,13%. *Erythrobacter* i *Synechococcus* bili su tek neznatno prezastupljeni. *Bacillus* je bio neznatno prezastupljen u metodi B1 i podzastupljen u metodama K1, K2 i P. *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Roseovarius* i *Glaciecola* bili su podzastupljeni u svim metodama izolacije i izravnom PCR-u (Slika 3.3 A). *Flavobacteriaceae* su bile najslabije zastupljene u svim uzorcima za sve metode.

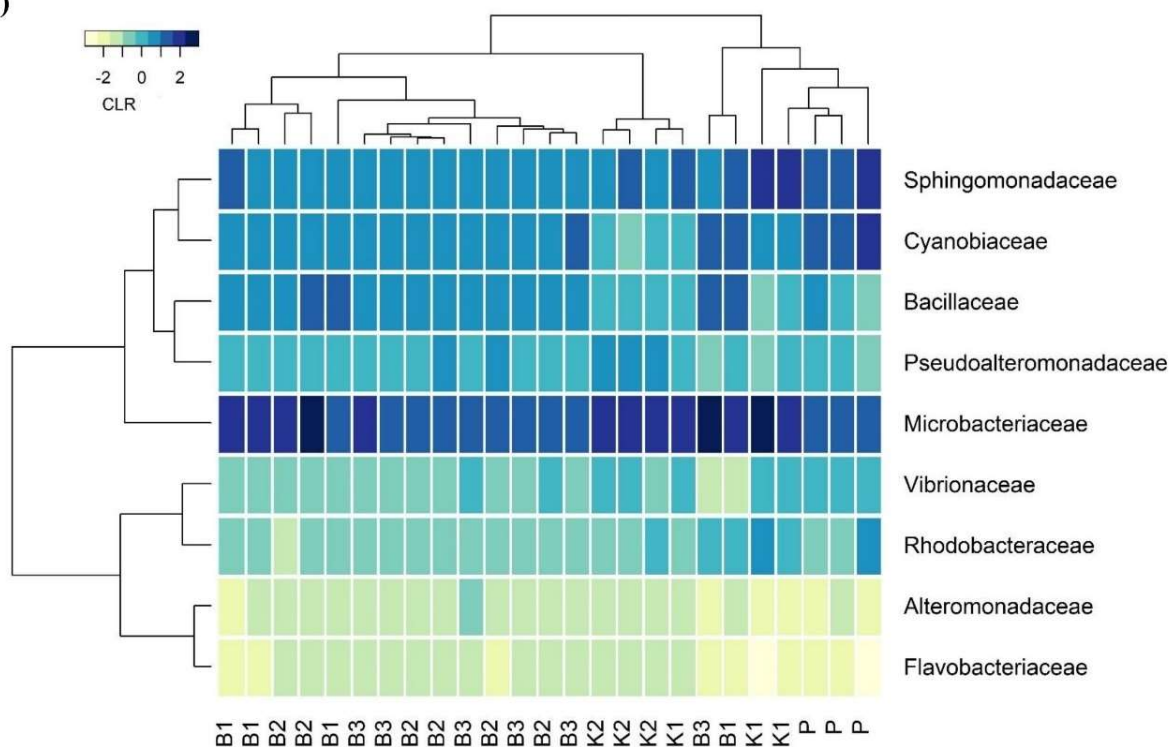
U proučavanju sastava samo „mock“ taksona aglomeriranih na razinu obitelji, uočeni su slični obrasci (Slika 3.3 B), gdje je *Microbacterium sp.* (obitelj Microbacteriaceae) dominirao zajednicom, a pripadnici obitelji *Flavobacteriaceae* su bili najmanje zastupljeni.

Hijerarhijsko klasteriranje uzoraka po metodi izolacije DNA pokazalo je grupiranje biokemijskih B1/B2/B3 metoda, ali ne u zasebni i jedinstveni klaster. Dva uzorka metoda B1 i B3 jasno su odvojena od ostatka. Metoda K2 (modificirani PowerWater Kit) izdvojena je kao jedinstvena grupa zajedno s jednim K1 uzorkom. Izravni PCR (P) smješten je u vlastitu jedinstvenu skupinu (Slika 3.3 B).

(A)



(B)



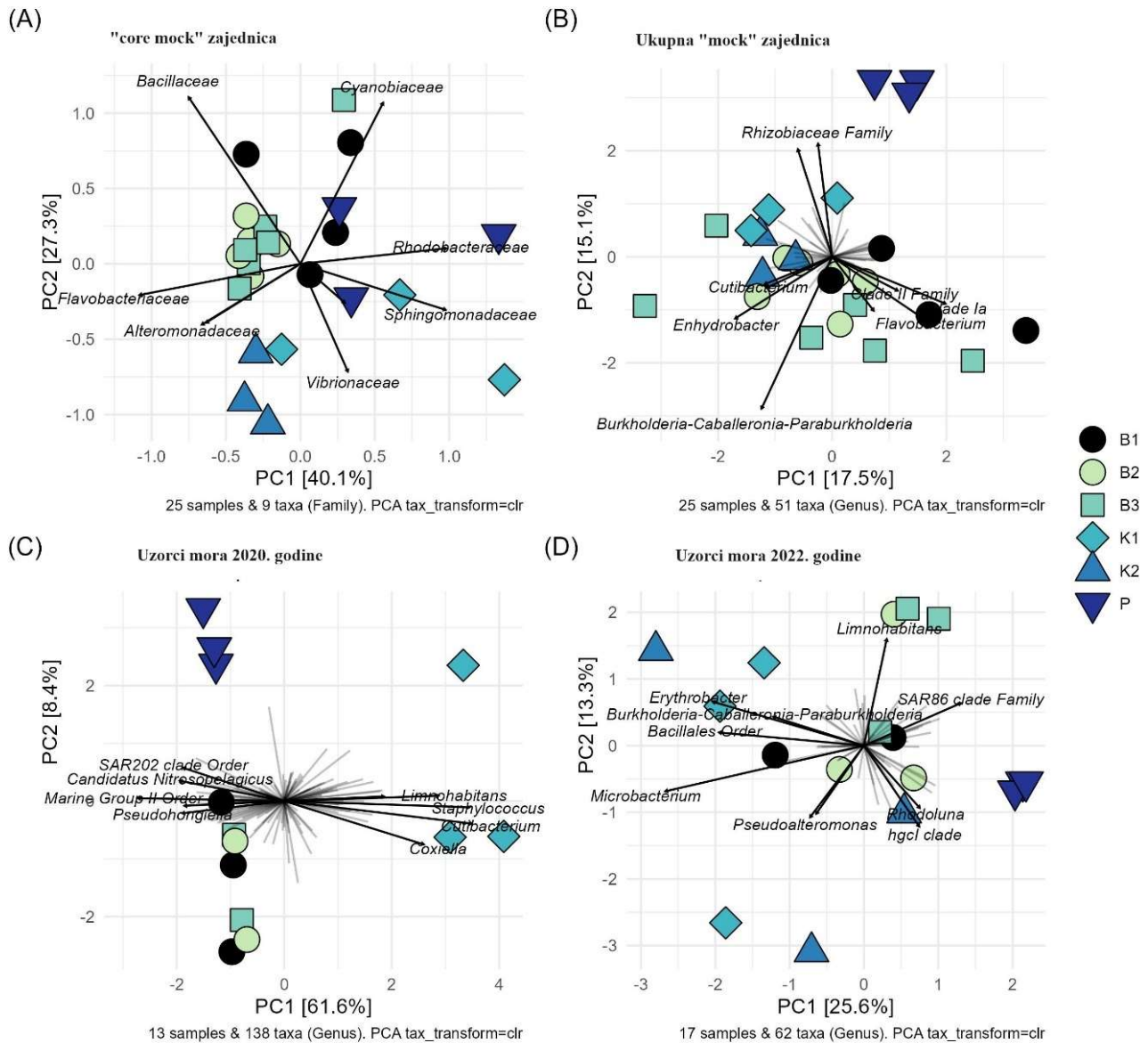
Slika 3.3. A) Stupčasti dijagrami prikaza relativnih brojnosti članova „mock“ zajednice na razini obitelji, gdje kategorija „Other“ predstavlja neciljane taksone. B) Prikaz sastava „core mock“ zajednice na razini obitelji putem toplinske karte. Hijerarhijsko klasteriranje je napravljeno na Aitchisonovim udaljenostima, a dendrogram Ward. D2 metodom aglomeracije. B1: standardna fenol/kloroform/izoamil izolacija, B2 i B3: izopropanol i etanol precipitacija, K1: DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), K2: modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), P: izravni PCR, Platinum Universal Master Mix (Invitrogen).

Grupiranje među metodama nije bilo izravno uočljivo nakon PCA analize podataka za ciljane „mock“ taksone aglomerirane na razinu obitelji (Slika 3.4 A). Uzorci izolirani metodom K2 grupirani su zajedno, dok je uočena veća varijabilnost uzoraka B1 metode. Uzorci izolirani metodama B2 i B3 općenito su grupirani zajedno, s izuzetkom jednog B3 uzorka. Statističke značajnosti usporedbi sastava zajednica između ispitivanih metoda određene su pomoću PERMANOVE i prikazane su u Tablici 3.2. Općenito, razlike uočene u metodama izolacije/izravnog PCR-u u „core mock“ zajednici bile su statistički značajne (Pseudo-F= 4,2468, p= 0,0001). Uzimajući u obzir i kontaminantne taksone aglomerirane na razini roda, P (izravni PCR) se odvojio u većoj mjeri od ostalih metoda, dok su uzorci izolirani metodom K2 zadržali svoj blisko-grupirani položaj blizu uzoraka izoliranih metodom K1 (Slika 3.4 B). B1-B3 protokoli temeljeni na biokemijskoj lizi stanica pokazali su veću varijabilnost. Kao i s „core mock“ zajednicom, rezultati PERMANOVE pokazali su da postoji statistički značajna razlika u ukupnom sastavu „mock“ zajednice između ispitivanih eksperimentalnih pristupa (F= 1,9394, p=0,0002).

Ono što je uočeno na oba skupa podataka jest da nema razlike između metoda temeljenih na taloženju izopropanolom i etanolom (između B2 odnosno B3) u odnosu na standardnu metodu izolacije korištenjem fenol/kloroform/izoamil alkohola (B1 naspram B2/B3). Suprotno biokemijskim metodama, one temeljene na kitu te izravnom PCR-u značajno su se međusobno razlikovale (Tablica 3.2).

Prikaz rezultata PCA analize u obliku biplota sugerira da je glavni takson odgovoran za razdvajanje biokemijskih metoda B1/B2/B3 upravo *Bacillus*, uz značajan doprinos kontaminantnih taksona. Na primjer, *Burkholderia–Caballeronia–Paraburkholderia* nije detektirana metodom P (izravni PCR), što je dovelo do značajnog odvajanja P uzoraka od ostalih (Slika 3.4 B). Navedeno bi moglo upućivati na prednost kraćeg vremena rukovanja uzorcima u laboratoriju. Metoda izravnog PCR-a traje svega 2 sata što je značajno kraće od protokola temeljenih na biokemijskoj lizi stanica koji traju i do dva dana te obuhvaćaju brojne korake manipulacije uzorcima.

Neciljana bakterija *Burkholderia–Caballeronia–Paraburkholderia* nije unesena u uzorke upotrebom neakseničnih kultura jer se ne pojavljuje u rezultatima izravnog PCR-a, dok se svi dodani pripadnici „mock“ zajednice pojavljuju.



Slika 3.4. Biplot prikaz rezultata analize glavnih komponenti (PCA, engl. *principal component analysis*) na Aitchisonovim udaljenostima. Najdulje linije vektora predstavljaju najznačajnije taksone koji uzrokuju grupiranja među uzorcima. A) „core mock” zajednica aglomerirana na razinu obitelji (isključivo ciljani taksoni); B) ukupna „mock” zajednica aglomerirana na razinu roda (cijeli skup podataka); C) Okolišni uzorci mora prikupljeni 2020. godine aglomerirani na razinu roda poslije uklanjanja rijetkih ASV-ova; D) Okolišni uzorci mora prikupljeni 2022. godine aglomerirani na razinu roda poslije uklanjanja rijetkih ASV-ova. Metode su prikazane određenim znakom i bojom B1: standardna fenol/kloroform/izoamil izolacija, B2 i B3: izopropanol i etanol precipitacija, K1: DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), K2: modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), P: izravni PCR, Platinum Universal Master Mix (Invitrogen).

Tablica 3.2. Rezultati permutacijske multivarijatne analize varijance (PERMANOVA) na temelju Aitchisonovih udaljenosti. Uspoređeni su sastavi „mock“ zajednice i okolišnih uzoraka između pet različitih metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a. B1: standardna fenol/kloroform/izoamil izolacija, B2 i B3: izopropanol i etanol precipitacija, K1: DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), K2: modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), P: izravni PCR, Platinum Universal Master Mix (Invitrogen). Zvezdicom su označene p-vrijednosti < 0,05.

PERMANOVA („core mock”, razina obitelji)							
Usporedba	Izvor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Jedinstvene permutacije
	Metoda	5	20,094	4,0188	4,2468	0,0001*	9906
(B2)v(B3)	C1	1	0,43299	0,43299	0,54087	0,6746	462
(B1)v(B2,B3)	C2	1	1,7692	1,7692	2,1648	0,0761	1805
(P)v(B1,B2,B3)	C3	1	6,2517	6,2517	6,6859	0,0023*	968
(K1,K2)v(B1,B2,B3)	C4	1	8,1637	8,1637	7,6503	0,0003*	9298
(K1,K2)v(P)	C5	1	5,8656	5,8656	3,796	0,0597	84
	Res	19	17,98	0,94632			
	Total	24	38,074				

PERMANOVA (filtrirana „mock” zajednica, razina roda)							
Usporedba	Izvor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Jedinstvene permutacije
	Metoda	5	892,05	178,41	1,9394	0,0002*	9830
(B2)v(B3)	C1	1	79,668	79,668	0,73504	0,7629	462
(B1)v(B2,B3)	C2	1	168,98	168,98	1,5807	0,0784	1806
(P)v(B1,B2,B3)	C3	1	354,91	354,91	3,3088	0,0008*	966
(K1,K2)v(B1,B2,B3)	C4	1	231,75	231,75	2,4391	0,0025*	9225
(K1,K2)v(P)	C5	1	300,04	300,04	5,3484	0,0116*	84
	Res	19	1747,9	91,994			
	Total	24	2639,9				

PERMANOVA (uzorci mora 2020. godine, razina roda)							
Usporedba	Izvor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Jedinstvene permutacije
	Metoda	4	1763,4	440,84	5,4558	0,0002*	9810
(B1)v(B2,B3)	C1	1	92,178	92,178	1,7869	0,0262*	35
(P)v(B1,B2,B3)	C2	1	183,91	183,91	3,1913	0,0077*	120
(K1)v(B1,B2,B3)	C3	1	1270,8	1270,8	15,355	0,0073*	120
	Res	8	646,42	80,802			
	Total	12	2409,8				

PERMANOVA (uzorci mora 2022. godine, razina roda)

Usporedba	Izvor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Jedinstvene permutacije
	Metoda	5	517,79	103,56	1,6437	0,0048*	9835
(B1)v(B2,B3)	C1	1	74,256	74,256	1,2559	0,1442	28
(P)v(B1,B2,B3)	C2	1	144,08	144,08	2,8863	0,0055*	165
(K1,K2)v(B1,B2,B3)	C3	1	144,09	144,09	2,0261	0,0052*	2911
(K1,K2)v(P)	C4	1	236,64	236,64	3,7253	0,0119*	84
	Res	11	693,04	63,004			
	Total	16	1210,8				

3.2. Procjena metoda izolacije DNA na uzorcima iz okoliša

Uz uzorke „mock“ zajednice, različite metode izolacije DNA i izravni PCR uspoređeni su na ukupno 31 okolišnom uzorku mora s dvije različite lokacije i vremenske točke uzorkovanja kako bi se procijenio utjecaj ovih metoda na strukturu prirodne/okolišne bakterijske zajednice. Sve su metode uvijek uspoređivane unutar jednog vremena, odnosno mjesta uzorkovanja.

3.2.1. Prinosi DNA i rezultati izravnog PCR-a na uzorcima iz okoliša

Metoda B2 rezultirala je najvećim prinosom DNA na uzorcima mora prikupljenima u listopadu 2020. godine u Kaštelanskom zaljevu, a slijedile su je metode B3 i B1 (Slika 3.1). Najmanji prinos DNA zabilježen je za metodu K1, međutim, potrebno je naglasiti da su izolacije obavljene korištenjem starijih serija DNeasy PowerWater Kita proizvedenog 2020. godine te da je proizvođač (QIAGEN) zamijenio tadašnju tehnologiju kuglica sa superiornijim keramičkim kuglicama u 2021. godini. Uočene su statistički značajne razlike između metoda izolacije u pogledu prinosa DNA (Kruskal-Wallisov test, hi-kvadrat = 8,4545, df = 3, p-vrijednost = 0,03749). Post-hoc Dunnov test otkrio je značajne razlike između metoda temeljenih na izopropanolu/etanolu i kitu [B2 i K1; B3 i K1, (p < 0,05)]. Metoda K2 nije testirana na uzorcima prikupljenima 2020. godine. Omjeri apsorbancija A260/A280 i A260/A230 bili su zadovoljavajući za daljnju PCR amplifikaciju (Tablica 3.1). Izravna PCR amplifikacija u triplikatima iz PES filtera bila je uspješna za sve uzorke bez prethodne optimizacije reakcije.

Slično „mock“ zajednicama, metoda B1 rezultirala je najvećim prinosom DNA dobivenim iz morskih uzoraka prikupljenih u veljači 2022. godine na plaži Strožanac, a slijedile su metode B2 i B3 (Slika 3.1). Najniži prinosi zabilježeni su opet za metode K1 i K2. Uočene razlike bile su statistički značajne (Kruskal-Wallisov test, hi-kvadrat = 9,8333, df = 4, p-vrijednost = 0,04333). Protokol B3 pokazao je najveću ponovljivost među testiranim metodama. Post-hoc Dunnov test otkrio je značajne razlike između metoda temeljenih na fenolu i kitu [B1 i K1; B1 i K2, (p < 0,05)]. Čistoće DNA izolata, vrijednosti omjera apsorbancija A260/A280 i A260/A230, bile su u rangu s onima potrebnima za uspješnu PCR amplifikaciju (Tablica 3.1).

3.2.2. Rezultati sekvenciranja amplikona V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena

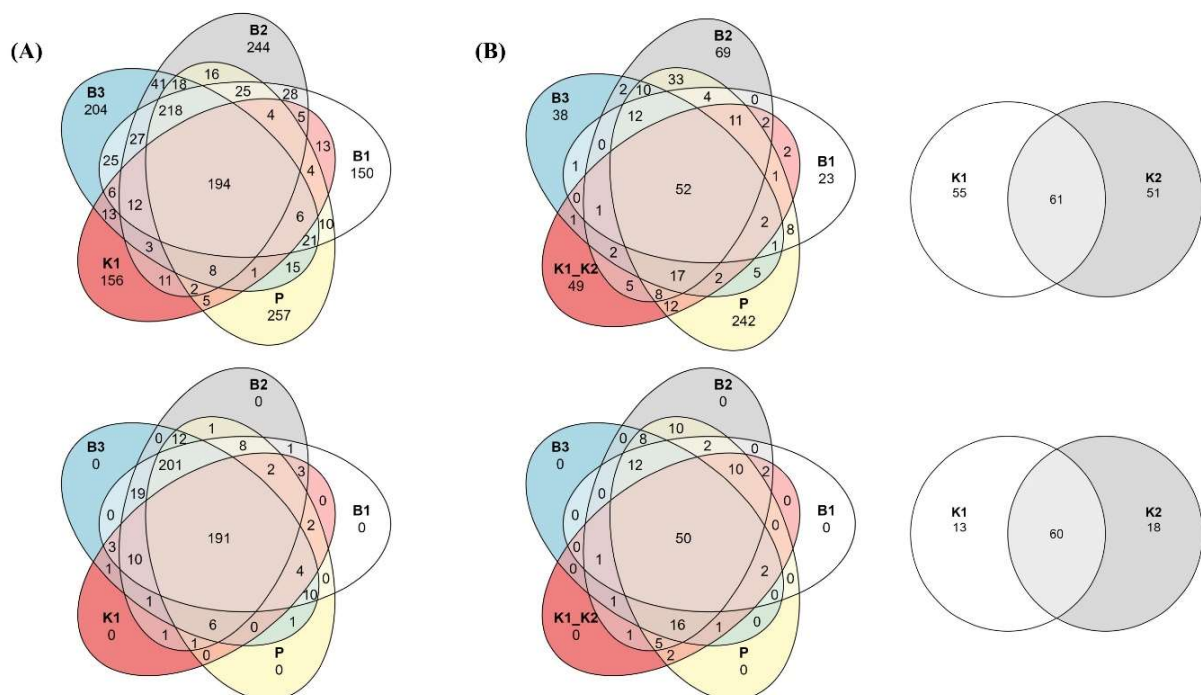
Najveći prosječni broj sekvenci s najvećom promjenjivošću među uzorcima zabilježen je za izravni PCR – metodu P (srednja vrijednost $18512,33 \pm SD 5553,77$) tijekom uzorkovanja u veljači 2022. na plaži Strožanac, a zatim za metode B2 i B3 (srednja vrijednost $6274,33 \pm SD 4093,18$ odnosno srednja vrijednost $3650,33 \pm SD 911,84$). Prosječan broj dobivenih sekvenci za metode K1 i K2 iznosio je $2523,67 \pm SD 215,26$, odnosno $2281,67 \pm SD 929,16$. Najmanja promjenjivost u broju dobivenih sekvenci među uzorcima uočena je za metodu K1. Kao što je prethodno navedeno za uzorke „mock“ zajednice, najniži prosječni broj sekvenci primijećen je za metodu B1 ($2202,67 \pm SD 1794,00$), gdje jedan uzorak nije uspio u postupku sekvenciranja rezultirajući sa samo 285 sirovih sekvenci po uzorku te je izbačen iz daljnjih analiza (Prilog S2). U uzorcima prikupljenima u listopadu 2020. godine u Kaštelanskom zaljevu, najveći prosječni broj sekvenci s najvećom varijabilnošću među uzorcima zabilježen je za metodu B2 ($57452,00 \pm SD 20647,52$), a slijedile su je metode P i B3 (srednja vrijednost $53064 \pm SD 5193,10$ odnosno srednja vrijednost $50457,50 \pm SD 1298,96$). Prosječni broj sekvenci za metodu B1 iznosio je $36855,00$ (SD 19701,89), dok je najmanji prosječni broj zabilježen za metodu K1 ($19769,33 \pm SD 2374,20$) (Prilog S2).

3.2.3. Sastav bakterijske zajednice u uzorcima okoliša

Rekonstruirana su ukupno 1742 ASV-a za uzorke prikupljene 2020. godine u Kaštelanskom zaljevu, od kojih je 478 zadržano nakon filtriranja rijetkih ASV-ova i aglomerirano u 139 jedinstvenih rodova.

Za uzorke prikupljene 2022. godine na plaži Strožanac, rekonstruirano je ukupno 650 ASV-ova, a 123 su zadržana nakon uklanjanja rijetkih ASV-ova, aglomeriranih u 62 jedinstvena roda.

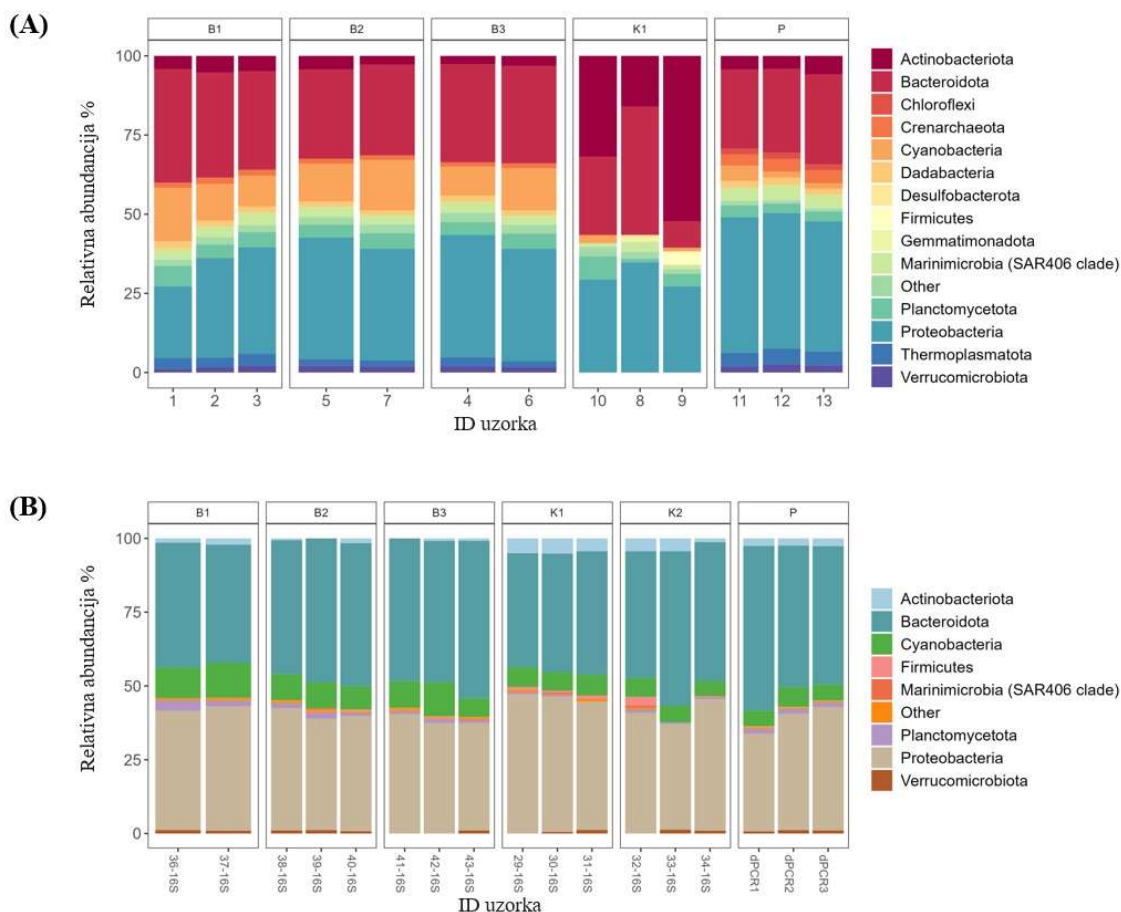
Kako bi se proučio učinak uklanjanja odnosno filtriranja rijetkih ASV-ova iz podataka na sličnosti i razlike u zabilježenim ASV-ovima između različitih metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a, korišteni su Vennovi dijagrami. Iako je broj zabilježenih ASV-ova direktno povezan s dubinom sekvenciranja uzoraka koja nije bila uniformna, usporedba ukazuje na to da filtriranjem dobivamo reprezentativnije rezultate zbog uklanjanja rijetkih ASV-ova koji su najvjerojatnije rezultat pogreške sekvenciranja. Broj ASV-ova zajednički svim metodama iznosio je 194 za nefiltrirane, odnosno 191 za filtrirane podatke za 2020. godinu, te 52, odnosno 50 za 2022. godinu (Slika 3.5A, odnosno 3.5B). Bez uklanjanja rijetkih ASV-ova iz skupa podataka, za svaku metodu su zabilježeni rijetki jedinstveni ASV-ovi koji su uklonjeni nakon filtriranja.



Slika 3.5. Vennovi dijagrami dijeljenih i jedinstvenih ASV-ova između različitih metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a. Gornje slike predstavljaju nefiltrirani, a donje filtrirani skup podataka gdje su uklonjeni rijetki ASV-ovi za A) uzorke mora prikupljene 2020. godine te B) uzorke mora prikupljene 2022. godine. B1: standardna fenol/kloroform/izoamil izolacija, B2 i B3: izopropanol i etanol precipitacija, K1: DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), K2: modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), P: izravni PCR, Platinum Universal Master Mix (Invitrogen).

U uzorcima mora prikupljenima 2020. godine u Kaštelanskom zaljevu, najveće relativne brojnosti u svim metodama pokazali su pripadnici koljena Proteobacteria (srednja vrijednost 35,18%), Bacteroidota (srednja vrijednost 28,77%) te Cyanobacteria (srednja vrijednost 8,43%), osim za metodu K1 gdje su pripadnici koljena Actinobacteriota pokazali najveće relativne vrijednosti (srednja vrijednost 33,36%). Pripadnici koljena Proteobacteria bili su najviše zastupljeni u metodi P (srednja vrijednost 42,28%), a najmanje u metodi K1 (srednja vrijednost 30,5%). Cyanobacteria su bile manje zastupljene u metodama K1 i P u odnosu na biokemijske metode B1, B2 i B3 (Slika 3.6 A). Zanimljivo je da je u svim metodama, osim K1, zabilježen i ASV taksonomski neklasificiran čak i na razini kraljevstva, odnosno nije pripadao ni bakterijama ni arhejama.

Na razini koljena, Bacteroidota, Proteobacteria i Cyanobacteria su bili zastupljeni u najvećim relativnim udjelima u svim ispitivanim metodama u uzorcima prikupljenim u 2022. godini. Bacteroidota su bili najzastupljeniji u metodi P (srednja vrijednost 48,9%), a najmanje zastupljeni u metodi B1 (srednja vrijednost 37,08%). Naprotiv, Cyanobacteria su pokazale najveću relativnu brojnost u B1 (srednja vrijednost 13,59%), a najmanju u P (srednja vrijednost 8,2%). Pripadnici koljena Proteobacteria su bili najzastupljeniji u metodi P (srednja vrijednost 42,6%), a najmanje u metodi B1 (srednja vrijednost 29,2%) (Slika 3.6 B). Ovo su prvi rezultati sastava morske bakterijske zajednice s plaže Strožanac, iako određivanje strukture mikrobne zajednice navedene lokacije samo po sebi nije bilo cilj ovog istraživanja.

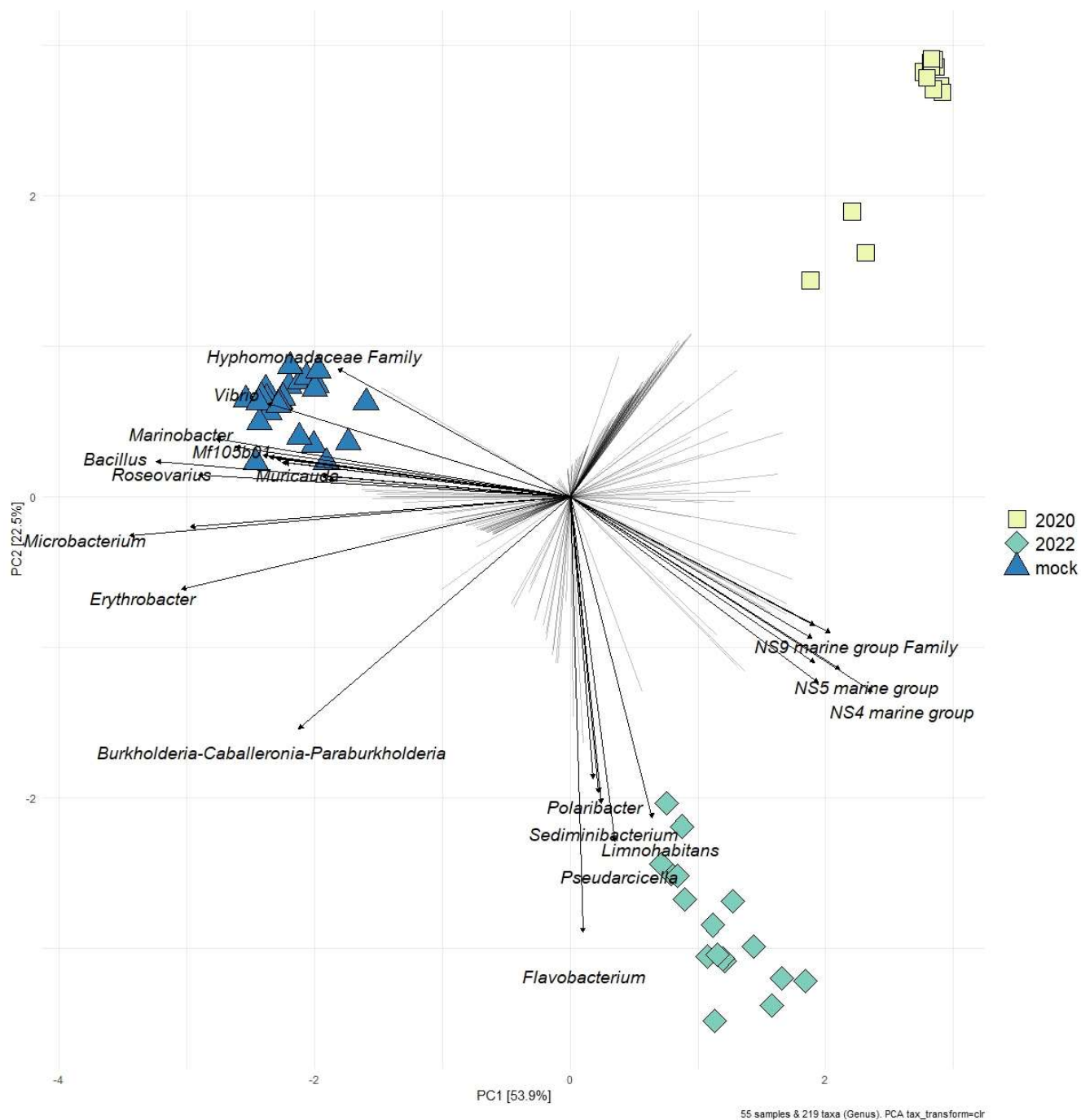


Slika 3.6. Stupčasti dijagrami sastava mikrobne zajednice na razini koljena za uzorke mora prikupljene A) 2020. godine u Kaštelanskom zaljevu, B) 2022. godine na plaži Strožanac, analizirani različitim metodama izolacije DNA ili izravnim PCR-om. B1: standardna fenol/kloroform/izoamil izolacija, B2 i B3: izopropanol i etanol precipitacija, K1: DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), K2: modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), P: izravni PCR, Platinum Universal Master Mix (Invitrogen). Rezultati su dobiveni sekvenciranjem V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena na Illumina Miseq (2x250bp).

Usporedba strukture zajednice na razini roda prikazana je korištenjem PCA biplota (Slika 3.4 C i D). Iako je u uzorcima iz 2020. godine uočeno jasno odvajanje uzoraka izoliranih korištenjem kita (K1) s jedne strane i izravnog PCR-a (P) s druge, samo je odvajanje metode izravnog PCR-a uočeno i za 2022. godinu. Uzorci za 2022. godinu izolirani korištenjem kita pokazali su veću varijabilnost kao i taloženje izopropanolom i etanolom (B2, odnosno B3). Razlike u strukturi zajednice nastale kao rezultat obrade uzoraka različitim metodama su bile statistički značajne za 2020. i 2022. godinu (PERMANOVA, $F= 5,4558$, $p=0,0002$ za 2020. odnosno $F= 1,6437$, $p=0,0048$ za 2022.) (Tablica 3.2). Struktura zajednice značajno se

razlikovala između metode izravne PCR amplifikacije (P) i biokemijskih metoda B1/B2/B3 te između metoda temeljenih na kitu i biokemijskih metoda B1/B2/B3. Navedeno je bilo dosljedno za oba mjesta, odnosno vremena uzorkovanja. Osim toga, uočeno je da se metoda B1 značajno odvojila od metoda B2/B3 za 2020., ali ne i za 2022 godinu. Međutim, zbog malenog broja jedinstvenih permutacija (35) za 2020. godinu, ove razlike trebaju biti pažljivo razmotrene (Tablica 3.2).

Konačno, testirane zajednice trebale bi se razlikovati međusobno jedna od druge s obzirom da jedna predstavlja „mock“ zajednicu, a druge dvije okolišne zajednice uzete na različitim lokacijama i godinama, iako još uvijek u priobalnom području u blizini Splita. Ovo je i potvrđeno zajedničkom vizualizacijom svih uzoraka na istom PCA biplotu (Slika 3.7). Najveći izvor varijacije bilo je međusobno razdvajanje uzoraka prema podrijetlu koje je nadmašilo ono uvedeno različitim metodološkim pristupima.



Slika 3.7. Biplot prikaz rezultata analize glavnih komponenti (PCA, engl. *principal component analysis*) na Aitchisonovim udaljenostima ukupnog skupa podataka. Vektorima je prikazano 18 najznačajnijih bakterijskih taksona aglomeriranih na razini roda zaslužnih za odvajanje uzoraka.

3.3. Rezultati analize ukupne mikrobne zajednice srednjeg Jadrana

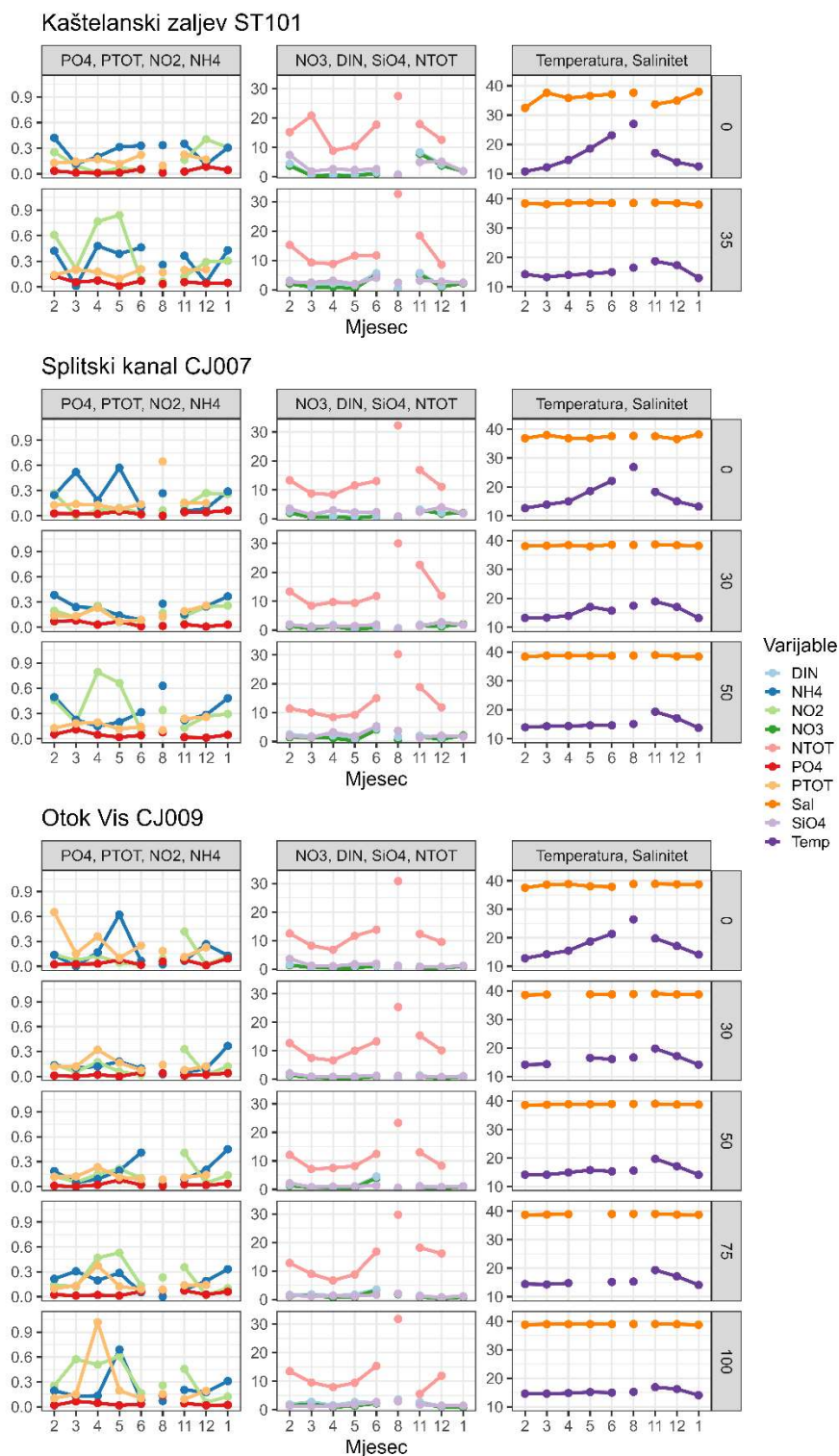
3.3.1. Fizikalno-kemijski okolišni čimbenici

Uzorkovanje je provedeno (uglavnom) mjesečno u razdoblju od godine dana (2021./2022.) na tri postaje (ST101, CJ007 i CJ009) srednjeg Jadrana različitih fizikalnih i kemijskih karakteristika proučavanog područja. Vrijednosti fizikalno-kemijskih čimbenika prikazane su na Slici 3.8, a minimalne, maksimalne i medijalne vrijednosti čimbenika okoliša dane su u Tablici 3.3. Općenito, temperatura se u ispitivanom području kretala u rasponu od 10,80°C do 27,01 °C, s medijanom od 15,012 °C. Sezonska termoklina kretala se od 5 do 30 m, a formirana je u travnju i zadržala se do prosinca, nakon čega je uslijedilo zimsko vertikalno ujednačavanje vodenog stupca. Salinitet je zabilježen u rasponu od 32,43 u priobalnom površinskom sloju do 39,02 u srednjem sloju otvorenog mora. Najniže vrijednosti saliniteta zabilježene su u površinskom sloju najpliće postaje priobalnog područja ST101. Najveće vrijednosti saliniteta izmjerene su u najdubljem sloju (100 m), na otvorenom moru na postaji CJ009.

Koncentracije hranjivih tvari pokazale su suprotan trend u usporedbi sa salinitetom i ukupnim fosforom, značajno se smanjujući od obalnog područja prema otvorenom moru. Prema definiranim stehiometrijskim kriterijima, područje je tijekom razdoblja istraživanja bilo P-ograničeno, ali ne i N-ograničeno.

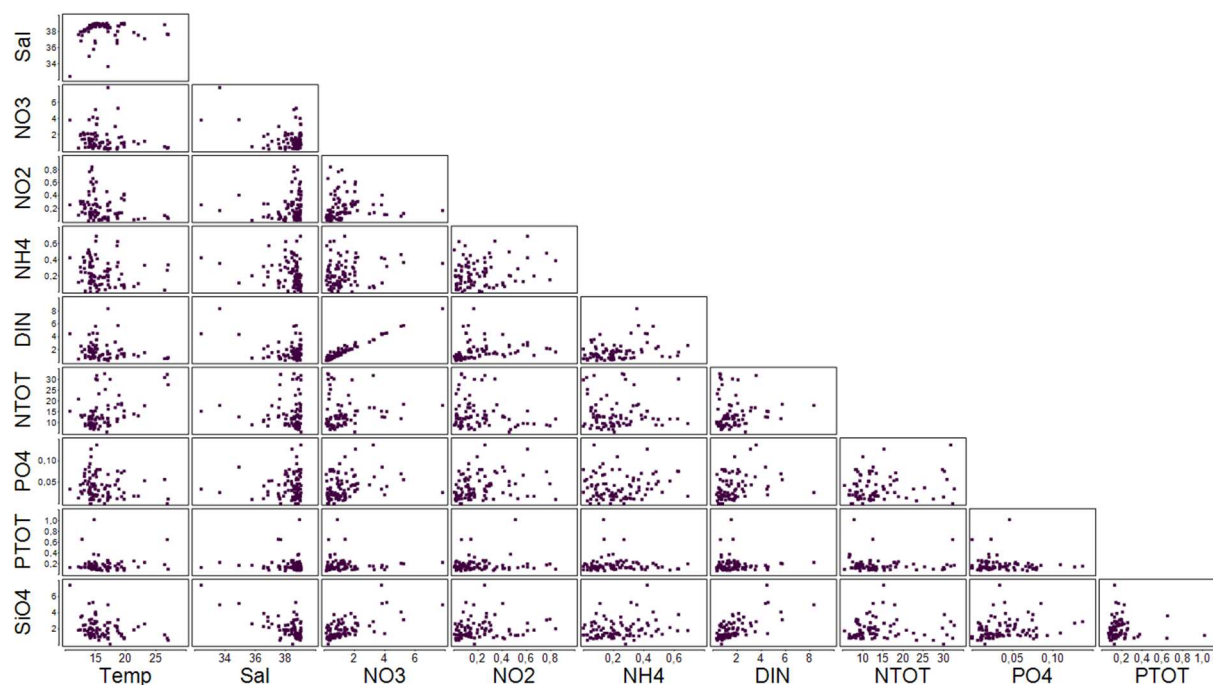
Tablica 3.3. Vrijednosti fizikalno-kemijskih čimbenika prikupljenih u srednjem Jadranskom moru na tri postaje tijekom 2021. /2022. godine (raspon i medijan; temperatura-T, salinitet-S, nitrati- NO_3^- , nitriti- NO_2^- , amonijev ion- NH_4^+ , otopljeni anorganski dušik-DIN, ukupni dušik-NTOT, topljivi reaktivni fosfor- PO_4 , ukupni fosfor-PTOT, silikat- SiO_4^{2-} , klorofil- Chl *a*).

	<i>T</i> (°C)	<i>S</i>	NO_3^- $\mu\text{mol L}^{-1}$	NO_2^- $\mu\text{mol L}^{-1}$	NH_4^+ $\mu\text{mol L}^{-1}$	<i>NTOT</i> $\mu\text{mol L}^{-1}$	<i>SRP</i> $\mu\text{mol L}^{-1}$	<i>PTOT</i> $\mu\text{mol L}^{-1}$	SiO_4^{2-} $\mu\text{mol L}^{-1}$	<i>Chl a</i> mg m^{-3}
<i>Min</i>	10,801	32,434	0,136	0,004	0,000	5,503	0,000	0,069	0,111	0,040
<i>Max</i>	27,010	39,024	7,817	0,841	0,690	32,658	0,137	1,019	7,433	1,630
<i>Med</i>	15,012	38,661	0,976	0,138	0,198	1,363	11,892	0,031	0,140	1,695



Slika 3.8. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara za ispitivano područje srednjeg Jadrana u razdoblju od godine dana (2021./2022.) prikazani za tri postaje (ST101, CJ007 i CJ009) po mjesecima na x-osi te razdvojeni prema dubini uzorkovanja. Varijable su prikazane jedinstvenim bojama: temperatura-Temp, salinitet-Sal, nitrati- NO_3^- , nitriti- NO_2^- , amonijev ion- NH_4^+ , otopljeni anorganski dušik-DIN, ukupni dušik-NTOT, topljivi reaktivni fosfor/ortofosfat- PO_4^{3-} , ukupni fosfor-PTOT, silikat- SiO_4^{2-} .

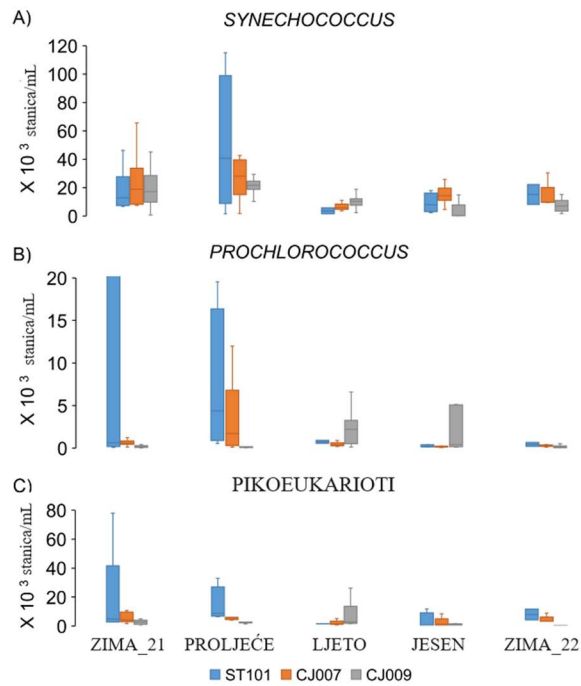
Korelacijski (Draftsman) dijagrami prikazani na Slici 3.9. nisu pokazali snažnu korelaciju ($r > 0,7$) između više abiotičkih varijabli, stoga nijedna nije izuzeta iz daljnjih analiza.



Slika 3.9. Korelacijski (Draftsman) dijagrami između abiotičkih varijabli: temperatura-Temp, salinitet-Sal, nitrati- NO_3^- , nitriti- NO_2^- , amonijev ion- NH_4^+ , otopljeni anorganski dušik-DIN, ukupni dušik-NTOT, topljivi reaktivni fosfor/ortofosfat - PO_4^{3-} , ukupni fosfor-PTOT, silikat- SiO_4^{2-} .

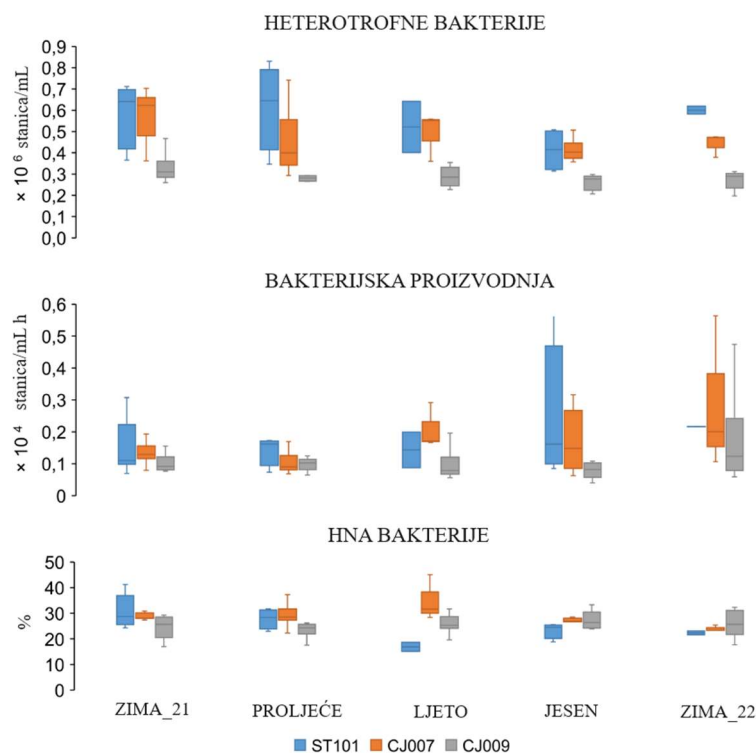
3.3.2. Biološki okolišni čimbenici, CARD-FISH rezultati i rezultati sekvenciranja

Autotrofna komponentna pikoplanktonske zajednice imala je najveće srednje apsolutne brojnosti u zimu i proljeće 2021. godine, dosegnuvši najveću vrijednost u priobalnom području na postaji ST101 (*Synechococcus* do najviše brojnosti $1,15 \times 10^5$ stanica mL^{-1} , *Prochlorococcus* do najviše brojnosti $2,09 \times 10^6$ stanica mL^{-1} , pikoeukarioti $7,79 \times 10^4$ stanica mL^{-1}). Brojnosti su opadale od priobalnog područja prema otvorenom moru. U ljeto i jesen, *Prochlorococcus* i pikoeukarioti pokazali su suprotan trend s višim vrijednostima na postaji CJ009 (Slika 3.10).



Slika 3.10. Sezonska i prostorna raspodjela autotrofnog pikoplanktona za ispitivano područje srednjeg Jadrana u razdoblju od godine dana (2021./2022.): A) Rod *Synechococcus*, B) Rod *Prochlorococcus*, C) piko-eukarioti. Srednja linija u stupčastom dijagramu predstavlja medijan, donja linija predstavlja prvi kvartil, a gornja linija 3. kvartil. Linije koje se protežu od krajeva stupčastog dijagrama predstavljaju raspon od najmanje do najveće vrijednosti.

Brojnost heterotrofnih bakterija kretala se u rasponu od $0,19 \times 10^6$ stanica mL^{-1} na otvorenom moru do $0,83 \times 10^6$ stanica mL^{-1} u priobalnom području, bez jasnih sezonskih promjena, ali s rastućim gradijentom od obale prema otvorenom moru (Slika 3.11). Bakterijska proizvodnja kretala se od najmanjih vrijednosti $0,04 \times 10^4$ stanica $\text{h}^{-1}\text{mL}^{-1}$ na postaji CJ009 do najvećih vrijednosti $0,57 \times 10^4$ stanica $\text{h}^{-1}\text{mL}^{-1}$ na postaji ST101. Sezonske promjene bile su uočljive u povećanim vrijednostima za jesen 2021. i zimu 2022. godine. S obzirom na sadržaj nukleinskih kiselina, u ispitivanom su području dominirale LNA bakterije u cijelom razdoblju istraživanja bez značajnih prostorno-sezonskih promjenljivosti (nije prikazano). Postotak HNA bakterija pokazao je značajniju prostorno-sezonsku promjenljivost, najviše u priobalnom području. Najveći je postotak HNA bakterija u priobalnom području na postaji ST101 zabilježen zimi 2021. godine, a najmanji ljeti na istoj postaji, dok je za prijelaznu postaju CJ007 uočen suprotni obrazac s najvećim postotcima zabilježenim ljeti te nižim vrijednostima zimi (Slika 3.11). Na postaji otvorenog mora CJ009 nisu bile uočljive jasne razlike u sezonalnoj promjeni udjela HNA bakterija.



Slika 3.11. Sezonska i prostorna raspodjela heterotrofne sastavnice pikoplanktona za ispitivano područje srednjeg Jadrana u razdoblju od godine dana (2021./2022.): A) apsolutne brojnosti heterotrofnih bakterija, B) bakterijska proizvodnja, C) udio HNA bakterija. Srednja linija u stupčastom dijagramu predstavlja medijan, donja linija predstavlja prvi kvartil, a gornja linija treći kvartil. Linije koje se protežu od krajeva kutijastog dijagrama predstavljaju raspon od najniže do najviše vrijednosti.

Prema rezultatima CARD-FISH metode, u prokariotskoj zajednici su prevladavale Eubacteria utvrđene općom probom EUB338I-III. Postotak broja DAPI obojanih stanica obilježenih EUB338I-III probom iznosio je u rasponu od 24,09% do 89,16% (podatci nisu prikazani). U istraživanom je području prevladavo klad SAR11 (proba SAR11_441R), nakon čega su najbrojnije bile skupine općih Alphaproteobacteria (proba ALF968), Gammaproteobacteria (proba GAM42s), Bacteroidetes (proba CF319a) te *Roseobacter* (proba ROS537) (Slika 3.12).

Za određene su bakterijske skupine uočene sezonalne promjene, pri čemu su se mjeseci od siječnja do travnja smatrali zimom, svibanj i lipanj proljećem, srpanj do listopada ljetom te studeni i prosinac jesen (Artegiani *i sur.*, 1997). U zimskim su mjesecima općenito najviše relativne udjele imali pripadnici razreda Alphaproteobacteria u rasponu od 2,24% do 52,23%,

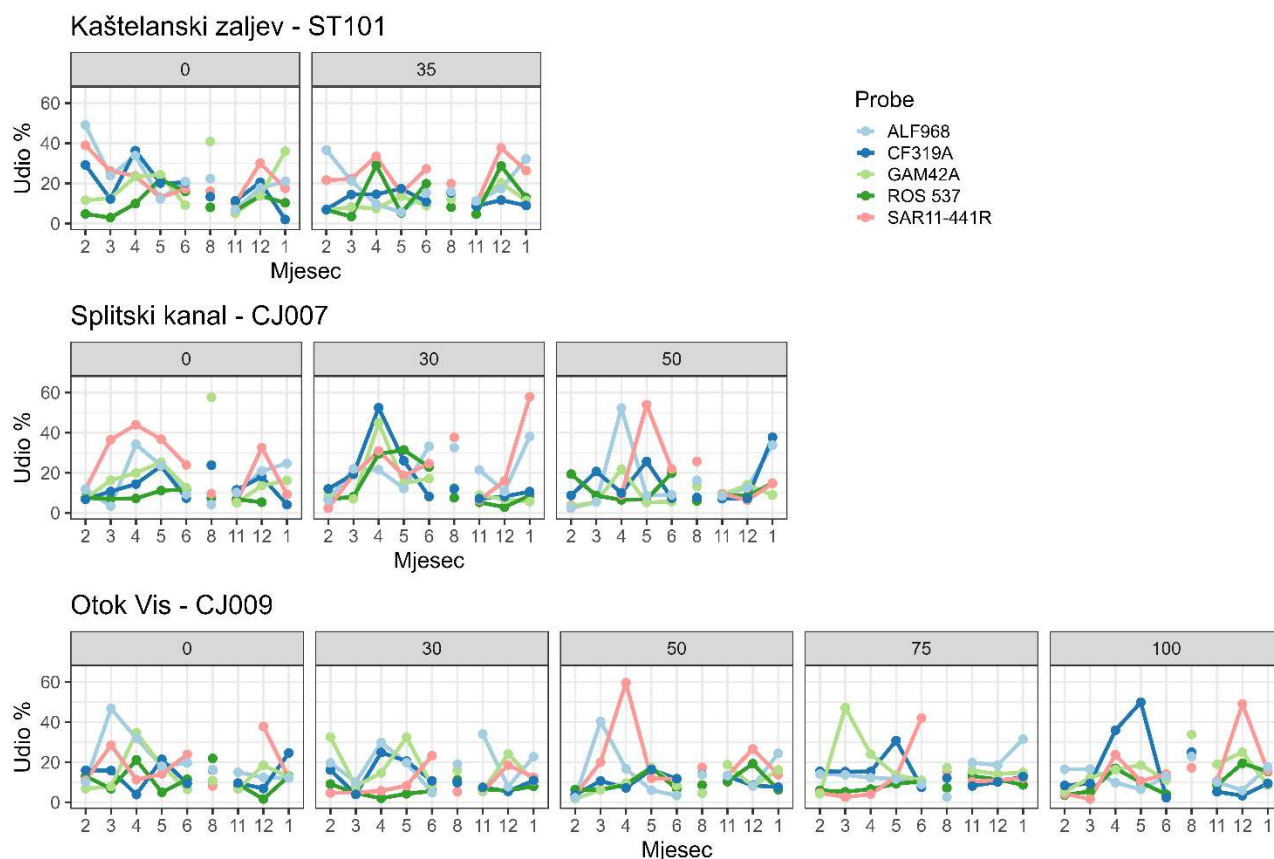
najviših brojnosti u uzorcima prikupljenima u veljači na postaji ST101 (0 i 35 m), u travnju na postaji CJ007 (50 m) te u ožujku na postaji CJ009 na morskoj površini.

Suprotno navedenom, ljeti su zabilježene povećane relativne brojnosti pripadnika razreda Gammaproteobacteria u rasponu od 4,52% do 57,60%, najviših vrijednosti u uzorcima prikupljenima u kolovozu na postaji ST101 (0 m) te također u kolovozu na postaji CJ007 (0 m).

Pripadnici klada SAR 11 bili su najbrojniji u prijelaznim razdobljima, u proljeće i jesen, u rasponu udjela od 5,29% do 53,9% sa najvišim brojnostima u prosincu na postaji ST101 (35 m), svibnju na postaji CJ007 (50 m) te u travnju (50 m), lipnju (30 i 75 m) i prosincu (0 i 100 m) na postaji CJ009.

Pripadnici koljena Bacteroidetes prevladavali su u proljeće (pretežno u mjesecu svibnju) na svim postajama u rasponu vrijednosti od minimalnih 2,32% do maksimalnih 49,92%, a najvećih brojnosti u svibnju na postaji CJ009 (100 m). Također je uočeno prevladavanje ove skupine na dubinama dubokog klorofilnog maksimuma bez obzira na godišnje doba (3,97% do 30,76%).

Pripadnici klada *Roseobacter* su bili prisutni u brojnostima raspona od 5,28 % do 31,36 %. Na otvorenom moru najveće vrijednosti bile su im zabilježene ljeti (0 i 100 m), dok su na priobalnoj postaji ST101 zabilježene u kasnu zimu (35 m), proljeće (0 i 35 m) i jesen (35 m) (Slika 3.12). Na prijelaznoj postaji CJ007 maksimalne brojnosti imali su u proljeće, u mjesecu svibnju (30 m) i lipnju (50 m).



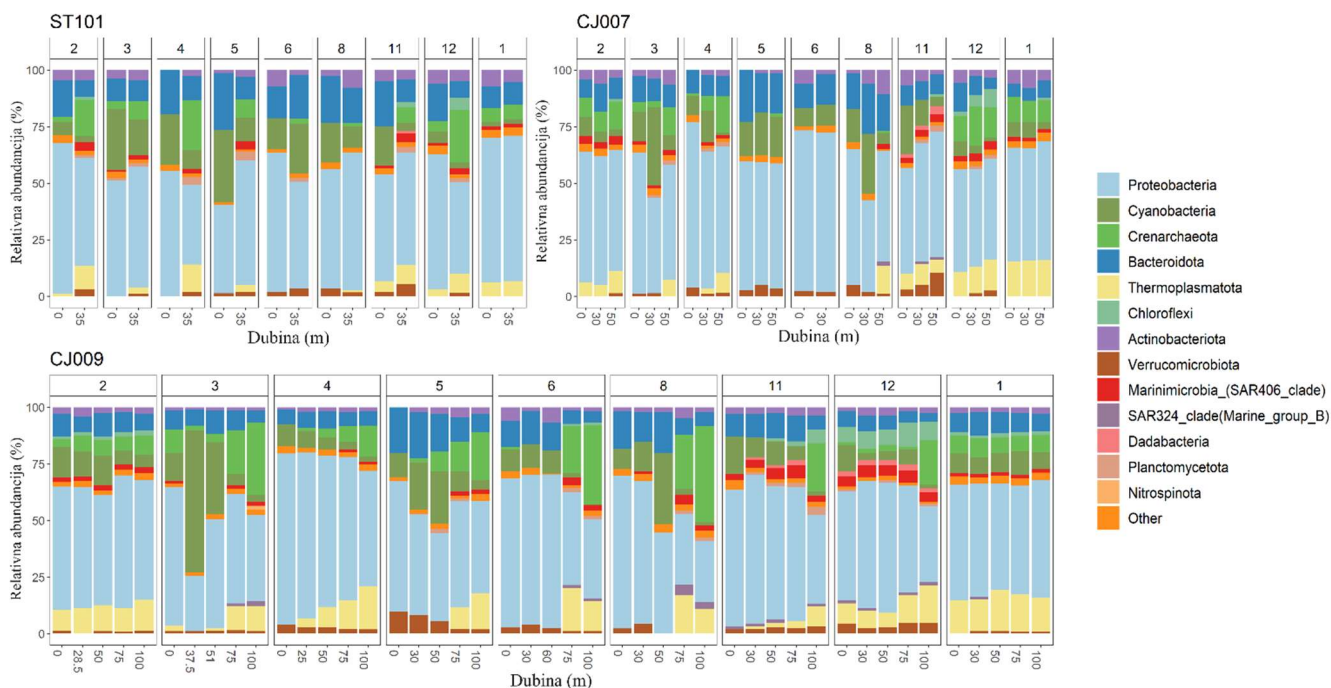
Slika 3.12. Sezonska i prostorna raspodjela udjela (%) pet bakterijskih skupina: SAR11 (proba SAR11_441R), Alphaproteobacteria (proba ALF968), Gammaproteobacteria (proba GAM42s), Bacteroidetes (proba CF319a) te *Roseobacter* (proba ROS537) određenih CARD-FISH metodom prikazanih po postajama, mjesecima i dubini za ispitivano područje srednjeg Jadrana u razdoblju od godine dana (2021./2022.).

Rezultati metabarkodiranja 16S rRNA gena dobiveni u ovom istraživanju predstavljaju prvi detaljan opis sastava bakterijske i arhealne zajednice srednjeg Jadrana na finijoj taksonomskoj ljestvici do razine roda. PERMANOVA je pokazala statistički značajne razlike u sastavu zajednice u pogledu sezonalnosti i sloja, ali ne za prostorni profil (Tablica 3.4). Neznačajan rezultat PERMDISP testa ($F=1,1315$, $p= 0,4298$) pokazao je da se grupe ne razlikuju u raspršenosti.

Tablica 3.4. Rezultati permutacijske multivarijantne analize varijance (PERMANOVA) na podacima 16S rRNA metabarkodiranja. Skup podataka rareficiran je i $\log(X+1)$ transformiran, a za PERMANOVU su korištene Bray-Curtis udaljenosti. Faktori: Se- sezona (fiksni), Re-regija (fiksni), La-sloj (faktor smješten u regiji). Zvezdicom su označene vrijednosti $p < 0,05$.

Faktor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Jedinstvene permutacije
Se	3	6598,3	2199,4	10,292	0,0001*	9883
Re	2	1553,7	776,85	1,5614	0,1887	9445
La(Re)	6	3357,4	559,57	2,2884	0,0001*	9857
Se x Re	6	2034,6	339,1	1,5895	0,0423*	9892
Se x La(Re)**	16	3365,5	210,34	0,86021	0,875	9766
Res	54	13204	244,52			
Total	87	31521				

Kvalitativne promjene u sastavu zajednice na prostorno-vremenskoj ljestvici primijećene su već na razini koljena (Slika 3.13). Zabilježeno je prevladavanje koljena Proteobacteria u relativnim brojnostima i preko 70% ukupne zajednice (s glavnim razredima Alpha- i Gammaproteobacteria) u svim uzorcima neovisno o postaji ili razdoblju. Iduće najviše relativne brojnosti imala su koljena Cyanobacteria i Bacteroidota, dok su najbrojnija koljena arheja bila Thermoplasmatota i Crenarchaeota. Relativna brojnost pripadnika koljena Bacteroidota općenito se povećavala u proljeće i ljeto, a smanjivala s dubinom bez obzira na područje. Upravo suprotno, arheje Crenarchaeota i Thermoplasmatota imale su najveću relativnu brojnost u dubljim slojevima na otvorenom moru, posebice tijekom hladnijih mjeseci s najvećom relativnom brojnošću u prosincu i siječnju na svim postajama. Pripadnici koljena Marinimicrobia (klad SAR406) bili su općenito nisko zastupljeni u zajednici, s nešto povećanim udjelom na svim postajama u slojevima mora dubine $> 35\text{m}$. Razred Actinobacteria je bio prisutan u većim relativnim brojnostima u mjesecima lipnju i kolovozu u plićim slojevima mora dubine do 50 m, dok su se Kiritimatiellae (Verrucomicrobiota) pojavile u većim relativnim brojnostima u svibnju na dubinama manjim od 50 m na postaji CJ009.



Slika 3.13. Sezonska i prostorna raspodjela relativnih brojnosti (%) 13 glavnih bakterijskih koljena u ispitivanom području srednjeg Jadrana (postaje ST101, CJ007 i CJ009) dobivenih metabarkodiranjem V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena na Illumina Novaseq 6000 uređaju (2x250bp). Kategorija „Other” obuhvaća koljena relativne zastupljenosti ispod 1% ukupne zajednice. Različiti paneli odgovaraju mjesecima uzorkovanja tijekom 2021./2022. godine.

Razlike u strukturi zajednice na prostorno-vremenskoj skali bile su izraženije na razini rodova prikazanih za glavne bakterijske skupine (Slika 3.14). Pripadnici Proteobacteria predstavljali su najraznolikije bakterijsko koljeno s utvrđenih 35 redova i 171 jedinstvenim rodom. Na finijoj taksonomskoj razini, najznačajniji razredi Alpha- i Gammaproteobacteria pokazali su obrnuto proporcionalne sezonalne relativne brojnosti, pri čemu su Gammaproteobacteria pokazivale najviše vrijednosti tijekom ljeta, dok su Alphaproteobacteria dominirale u zimskim mjesecima.

Gammaproteobacteria su predstavljale najraznolikiji razred Proteobacteria u odnosu na sve ostale bakterijske skupine, zastupljene s najvećim brojem od 49 jedinstvenih rodova. Najznačajniji predstavnici bili su rodovi SAR86 i OM60(NOR5), bez obzira na područje ili godišnje doba. Rod *Glaciecola* imao je najveću relativnu zastupljenost u zimskim mjesecima na postajama ST101 i CJ007. Suprotno navedenom, rod *Litoricola* se u većem relativnom udjelu pojavio u proljeće i ljeto, pretežno u površinskim slojevima mora. Rod *Vibrio* primijećen je u većim relativnim brojnostima na svim postajama u prosincu i siječnju, bez obzira na

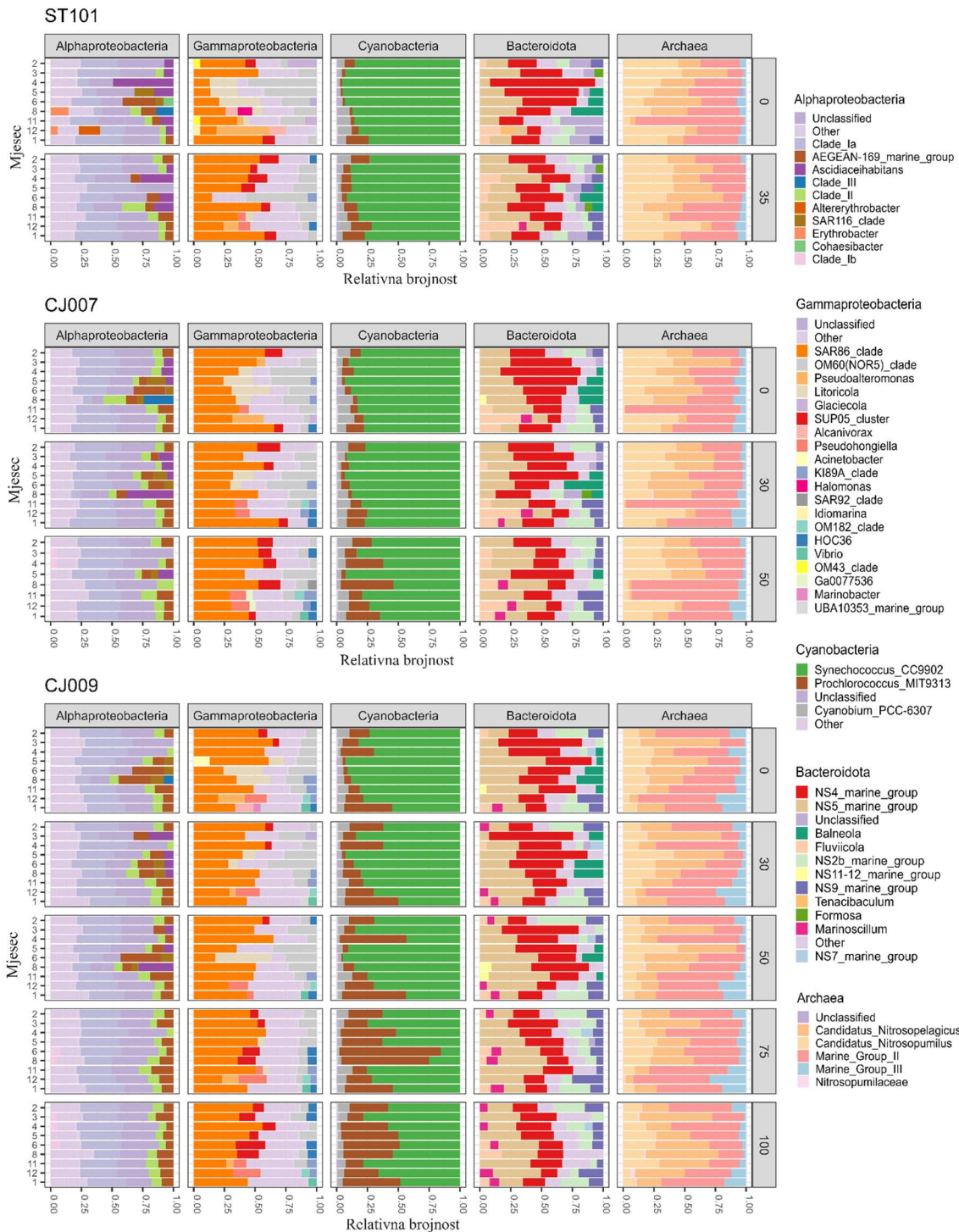
dubinu. Rod *Pseudohongiella* pojavio se u većim relativnim brojnostima u studenom i prosincu bez obzira na područje. Brojni drugi rodovi pojedinačnih doprinosa manjih od 3% predstavljali su značajan udio zajednice razreda Gammaproteobacteria.

Članovi razreda Alphaproteobacteria bili su zastupljeni s 35 jedinstvenih rodova s glavnim doprinosom sveprisutnog klada *SAR11 Ia* te *AEGEAN-169* (red Rhodospirillales). Idući najznačajniji predstavnici bili su *SAR11 II* i u manjoj mjeri rod *Asciidiaceihabitans* (iz obitelji Rhodobacteraceae). Klad *SAR11 III* pojavio se ljeti u većem doprinosu na svim postajama u površinskom sloju mora. Klad SAR116 imao je veću relativnu zastupljenost u svibnju, lipnju i kolovozu na svim postajama. Najveća relativna brojnost pripadnika Alphaproteobacteria općenito je uočena u gornjoj eufotičkoj zoni, prvenstveno površinskom sloju mora. U svim uzorcima, do ~25% zajednice razreda Alphaproteobacteria moglo se pripisati brojnim rodovima relativnih brojnosti manjih od 3%.

Koljenom Cyanobacteria dominirao je rod *Synechococcus* soja *CC9902* na svim postajama, godišnjim dobima i dubinama. S druge strane, rod *Prochlorococcus* soja *MIT9313* pojavio se u većim relativnim brojnostima na dubinama > 50 m, a posebice na postaji CJ009 u mjesecima siječnju i travnju. Rod *Cyanobium* soja *PCC-6307* bio je prisutan u svim uzorcima, dok je u lipnju taksonomski neklasificirani rod (određen samo do razine koljena Cyanobacteria) zabilježen u većoj zastupljenosti na svim postajama.

Koljeno Bacteroidota sačinjavalo je 26 jedinstvenih rodova s glavnim doprinosima nekulturablelinija *NS4* i *NS5* na svim postajama i dubinama. Idući najznačajniji predstavnici bili su *NS2* i *Fluviicola*. *NS9* je imao najveću relativnu brojnost na otvorenom moru u prosincu, siječnju i veljači na dubinama ispod 50 m. Rod *Balneola* pojavio se u sloju iznad 50 m i imao je najmanju relativnu abundanciju u prosincu, siječnju i veljači na svim postajama, a najveću u svibnju, lipnju i kolovozu. Rod *Marinoscillum* pretežito je bio zabilježen na postajama CJ007 i CJ009 s najčešćim brojnostima iznad 3% na dubinama od 75 i 100 m bez jasne sezonalnosti.

Domena Archaea je u ispitivanom području bila predstavljena linijom *Marine Group II* koljena Thermoplasmata, te rodovima *Candidatus Nitrosopelagicus* i *Candidatus Nitrosopumilus* neovisno o postaji, dubini i mjesecu. U manjim relativnim udjelima zabilježeni su pripadnici linije *Marine Group III* na svim postajama i u svim mjesecima, a pripadnici obitelji Nitrosopumilaceae zabilježeni su pretežito na postaji CJ009 na dubini od 100 m.



Slika 3.14. Prostorno-vremenska raspodjela glavnih proteobakterijskih razreda Alpha- i Gammaproteobacteria, koljena Cyanobacteria i Bacteroidota te domene Archaea s relativnim brojnostima najznačajnijih rodova. Kategorija „Other“ predstavlja rodove relativnih brojnosti manjih od 3%. Uzorci su odvojeni po mjesecima (os y) te postajama ST101, CJ007 i CJ009 s pripadajućim dubinama (desni paneli) uzorkovanog područja srednjeg Jadrana tijekom 2021./2022. Rezultati su dobiveni metabarkodiranjem V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena na Illumina Novaseq 6000 (2x250bp).

3.3.3. NG analiza CARD-FISH rezultata

Relativni udjeli pet bakterijskih skupina Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacteroidetes, SAR11 te *Roseobacter*, određeni CARD-FISH metodom, su pomoću NG algoritma svrstani u devet različitih BMU-ova nazvanih *CARD-FISH best match units* (CFBMU). Za svaki CFBMU određene su srednje vrijednosti biotičkih i abiotičkih čimbenika kako bi se udjeli bakterijskih grupa povezali s određenim okolišnim uvjetima (Slika 3.15). CARD-FISH skupine bakterija (ROS537, SAR11_441R, GAM42A, CF319A, ALF968) su za svaki CFBMU promatrane uz biološke parametre (heterotrofne bakterije-UHB, bakterije s visokim udjelom nukleinske kiseline-HIGH, *Synechococcus*-SYN, *Prochlorococcus*-PROCHL, pikoeukarioti-PE, bakterijska proizvodnja-BP, hetrotrofni nanoflagelati-HNF, aerobni anoksigeni fototrofi-AAP) te fizikalno-kemijske čimbenike okoliša (temperatura-Temp, salinitet-Sal, nitrati- NO_3^- , nitriti- NO_2^- , amonijev ion- NH_4^+ , otopljeni anorganski dušik-DIN, ukupni dušik-NTOT, topljivi reaktivni fosfor-SRP, ukupni fosfor-PTOT, silikat- SiO_4^{2-} , klorofil *a* -Chl *a*).

Klad SAR11 je prevladavo u CFBMU1, okolišu predstavljenom sa 17,8% uzoraka. Za CFBMU1 su zabilježeni povećani udjeli pripadnika klada *Roseobacter*, najveće apsolutne vrijednosti *Prochlorococcus*-a i *Synechococcus*-a, visoke vrijednosti pikoeukariota, AAF, bakterijske proizvodnje te najveća izmjerena koncentracija Chl *a*. U ovoj grupi su obuhvaćeni uzorci prikupljeni na dubinama u rasponu od 30 do 50 m, sa srednjom temperaturom ispod 16°C te potpuno neovisni o godišnjem dobu.

CFBMU2 je obuhvatio najveći broj uzoraka odnosno 22% ukupnog skupa podataka, gdje su zabilježeni otprilike isti relativni udjeli svih bakterijskih skupina. Ovaj okoliš je okarakteriziran prosječnom temperaturom neznatno ispod 16°C, prosječnim salinitetom 38,2, najvišom koncentracijom nitrata, a time i ukupnog anorganskog dušika. Ova je jedinica obuhvatila uzorke različitih postaja, godišnjih doba i dubina, što upućuje na neovisnost o sezoni i lokaciji.

U CFBMU3 su prevladavali pripadnici Gammaproteobacteria, zatim Alphaproteobacteria, Bacteroidetes, SAR11 i naposljetku *Roseobacter*. Uzorci obuhvaćeni ovim okolišem, koji su predstavljali 8,9% ukupnog skupa podataka, nisu pokazali određenost godišnjim dobom ili karakterističnom prostornom raspodjelom, ali im je bila zajednička temperatura morske vode iznad 16°C.

ROS 537	11.79	7.15	11.18	16.20	7.71	16.27	10.34	11.75	6.88
SAR11 441R	24.31	9.45	10.91	20.73	8.07	13.49	21.67	44.17	46.88
GAM 42A	9.46	9.49	39.41	22.40	13.94	15.52	11.83	16.38	12.38
CF319A	12.47	9.17	15.00	42.45	11.25	20.99	10.10	12.05	18.05
ALF968	15.29	8.81	19.41	21.08	22.75	13.67	40.23	12.13	40.45
UHB	0.49	0.40	0.37	0.44	0.29	0.34	0.53	0.35	0.51
HNA	26.85	26.45	26.52	29.58	23.83	27.13	26.82	27.48	32.93
SYN	27.04	14.49	11.39	19.11	12.08	13.83	22.97	11.18	24.09
PROCHL	135.47	0.99	0.88	0.92	0.17	1.07	2.38	0.50	0.34
PE	12.25	4.63	3.27	3.32	1.21	3.47	3.83	4.76	14.26
BP	0.18	0.13	0.13	0.20	0.13	0.09	0.13	0.15	0.16
HNF	0.74	0.30	0.69	0.59	0.25	1.36	0.61	0.42	0.80
AAP	1.57	1.25	1.38	1.71	1.18	1.91	1.42	1.50	1.43
Temp	15.59	15.58	17.77	14.47	16.21	18.75	14.29	15.98	12.97
Sal	38.08	38.24	38.41	38.11	38.83	38.23	38.51	38.45	35.82
NO ₃ ⁻	1.42	2.07	1.15	1.22	0.93	0.63	1.26	0.87	2.16
NO ₂ ⁻	0.17	0.22	0.14	0.34	0.22	0.17	0.31	0.17	0.19
NH ₄ ⁺	0.22	0.23	0.22	0.35	0.19	0.24	0.19	0.24	0.32
DIN	1.84	2.53	1.37	1.67	1.29	1.02	1.52	1.29	2.68
NTOT	15.50	13.85	18.58	8.97	15.06	13.75	10.18	10.48	11.78
SRP	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.03	0.03
PTOT	0.15	0.17	0.24	0.40	0.19	0.13	0.14	0.16	0.13
SiO ₄ ²⁻	2.60	2.22	1.44	1.75	1.13	1.53	2.06	1.62	4.07
Chl a	0.63	0.22	0.24	0.42	0.12	0.19	0.37	0.21	0.34

Slika 3.15. Udjeli bakterijskih skupina Alphaproteobacteria (ALF968), Gammaproteobacteria (GAM42A), Bacteroidetes (CF319A), SAR11 (SAR11_441R) te *Roseobacter* (ROS537) određenih CARD-FISH metodom, srednje vrijednosti bioloških parametara (UHB, HIGH, SYN, PROCHL, PE, BP, HNF, AAP) i abiotičkih okolišnih čimbenika (Temp, Sal, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, DIN, NTOT, SRP, PTOT, SiO₄²⁻, Chl a) za svaki CFBMU. Nijanse od bijele do tamnoplave boje označavaju raspon srednje vrijednosti od najmanje (bijele) do najveće (tamnoplave) vrijednosti za svaki parametar u svakom CFBMU.

CFBMU4 obuhvatio je malu grupu uzoraka udjela 5,5% ukupnog skupa podataka u kojoj su prevladavali najviši relativni udjeli pripadnika Bacteroidetes popraćeni visokim udjelom pripadnika klada *Roseobacter*, povećanim brojnostima AAP, bakterijskom proizvodnjom i povećanom koncentracijom amonijevih iona.

Okoliš CFBMU5 je obuhvatio 12,2% ukupnog skupa podataka u kojima je uočena dominacija pripadnika razreda Alphaproteobacteria. Ovaj okoliš prevladavao je u dubljim slojevima otvorenog mora s rekordno visokim salinitetom vrijednosti 38,83.

CFBMU6 je bio predstavljen najvećim relativnim brojnostima pripadnika Bacteroidetes i *Roseobacter*. Ovaj okoliš je obuhvaćao 10% ukupnog skupa podataka. Najviše

brojnosti AAF-a i najveća koncentracija SRP-a bili su glavna obilježja ovog okoliša uz najvišu zabilježenu prosječnu temperaturu morske vode (18,75°C).

Pripadnici razreda Alphaproteobacteria dominirali su u okolišu CFBMU7 s prosječnim relativnim udjelom od približno 40%. U ovom je okolišu također zabilježen najveći apsolutni broj heterotrofnih bakterija. Ovaj je okoliš predstavio 6,6% ukupnog skupa podataka, uglavnom uzorke otvorenog mora ili dublje slojeve priobalnih područja s visokim salinitetom.

Okoliš CFBMU8 je obuhvatio 8,8% ukupnog skupa podataka, gdje su pripadnici klada SAR11 prevladavali s prosječnim relativnim brojnostima od 44%. Ovaj je okoliš obuhvatio uzorke prikupljene na postaji otvorenog mora CJ009 i prijelaznoj postaji CJ007, s prosječnom temperaturom od 16 °C i visokim salinitetom od 38,45.

CFBMU9 je predstavljao najmanju jedinicu koja je obuhvatila 3,3% ukupnog skupa podataka, okarakterizirana najvećim relativnim udjelom pripadnika klada SAR11 i najvećim relativnim brojnostima pripadnika Alphaproteobacteria, s najvećom koncentracijom nitrata, najmanjom prosječnom temperaturom od 12,97 °C i najnižim vrijednostima saliniteta od 35,82.

3.3.4. NG analiza podataka dobivenih metabarkodiranjem 16S rRNA gena

Metabarkodiranjem V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena zabilježena su 24 jedinstvena bakterijska i arhealna koljena. Relativne brojnosti OTU-ova za ova koljena su NG algoritmom klasificirane u četiri jedinstvene grupe nazvane *Phyla best match units* (PHBMU). Relativne brojnosti koljena su za svaki PHBMU prikazane s biotičkim i abiotičkim čimbenicima okoliša na Slikama 3.16 i 3.17. U sva četiri okoliša prevladavalo je bakterijsko koljeno Proteobacteria.

Acidobacteriota	2	12	1	2
Actinobacteriota	1580	1191	1017	1284
Bacteroidota	3025	2538	7021	4205
Bdellovibrionota	30	34	19	24
Chloroflexi	687	812	61	241
Crenarchaeota	2415	8117	645	997
Cyanobacteria	3220	1804	1.105e+04	3178
Dadabacteria	245	152	39	128
Desulfobacterota	22	12	13	16
Firmicutes	24	2	15	5
Gemmatimonadota	50	68	16	25
Hydrogenedentes	2	3	1	1
Margulisbacteria	1	1	1	1
Marinimicrobia_(SAR406_clade)	880	969	174	545
Myxococcota	24	21	11	16
NB1-j	28	20	17	19
Nitrospinota	21	153	11	15
PAUC34f	16	15	6	7
Planctomycetota	288	578	202	199
Proteobacteria	2.253e+04	1.749e+04	1.827e+04	2.681e+04
SAR324_clade(Marine_group_B)	209	468	70	133
Thermoplasmata	3642	4491	165	973
Unclassified	47	47	15	29
Verrucomicrobiota	693	686	847	829

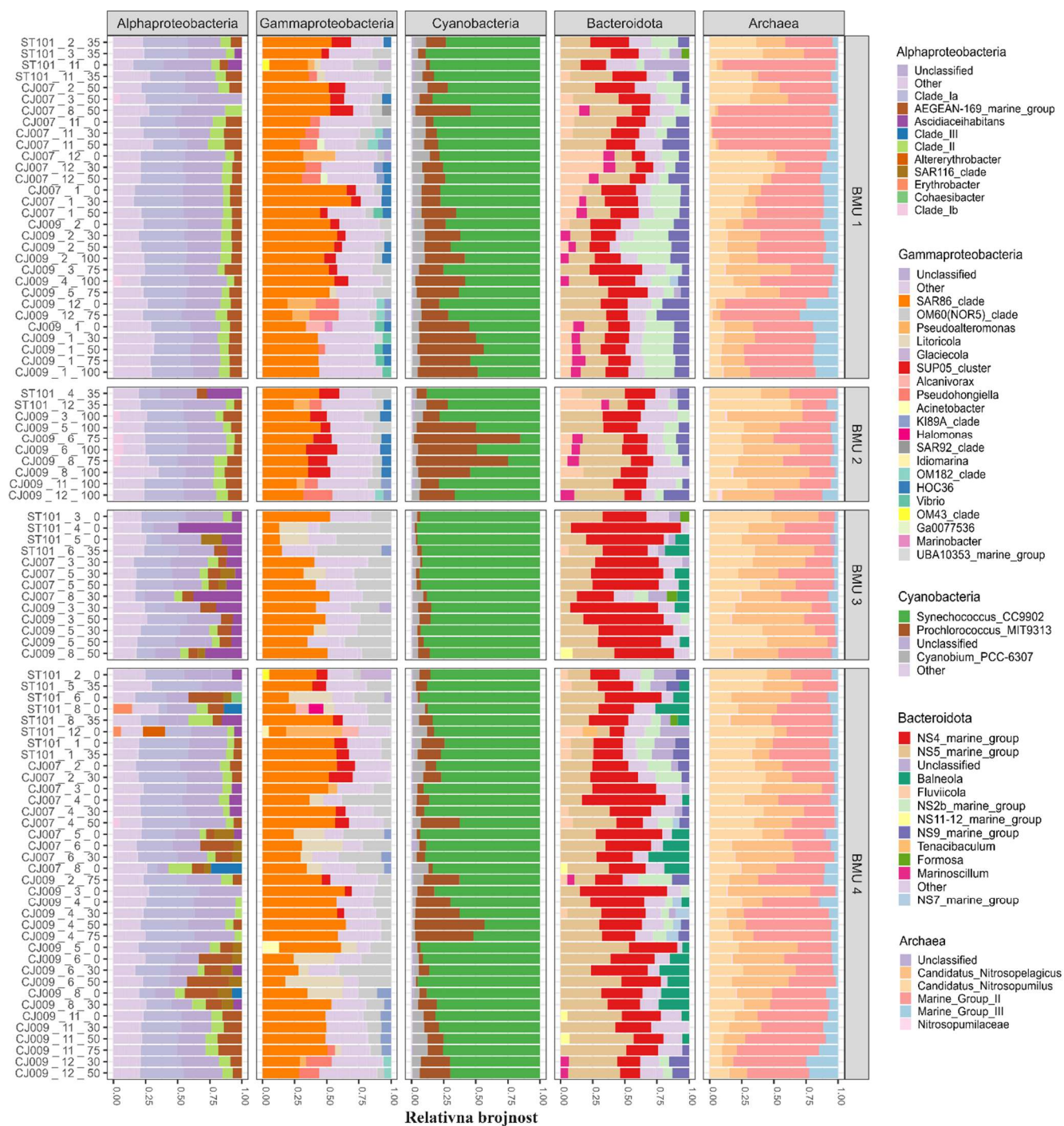
PHBMU1 PHBMU2 PHBMU3 PHBMU4

Slika 3.16. Rareficirani broj sekvenci (relativna brojnost) za 24 bakterijska i arhealna koljena grupirana u četiri PHBMU pomoću NG algoritma. Nijanse od bijele do tamnoplave označavaju raspon vrijednosti od najmanjih (bijelego) do najvećih (tamnoplave) za svako koljeno u jedinstvenom PHBMU.

UHB	0.41	0.33	0.44	0.4
HNA	28.45	26.03	27.96	24.9
SYN	16.25	5.25	27.28	15.81
PROCHL	0.59	1.5	4	59.41
PE	3.18	3.51	12.17	4.88
BP	0.13	0.13	0.16	0.15
HNF	0.42	0.26	1.22	0.58
AAP	1.11	1.22	2.02	1.49
Temp	15.4	16.01	15.68	16.65
Sal	38.42	38.89	38.11	37.99
NO ₃ ⁻	1.13	1.71	1.22	1.37
NO ₂ ⁻	0.28	0.34	0.15	0.14
NH ₄ ⁺	0.28	0.18	0.18	0.22
DIN	1.6	2.23	1.55	1.68
NTOT	15.64	15.57	11.68	13.23
SRP	0.04	0.06	0.04	0.03
PTOT	0.19	0.23	0.14	0.17
SiO ₄ ²⁻	1.85	1.96	1.84	1.94
Chl <i>a</i>	0.33	0.13	0.41	0.27
	PHBMU1	PHBMU2	PHBMU3	PHBMU4

Slika 3.17. Srednje vrijednosti bioloških (UHB, HIGH, SYN, PROCHL, PE, BP, HNF, AAP) i abiotičkih okolišnih čimbenika (Temp, Sal, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, DIN, NTOT, SRP, PTOT, SiO₄²⁻, Chl *a*) za svaki PHBMU. Nijanse od bijele do tamnoplave označavaju raspon srednjih vrijednosti od najmanjih (bijele) do najvećih (tamnoplave) za svaki parametar u jedinstvenom PHBMU.

Detaljni prikaz relativne zastupljenosti rodova najznačajnijih proteobakterijskih razreda Alpha- i Gammaproteobacteria, koljena Cyanobacteria i Bacteroidota te domene Archaea prikazan je na Slici 3.18 za svaki PHBMU.



Slika 3.18. Relativni udio (relativna brojnost) rodova najzastupljenijih skupina bakterija i domene arheja prikazanih za svaki PHBMU (BMU1-4). Uzorci na osi y označeni su po postaji, mjesecu i dubini. Kategorija „Other“ predstavlja rodove relativnih brojnosti manjih od 3%. Rezultati su dobiveni metabarkodiranjem V4-V5 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena na Illumina Novaseq 6000 uređaju (2x250bp).

PHBMU1 okoliš obuhvatio je 33% uzoraka. Ovu jedinicu opisivala je visoka prosječna relativna zastupljenost koljena Thermoplasmatota, Cyanobacteria, Bacteroidota, Crenarchaeota, Actinobacteriota i Marinimicrobia. Koljena Dadabacteria, Desulfobacterota i Firmicutes imala su maksimalnu relativnu brojnost u ovom PHBMU. Ovaj okoliš mogao bi se opisati kao najhladniji s prosječnom temperaturom ispod 16 °C i najvišim koncentracijama amonijevih iona, ukupnog dušika i najvećim postotkom bakterija s visokim udjelom nukleinskih kiselina. Najveća raznolikost arheja određena Shannovim indeksom je također zabilježena u ovoj jedinici s dva glavna predstavnika koljena Thermoplasmatota i Crenarchaeota (Tablica 3.5). Na taksonomskoj razini roda, glavni arhealni predstavnik koji je doprinio najvećim relativnim brojnostima bio je *Marine Group II* koljena Thermoplasmatota, a slijedili su *Candidatus Nitrosopumilus* i *Candidatus Nitrosopelagicus* koljena Crenarchaeota. Pripadnici *Marine Group III* imali su najveću prosječnu relativnu abundanciju u ovoj jedinici u usporedbi s ostalima.

PHBMU2 je najmanja jedinica koja je okupila 11% ukupnog skupa podataka. Ovaj okoliš bio je značajan po izrazito visokom salinitetu, visokim koncentracijama nitrata, nitrita, ukupnog dušika i najvećom srednjom dubinom. Također je zabilježen najveći broj bakterijskih vrsta, bakterijska Shannonova raznolikost i Pielouova ravnornost (Tablica 3.5). Dvanaest koljena imalo je najveće relativne brojnosti u usporedbi s drugim jedinicama. Arheje Crenarchaeota i Thermoplasmatota ovdje su dosegle svoju najveću relativnu brojnost, a slijedila su koljena Chloroflexi, Nitrospinota, Planctomycetota, Gemmatimonadota, Acidobacterota i Marinimicrobia. Budući da je najveća zabilježena bakterijska raznolikost bila upravo u ovoj jedinici, relativni udjeli rodova najraznovrsnijeg koljena Proteobacteria (razredi Alpha- i Gammaproteobacteria), a zatim Bacteroidota i Cyanobacteria, prikazani su na Slici 3.18. Razredom Alphaproteobacteria dominirao je SAR11 *Clade Ia*, a zatim *Clade II*, *Clade Ib* i *AEGEAN-169* (red Rhodospirillales). Rodovi s relativnom brojnošću ispod 5% doprinijeli su do 25% OTU-ova koji su pripadali Alphaproteobacteria-ma u svim uzorcima ovog okoliša. Klad SAR86 bio je najdominantniji predstavnik Gammaproteobacteria, a slijedili su OM60(NOR5), SUP05, HOC36 i rod *Pseudohongiella*. Za koljeno Bacteroidota gotovo podjednako su bili zastupljeni rodovi NS4 i NS5, a zabilježena je i veća relativna zastupljenost NS2b i NS9, slično kao u PHBMU1. Rodovi *Fluviicola* i *Marinoscillum* primijećeni su u povećanim relativnim udjelima u ovom BMU-u. Najznačajniji predstavnik Cyanobacteria s relativnom brojnošću i do 70% u većini uzoraka ovog BMU-a bio je *Prochlorococcus*.

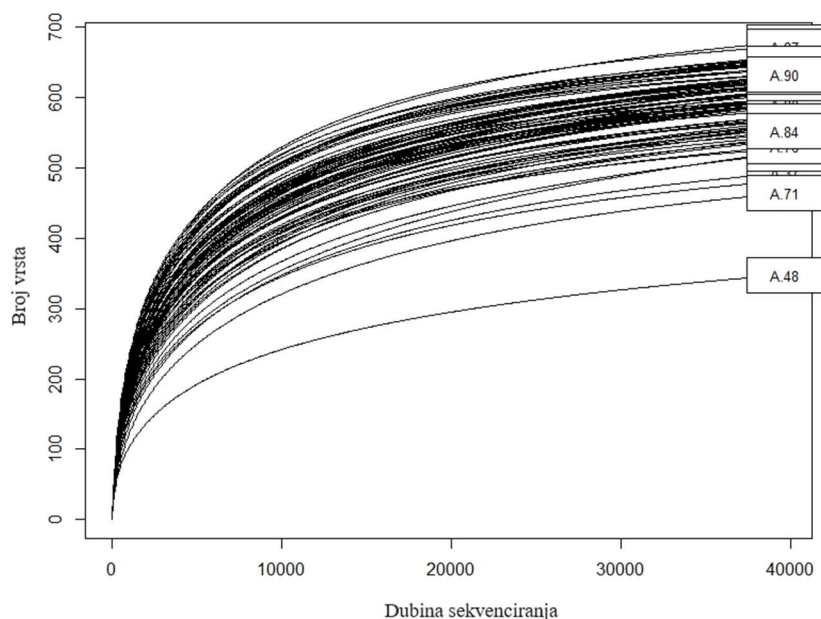
PHBMU3 obuhvatio je 14% podataka i opisao je vodeni stupac s najvećom apsolutnom brojnošću heterotrofnih bakterija, AAF, *Synechococcus*-a, pikoekariota i najvećom

bakterijskom proizvodnjom kao i koncentracijom klorofila *a*. Međutim, u ovoj je jedinici zabilježena najmanja raznolikost bakterija i arheja (Tablica 3.5). Koljena Cyanobacteria, Bacteroidota i Verrumicrobiota dosegli su svoje najveće relativne brojnosti u ovoj jedinici u usporedbi sa drugim PHBMU-ima, dok je ostalih četrnaest koljena imalo najmanje relativne brojnosti. Alfaproteobakterijski rod *Asciaceihabitans* (obitelj Rhodobacteraceae) pokazao je znatno veću relativnu brojnost s doprinosima do 50%. Pripadnici Gamaproteobacteria roda OM60 pokazali su veću zastupljenost, dok kladovi SUP05 i HOC36 nisu detektirani. Koljeno Bacteroidota je bilo dominirano linijom NS4, s većom relativnom abundancijom roda *Balneola*. Za razliku od PHBMU1 i PHBMU2, rodovi *Fluviicola* i *Marinoscillum* nisu uočeni u ovom okolišu.

Okoliš PHBMU4 obuhvatio je najveću količinu podataka (40%). Koljeno Proteobacteria prednjačilo je najvećom relativnom abundancijom u svim uzorcima, a slijedili su ga Bacteroidota, Cyanobacteria, Actinobacteriota, Crenarchaeota, Thermoplasmata, Verrucomicrobiota, Marinimicrobiota i Dadabacteria u većim relativnim udjelima. Za ovaj okoliš bila je značajna najveća prosječna temperatura i apsolutna brojnost *Prochlorococcus*-a, bakterijska proizvodnja, Pielouov indeks ravnomyernosti arheja i povišena koncentracija nitrata i amonijevih iona. Na razini roda, Alphaproteobacteria *Erythrobacter* zabilježena je u dva uzorka u većoj relativnoj brojnosti i do 10% s općenito većim doprinosom linije AEGEAN-169 u usporedbi s drugim jedinicama. Koljeno Bacteroidota je bilo zastupljeno većom relativnom brojnošću rodova *Balneola* i NS11-12 u odnosu na druge jedinice.

3.3.5. Raznolikost ukupne mikrobne zajednice

Krivulja rarefakcije (engl. *rarefaction curve*) pokazala je zadovoljavajuću dubinu sekvenciranja uzoraka koja je bila dovoljna za prikladan opis raznolikosti arheja i bakterija u proučavanom području srednjeg Jadranskog mora (Slika 3.19).



Slika 3.19. Krivulja rarefakcije koja pokazuje dovoljnu dubinu sekvenciranja po uzorku za procjenu ukupne mikrobne raznolikosti zajednice.

Uzimajući u obzir klasifikaciju bakterijskih i arhealnih koljena putem NG algoritma u četiri BMU-a opisanih kao jedinstveni okoliši, analizirana je raznolikost ukupne zajednice pikoplanktona prema svakom PHBMU-u (Tablica 3.5). Prosječne vrijednosti broja arhealnih i bakterijskih OTU-ova, Shannonov indeks raznolikosti i Pielouove bakterijske ravnomjernosti bile su najniže u PHBMU3, koji je opisan kao okoliš s najvećim vrijednostima heterotrofnih bakterija, AAF-a, *Synechococcus*-a, pikoekariota, bakterijske proizvodnje i koncentracija klorofila *a*. Naprotiv, okoliš s najvećim salinitetom, koncentracijama nitrata, nitrita i ukupnog dušika (PHBMU2) pokazao je najveću bakterijsku Shannonovu raznolikost i Pielouovu ujednačenost. Hladni okoliš bogat amonijakom (PHBMU1) opisan je najvišim arhealnim Shannonovim indeksom te je karakteriziran i najvećim postotkom bakterija s visokim udjelom nukleinske kiseline. Najveća Pielouova ravnomjernost arheja primijećena je u PHBMU4.

Tablica 3.5. Indeksi raznolikosti arhealnih i bakterijskih kraljevstava po svakom PHBMU.

	PHBMU1	PHBMU2	PHBMU3	PHBMU4
Broj uzoraka	30	10	13	36
Prosječan broj vrsta arheja (\pm sd; min, max)	41,13 (\pm 6,307; 25, 49)	45,9 (\pm 2,846; 42, 50)	27,46 (\pm 4,754; 19, 33)	32,03 (\pm 7,618; 12, 43)
Prosječna raznolikost arheja (Shannon; \pm sd; min, max)	2,274 (\pm 0,247; 1,704, 2,588)	2,106 (\pm 0,306; 1,635, 2,637)	1,935 (\pm 0,379; 1,279, 2,453)	2,225 (\pm 0,316; 1,424, 2,637)
Prosječna ravnomjernost arheja (Pielouov indeks; \pm sd; min, max)	0,615 (\pm 0,068; 0,475, 0,738)	0,55 (\pm 0,078; 0,437, 0,685)	0,91 (\pm 0,132; 0,373, 0,790)	0,652 (\pm 0,102; 0,419, 0,800)
Prosječan broj bakterijskih vrsta (\pm sd; min, max)	571,37 (\pm 33,443; 503, 631)	575 (\pm 27,252; 522, 608)	534,92 (\pm 48,769; 445, 591)	550,31 (\pm 4,877; 336, 616)
Prosječna bakterijska raznolikost (Shannon; \pm sd; min, max)	4,394 (\pm 0,206; 3,962, 4,973)	4,644 (\pm 0,236; 4,368; 5,097)	3,973 (\pm 0,329; 3,120, 4,275)	4,197 (\pm 0,232; 3,579, 4,523)
Prosječna ravnomjernost bakterija (Pielouov indeks; \pm sd; min, max)	0,692 (\pm 0,027; 0,636, 0,753)	0,731 (\pm 0,034; 0,690, 0,799)	0,632 (\pm 0,046; 0,508; 0,673)	0,665 (\pm 0,029; 0,611, 0,710)

3.4. Rezultati analize zajednice aerobnih anoksigenih fototrofa srednjeg Jadrana

3.4.1. Brojnost aerobnih anoksigenih fototrofa

AAF su zabilježeni u svih 90 uzoraka (Slika 3.20), a prosječna apsolutna brojnost u istraživanom području iznosila je $1,427 \pm 0,754 \times 10^4$ stanica mL^{-1} . Najmanja vrijednost zabilježena je na postaji CJ007 u kolovozu na dubini od 30 m ($0,30 \times 10^4$ stanica mL^{-1}), dok je najveća brojnost zabilježena na postaji ST101 u svibnju na površini mora ($3,41 \times 10^4$ stanica mL^{-1}) (Slika 3.20). Prosječna relativna brojnost iznosila je $3,862\% \pm 2,266\%$ (najmanje $0,548\%$ na postaji CJ007 u kolovozu na 30 m dubine; najveće $10,258\%$ na CJ009 u travnju na 50 m dubine). Na mjesečnoj razini, najveća prosječna brojnost zabilježena je u lipnju s $2,193 \pm 0,619 \times 10^4$ stanica mL^{-1} , a gotovo identične vrijednosti zabilježene su u travnju s $2,183 \pm 0,412 \times 10^4$ stanica mL^{-1} . Najmanja brojnost zabilježena je u siječnju 2022. godine s $0,704 \pm 0,248 \times 10^4$ stanica mL^{-1} i veljači 2021. s $0,844 \pm 0,223 \times 10^4$ stanica mL^{-1} . PERMANOVA je pokazala statistički značajne razlike u apsolutnoj AAF brojnosti ovisno o sezoni (Pseudo-F=23,125, p=0,0001, jedinstvene permutacije=9957), ali neovisno o postaji ili dubini (Tablica 3.6.a). Usporedbe navedene u Tablici 3.6.b dodatno su razjasnile da je proljeće bilo jedino godišnje

doba značajno različito od ostalih (proljeće-zima: $t=5,235$, $p=0,0001$; proljeće-ljeto: $t=7,5603$, $p=0,0001$; proljeće-jesen $t=3,9196$, $p=0,0006$). Međutim, značajan rezultat PERMDISP testa (faktor: sezona, $F=5,0481$, $p=0,0067$, 9999 permutacija) otkrio je da se grupe razlikuju u raspršenosti, što onemogućava jednoznačnu interpretaciju rezultata ova dva testa.

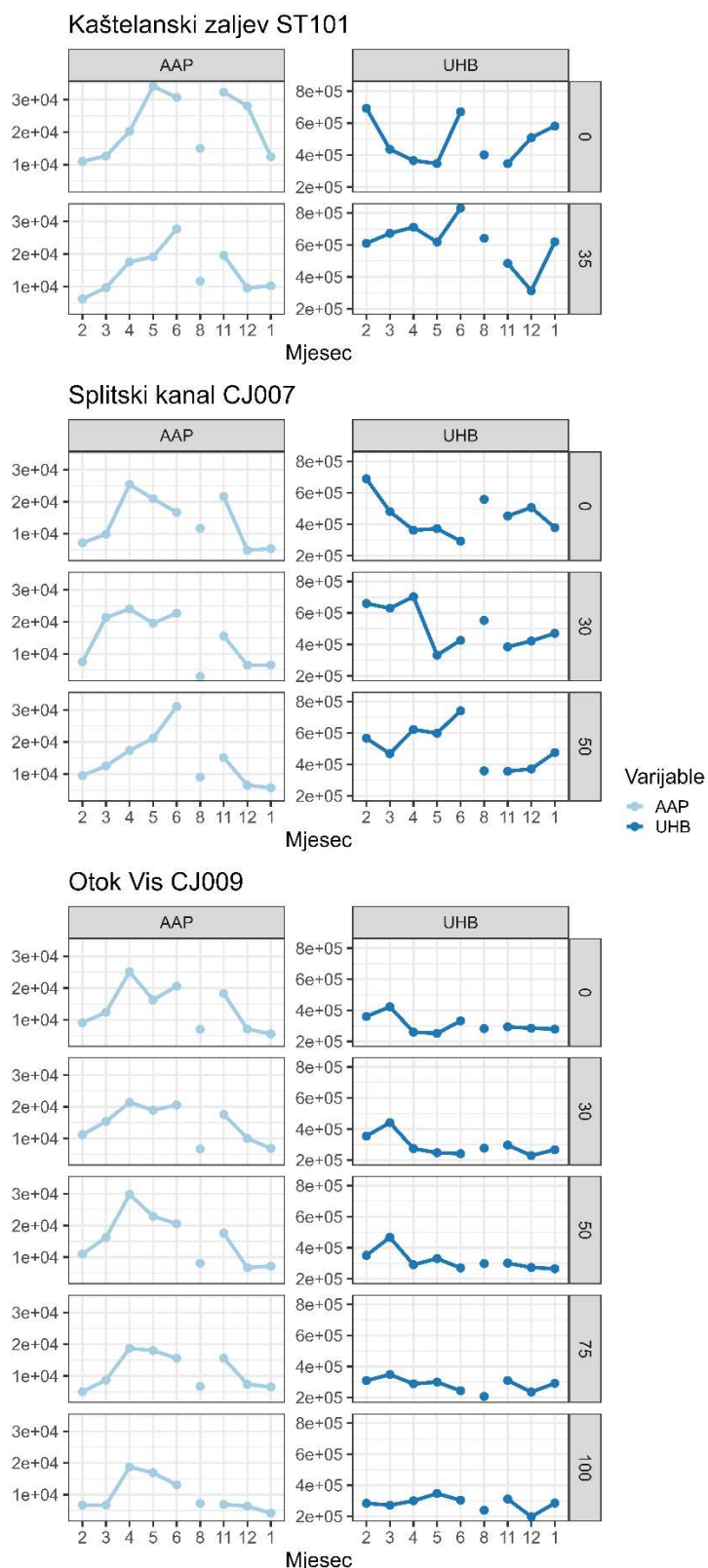
Tablica 3.6. Rezultati permutacijske multivarijantne analize varijance (PERMANOVA) na podacima apsolutnih brojnosti AAF-a: (a) skup podataka transformiran je kvadratnim korijenom, a za PERMANOVU su korištene Euklidske udaljenosti. Faktori: Se- sezona (fiksni), Re-regija (fiksni), La-sloj (faktor smješten u regiji); (b) usporedbe parova za svako godišnje doba (W-zima, Sp-proljeće, A-jesen, S-ljeto). Zvjezdicom su označene vrijednosti $p<0,05$.

(a)

Faktor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Permutacije
Se	3	2,593	0,86432	23,125	0,0001*	9957
Re	2	0,5968	0,2984	2,4257	0,0729	1675
La(Re)	5	0,56493	0,11299	1,5597	0,1907	9955
SexRe	6	0,41104	0,068506	2,4653	0,0768	9953
SexLa(Re)	15	0,41939	0,02796	0,38595	0,9833	9911
Res	58	4,2017	0,072444			
Total	89	8,7869				

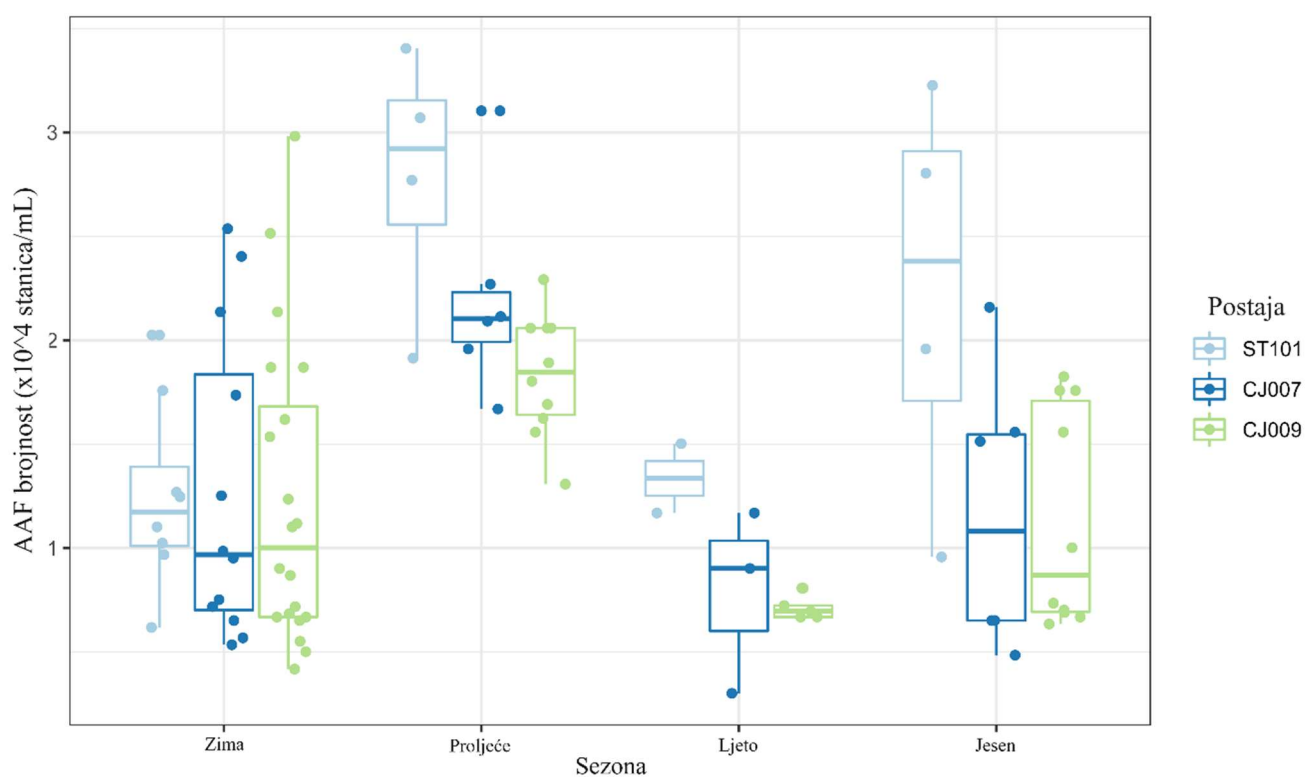
(b)

Grupe	t	P(perm)	Permutacije
W, Sp	5,2351	0,0001*	9840
W, S	1,7528	0,0825	9820
W, A	0,55371	0,5794	9838
Sp, S	7,5603	0,0001*	9833
Sp, A	3,9196	0,0006*	9846
S, A	1,9313	0,0641	9843



Slika 3.20. Apsolutne brojnosti aerobnih anoksigenih fototrofa (AAP) i ukupnih heterotrofnih bakterija (UHB) prikazane po mjesecima (os x) te postajama ST101, CJ007 i CJ009 s pripadajućim dubinama (desni paneli) uzorkovanog područja srednjeg Jadrana tijekom 2021./2022.

Prikazano po sezoni, prosječna brojnost AAF zabilježena u proljeće iznosila je $2,136 \pm 0,081 \times 10^4$ stanica mL^{-1} , ljeti $0,86 \times 10^4$ stanica mL^{-1} (uzorkovano je samo u kolovozu), u jesen $1,364 \pm 0,616 \times 10^4$ stanica mL^{-1} , a zimi $1,246 \pm 0,667 \times 10^4$ stanica mL^{-1} (Slika 3.21). Iako je primijećena razlika u prosječnom apsolutnom broju AAF između priobalne postaje ST101 (prosječni broj $1,821 \pm 0,882 \times 10^4$ stanica mL^{-1}), prijelazne CJ007 (prosječan broj $1,4 \pm 0,769 \times 10^4$ stanica mL^{-1}) i postaje otvorenog mora CJ009 (prosječni broj $1,285 \pm 0,644 \times 10^4$ stanica mL^{-1}) u vidu smanjene gustoće populacije od priobalnog prema otvorenom moru, uočene razlike nisu bile statistički značajne. Razlike u brojnosti AAF između različitih dubina također nisu bile statistički značajne.



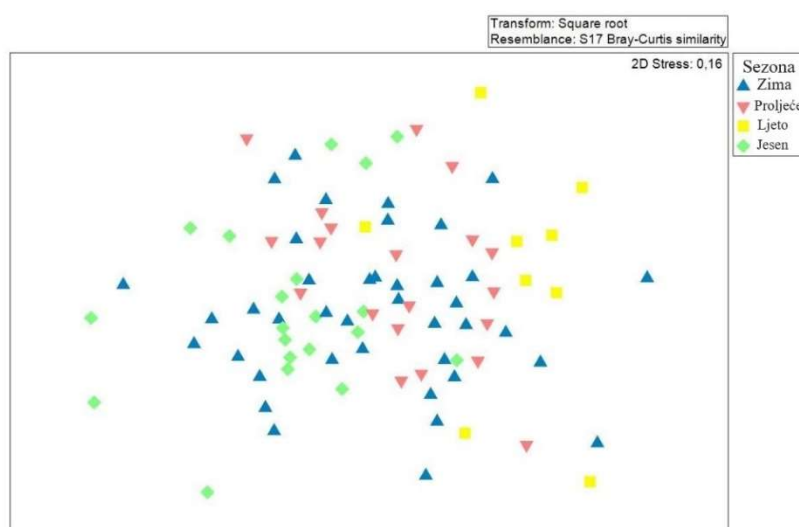
Slika 3.21. Prikaz apsolutnih brojnosti AAF u ispitivanom području srednjeg Jadrana (postaje ST101, CJ007 i CJ009) po sezoni tijekom 2021./2022. godine.

3.4.2. Rezultati brojnosti AAF skupina određenih IC-FISH metodom

Kako bi se kvantificirao udio AAF koji se može pripisati razredima Alphaproteobacteria (proba ALF968) i Gammaproteobacteria (proba GAM42a) ili kladu *Roseobacter* (proba ROS537) unutar razreda Alphaproteobacteria, korišten je spoj dviju mikroskopskih metoda: infracrvene epifluorescentne mikroskopije i fluorescencijske *in situ*

hibridizacije (IC-FISH). Brojevi dobiveni ovom metodom prikazani su kao relativne brojnosti odnosno postotak ukupne brojnosti AAF.

Kao što je prethodno uočeno za apsolutne brojnosti ukupne AAF zajednice, sezonalnost je bila statistički značajna i za IC-FISH rezultate. Statistička značajnost testirana je PERMANOVOM na Bray-Curtisovim udaljenostima relativnih brojnosti (Pseudo-F= 4,3159, $p=0,004$, jedinstvene permutacije=9960, Tablica 3.7) uz prikaz rezultata nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja (nMDS) (Slika 3.22).



Slika 3.22. Prikaz rezultata nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja (nMDS) relativnih brojnosti bakterijskih grupa dobivenih IC-FISH metodom u ispitivanom području srednjeg Jadrana (postaje ST101, CJ007 i CJ009) po sezonama tijekom 2021./2022. godine.

Nisu uočene statistički značajne razlike u brojnostima IC-FISH grupa između dubine i područja (rezultati PERMANOVA analize, Tablica 3.7a). Usporedbe parova otkrile su da je ljeto jedino godišnja doba različito od ostalih (Tablica 3.7b). Neznačajan rezultat PERMDISP testa (faktor: sezona, $F=0,44762$, $p=0,749$, 9999 permutacija) ukazao je da se grupe ne razlikuju u raspršenosti. U istraživanom području tijekom jednogodišnjeg uzorkovanja, AAF koji pripadaju razredu Gammaproteobacteria pokazali su prosječnu relativnu brojnost od 35,25%, AAF koji pripadaju razredu Alphaproteobacteria 31,15% te AAF koji pripadaju kladu *Roseobacter* 37,66%.

Tablica 3.7. Rezultati permutacijske multivarijantne analize varijance (PERMANOVA) na podacima relativnih brojnosti IC-FISH grupa: (a) skup podataka transformiran je kvadratnim korijenom, a korištene su Bray-Curtisove udaljenosti. Faktori: Se-sezona (fiksni), Re-regija (fiksni), La-sloj (faktor smješten u regiji); (b) usporedbe parova za svako godišnje doba (W-zima, Sp-proljeće, A-jesen, S-ljeto). Zvjezdicom su označene vrijednosti $p < 0,05$.

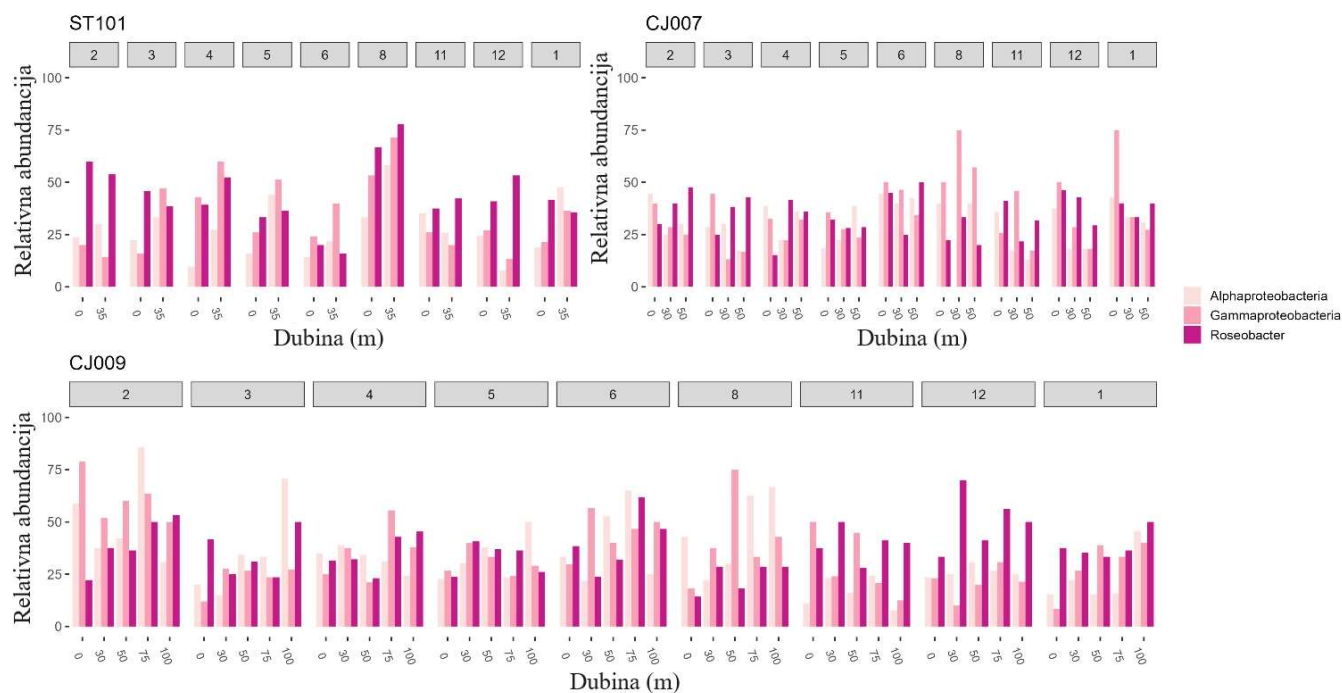
(a)

Faktor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Jedinstvene permutacije
Se	3	1226,2	408,74	4,3159	0,004*	9960
Re	2	213,71	106,86	0,88152	0,5378	4310
La(Re)	5	579,64	115,93	1,7652	0,0703	9934
SexRe	6	482,88	80,481	1,0677	0,4218	9937
SexLa(Re)**	14	1041,4	74,387	1,1326	0,3086	9900
Res	58	3809,2	65,676			
Total	88	7367,2				

(b)

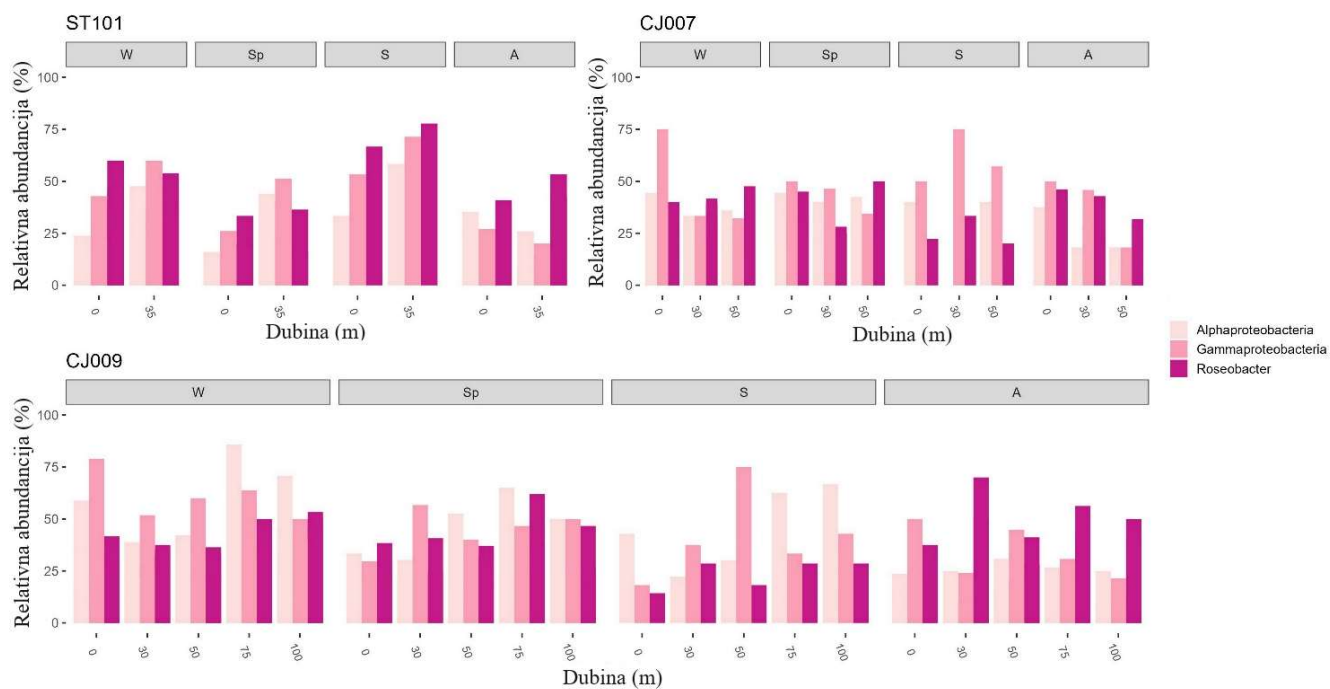
Grupe	t	P(perm)	Permutacije
W, Sp	1,7217	0,0808	9964
W, S	3,2674	0,0023*	9967
W, A	1,499	0,1603	9958
Sp, S	2,4999	0,0103*	9958
Sp, A	1,9106	0,062	9962
S, A	2,5567	0,0145*	9956

Na razini mjeseca, postaje i dubine, AAF koji pripadaju razredu Alphaproteobacteria pokazali su najveću relativnu brojnost od ~85% u veljači na dubini od 75 m na postaji otvorenog mora CJ009. Druga najveća relativna brojnost (~70%) zabilježena je u ožujku na dubini od 100 m na istoj postaji. Suprotno navedenom, najmanja brojnost (7%) zabilježena je na postaji ST101 na dubini od 35 m u prosincu te na postaji CJ009 na dubini od 100 m u studenom. Detaljni kvantitativni prikaz relativnih brojnosti AAF skupina dobivenih IC-FISH metodom prikazan je na Slici 3.23. AAF dodijeljeni razredu Gammaproteobacteria pokazali su najveću relativnu brojnost u uzorcima prikupljenim na površini postaje otvorenog mora CJ009 u veljači (~79%), a slijedili su uzorci sa postaje CJ007 na 30 m u kolovozu (75%) i postaje ST101 na 35 m također u kolovozu (~72%). Najmanje vrijednosti od ~8% ukupne AAF zajednice zabilježene su na površini mora u siječnju na postaji CJ009. AAF koji pripadaju kladu *Roseobacter* pokazali su najveću relativnu brojnost (77,77%) na priobalnoj postaji ST101 na dubini od 35 m u kolovozu i najmanju (14,29%) na postaji CJ007 na 50 m u kolovozu.



Slika 3.23. Relativne brojnosti (%) AAF grupa Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria i *Roseobacter* dobivene IC-FISH metodom, prikazane za svaki uzorak za područje uzorkovanja u srednjem Jadranu (postaje ST101, CJ007 i CJ009; N uzoraka = 90) tijekom 2021./2022.

Promatrajući sezonsku ljestvicu i prosječne relativne brojnosti, AAF koji pripadaju razredu Alphaproteobacteria imali su najveće prosječne relativne zastupljenosti (39,59%) zabilježene u ljeto, a najmanje (22,3%) u jesen (Slika 3.24). Za AAF koji pripadaju Gammaproteobacteria-ma, uočen je sličan trend kao i za alfabroteobakterijske AAF, s najvišom prosječnom incidencijom ljeti (51,38%), a najnižom u jesen (26,48%) (Slika 3.24). Za klad *Roseobacter* uočen je obrnuti obrazac nego za prethodno spomenute razrede. Najveća prosječna relativna brojnost zabilježena je u jesen (41,73%), a najmanja u ljeto (33,81%) i proljeće (34,07%) (Slika 3.24).



Slika 3.24. Relativna zastupljenost (%) AAF grupa Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria i *Roseobacter* dobivena IC-FISH metodom po sezoni za područje uzorkovanja u srednjem Jadranu (postaje ST101, CJ007 i CJ009; N uzoraka = 90) tijekom 2021./2022.

3.4.3. Sastav AAF zajednice na prostorno-vremenskoj skali određen metabarkodiranjem *pufM* gena

U ovom je jednogodišnjem istraživanju prvi put određena struktura AAF zajednice do taksonomske razine roda u području srednjeg Jadrana na prostorno-vremenskoj ljestvici. Uzimajući u obzir sastav zajednice određen metabarkodiranjem *pufM* gena biljega, PERMANOVA je pokazala statistički značajne razlike na Aitchisonovim udaljenostima u pogledu sezonalnosti (Pseudo-F=2,0572, $p=0,0037$, jedinstvene permutacije=9890, Tablica 3.8.a), ali ne za prostorni ili vertikalni profil (Tablica 3.8a). Usporedbe parova pokazale su da je ljeto jedino godišnje doba značajno različito od ostalih po sastavu zajednice (Tablica 3.8.b). PERMDISP test (faktor: sezona, $F=1,8899$, $p=0,2035$, 9999 permutacija) pokazao je da se grupe ne razlikuju u raspršenosti. PCA na Aitchisonovim udaljenostima *pufM* skupa podataka aglomeriranog na razinu roda pokazala je odvajanje ljetnih uzoraka, dok su glavni taksoni zaslužni za odvajanje bili pripadnici rodova *Puniceibacterium* te *UBA868* i obitelji Xanthobacteraceae te Maricaulaceae (Slika 3.25).

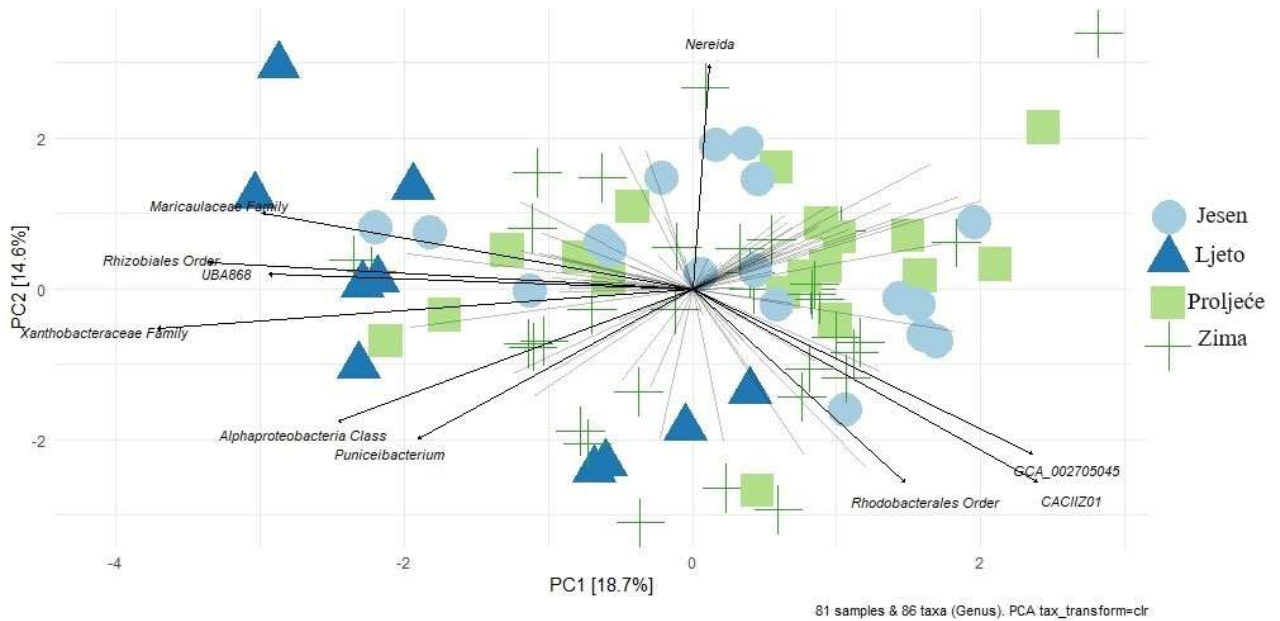
Tablica 3.8. Rezultati permutacijske multivarijantne analize varijance (PERMANOVA) na (a) Aitchisonovim udaljenostima *pufM* skupa podataka aglomeriranog na razinu roda. Faktori: Se-sezona (fiksni), Re-regija (fiksni), La-sloj (faktor smješten u regiji); (b) usporedbe parova za svako godišnje doba (W-zima, Sp-proljeće, A-jesen, S-ljeto). Zvezdicom su označene vrijednosti $p < 0,05$.

(a)

Faktor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Jedinstvene permutacije
Se	3	1331,7	443,9	2,0572	0,0037*	9890
Re	2	604,51	302,26	1,8323	0,0528	7809
La(Re)	5	795,15	159,03	0,70723	0,9791	9834
SexRe	6	1588,8	264,8	1,3683	0,0703	9875
SexLa(Re)	15	2845,1	189,67	0,84349	0,9247	9753
Res	49	11018	224,86			
Total	80	18218				

(b)

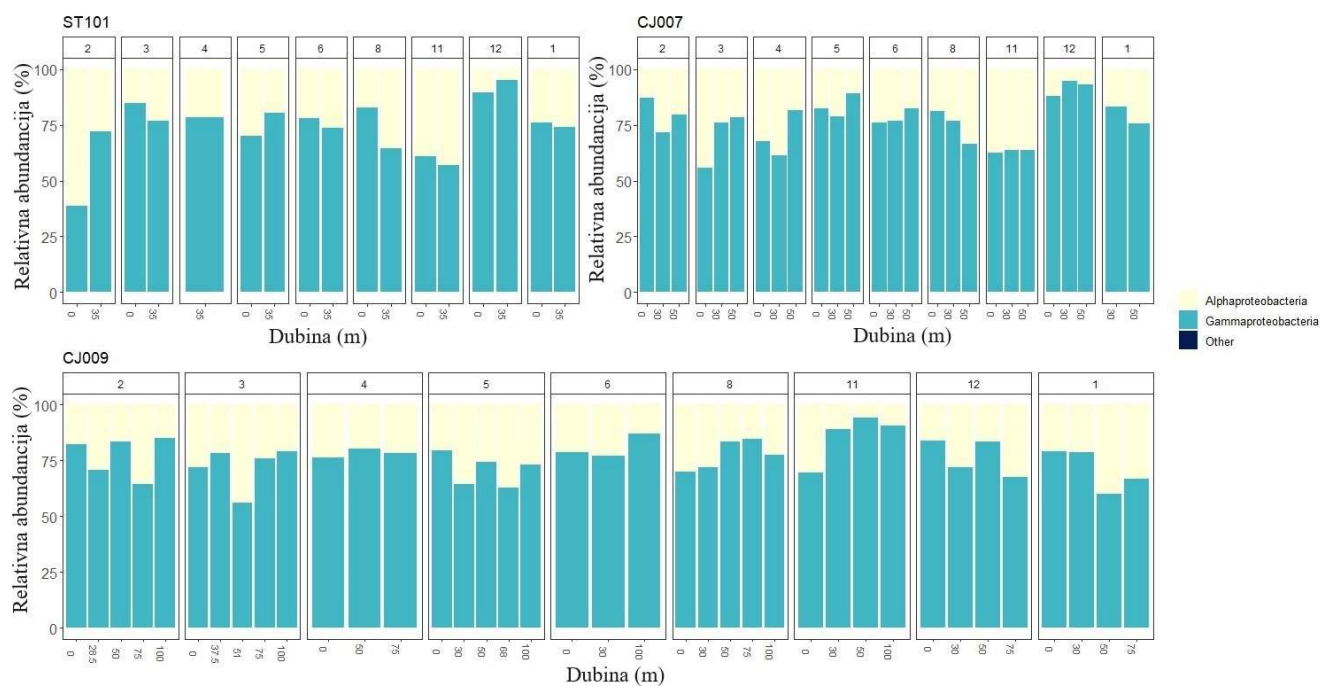
Grupe	t	P(perm)	Permutacije
W, Sp	1,0833	0,2694	9933
W, A	1,4719	0,0156*	9909
W, S	1,4807	0,0304*	9923
Sp, A	1,0437	0,3383	9891
Sp, S	1,5988	0,0115*	9916
A, S	1,6526	0,0079*	9926



Slika 3.25. Biplot prikaz rezultata analize glavnih komponenti (PCA, engl. *principal component analysis*) na Aitchisonovim udaljenostima *pufM* skupa podataka obojanih po sezoni za područje uzorkovanja u srednjem Jadranu (postaje ST101, CJ007 i CJ009; N uzoraka = 90) tijekom 2021./2022.

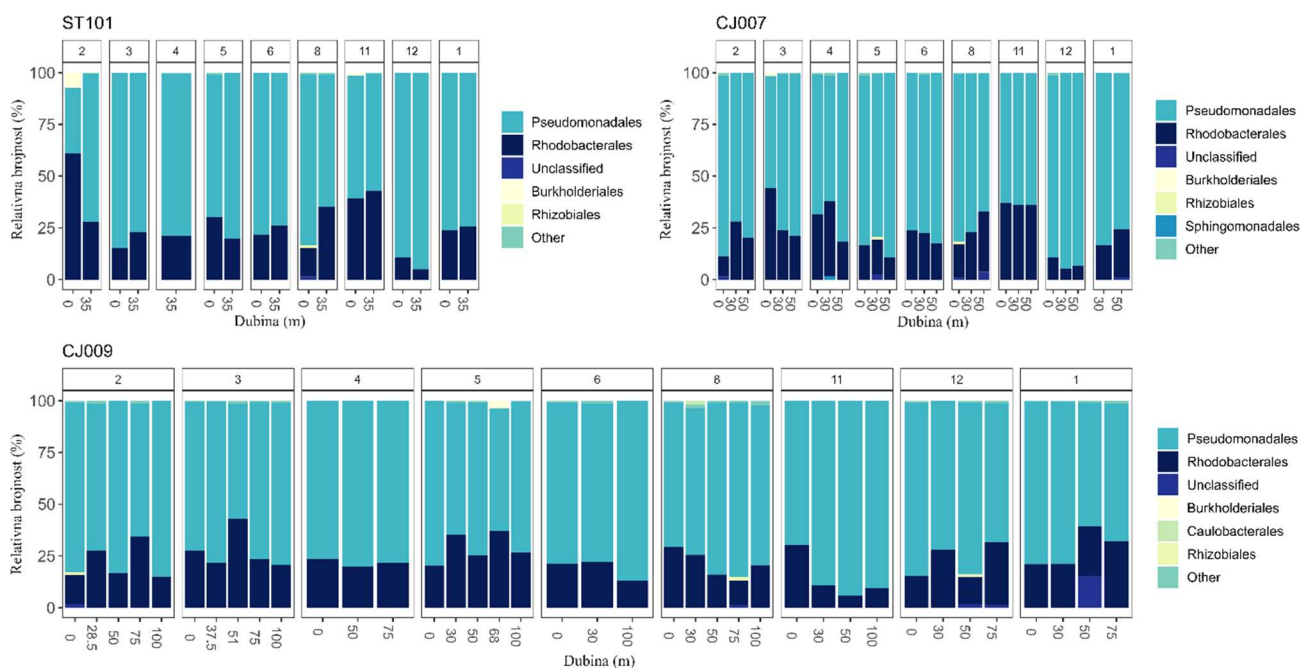
Na razini koljena, pripadnici Proteobacteria prevladavali su u svim uzorcima. Zanimljivo je da je koljeno Gemmatimonadota, predstavljeno s dva ASV-a (ASV 550 i ASV 559) iz obitelji Gemmatimonadaceae, uočeno u uzorku prikupljenom u travnju na dubini od 30 m na postaji CJ007 u vrlo niskoj relativnoj abundanciji (srednja vrijednost 0,002%). Ova dva ASV-a bila su istovremeno prisutna u spomenutom uzorku, kao i u nekoliko drugih uzoraka, ali u vrlo malom broju sekvenci ($n < 10$).

Na razini razreda, sastavom AAF zajednice dominirali su pripadnici Gammaproteobacteria (prosječno 75,9%) u svim uzorcima s najvišim vrijednostima zabilježenima u prosincu na postajama ST101 i CJ007 te u studenom na postaji CJ009. Najmanji relativni doprinos zabilježen je u veljači na površini mora na postaji ST101 kada je njihova relativna brojnost iznosila $< 40\%$ te u ožujku, također na površini mora na postaji CJ007 s relativnom brojnosti $\sim 50\%$ (Slika 3.26). Pripadnici razreda Alphaproteobacteria imali su prosječnu relativnu zastupljenost od 24,1% s najvećim relativnim doprinosom u površinskom sloju mora u veljači na postaji ST101 ($\sim 60\%$) te ožujku na postaji CJ007 ($\sim 40\%$).



Slika 3.26. Sezonska i prostorna raspodjela relativnih brojnosti (%) AAF razreda u području srednjeg Jadrana na postajama ST101, CJ007 i CJ009 tijekom 2021./2022. dobivenih sekvenciranjem *pufM* gena na Illumina Miseq uređaju (2x250bp). Kategorija „Other” predstavlja AAF razrede relativnih doprinosa <1%.

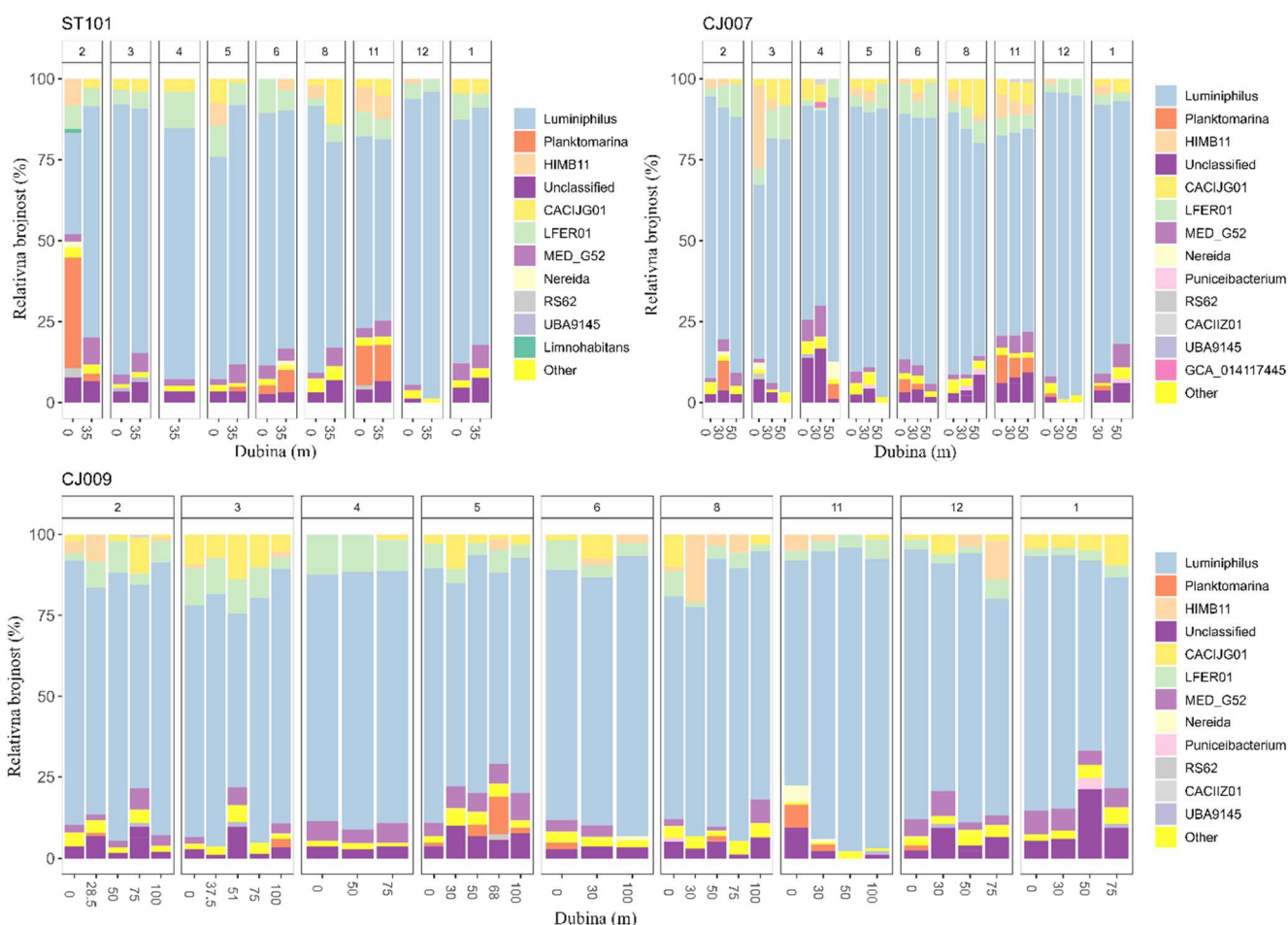
Na taksonomskoj razini reda, gamaproteobakterijski red Pseudomonadales prevladavao je na svim postajama i tijekom svih mjeseci unutar razdoblja uzorkovanja (Slika 3.27). Najniže relativne brojnosti pripadnika reda Pseudomonadales zabilježene su u veljači na površini mora postaje ST101 (<40%) i u ožujku, također na površini mora postaje CJ007 (~50%). Red Burkholderiales pokazao je veću relativnu brojnost (~10%) u veljači na površini postaje ST101 i u svibnju na dChlMax (nestandardna oceanografska dubina, 68 m) postaje CJ009. Alfaproteobakterijski red Rhodobacterales također je bio prisutan na svim postajama i mjesecima s najvećim relativnim doprinosom zabilježenim na površini mora u veljači na ST101 (~60%) i ožujku na CJ007 (~40%). Naprotiv, alfaproteobakterijski red Rhizobiales pojavio se u relativnoj brojnosti >1% u kolovozu na svim postajama (dubine 0 m na ST101 i CJ007 te 75 m na CJ009), svibnju na postaji CJ007 na dubini od 30 m, te u prosincu i veljači na postaji CJ009 na dubinama od 50 m odnosno 0 m. Red Sphingomondales imao je relativne brojnosti više od 1% samo na postaji CJ007 u travnju na dubini od 30 m, dok je red Caulobacterales imao najveću relativnu brojnost u kolovozu na postaji CJ009 i dubini od 30 m (Slika 3.27).



Slika 3.27. Sezonska i prostorna raspodjela relativnih brojnosti (%) AAF redova u području srednjeg Jadrana na postajama ST101, CJ007 i CJ009 tijekom 2021./2022. dobivenih sekvenciranjem *pufM* gena na Illumina Miseq uređaju (2x250bp). Kategorija „Unclassified” predstavlja taksonomski neklasificirane AAF redove.

Na finijim taksonomskim razinama, brojni AAF rodovi (71 od ukupno 86) pojavili su se u relativnoj brojnosti ispod 1%, dok je 15 najzastupljenijih rodova sačinjavalo 99% zajednice prema rezultatima sekvenciranja *pufM* gena (Slika 3.28). Općenito, taksonomski neklasificirani rodovi pridonijeli su do ~15% ukupnog broja sekvenci dok je rod *Luminiphilus* (red Pseudomonadales, obitelj Halieaceae) prevladavao na svim postajama, tijekom svih mjeseci i na svim dubinama s relativnim doprinosom većim od 90% u nekim uzorcima. Rod *Limnohabitans*, karakterističan za slatkovodne ekosustave, zabilježen je na površini mora na postaji ST101 u relativnim brojnostima >1%, ali ne prema otvorenom moru. Pripadnici alfa proteobakterijskih rodova *CACIIZ01* (u travnju i studenom na postaji CJ007 te veljači na CJ009) i *Puniceibacterium* (u svibnju, kolovozu i siječnju na postaji CJ007 te siječnju na CJ009) iz obitelji Rhodobacteraceae zabilježeni su u brojnostima > 1% na dubinama većim od 30 m, ali ne i na postaji ST101. Rod *Planktomarina* pokazao je najveću relativnu brojnost (~20%) na postaji ST101 u veljači na površini mora, kao i općenito veće brojnosti u studenom na postajama ST101 i CJ007. Rod *MED652*, koji pripada obitelji Rhodobacteraceae, bio je sveprisutan na svim postajama, godišnjim dobima i dubinama u relativnim brojnostima i do

10%, osim u prosincu na postajama ST101 i CJ007 (prisutan u doprinosu >1% samo na površini mora) te studenom na CJ009 gdje je njegova brojnost smanjena na <1% (Slika 3.28).

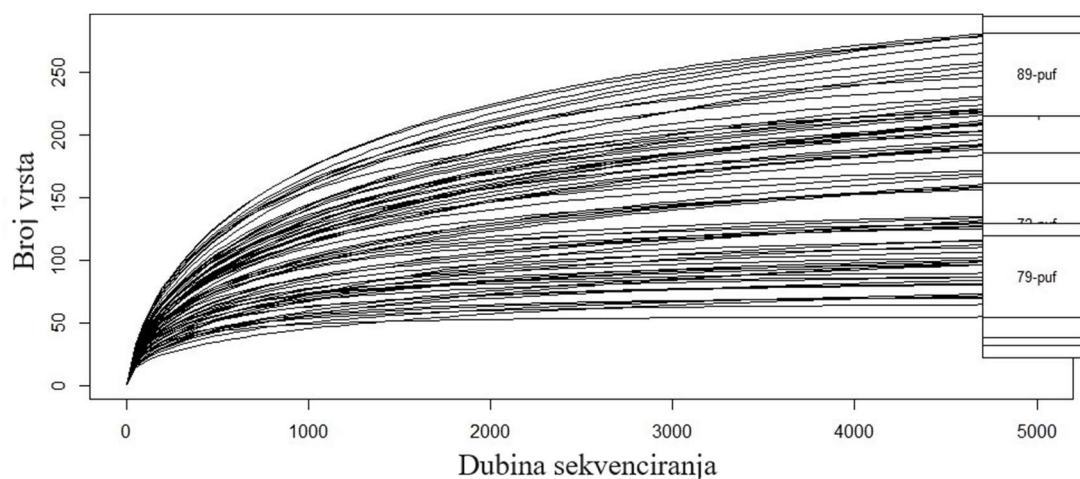


Slika 3.28. Sezonska i prostorna raspodjela relativnih brojnosti (%) AAF rodova u području srednjeg Jadrana na postajama ST101, CJ007 i CJ009 tijekom 2021./2022. dobivenih sekvenciranjem *pufM* gena na Illumina Miseq uređaju (2x250bp). Kategorija „Unclassified” predstavlja taksonomski neklasificirane AAF rodove.

Indeksi raznolikosti pokazali su najmanji prosječni broj ASV-ova zimi ($124,34 \pm 50,9$), dok je najveći prosječni broj uočen u jesen ($132,6 \pm 56,38$). Prosječni Shannonovi indeksi bili su najviši ljeti ($3,499 \pm 0,441$), a najniži u jesen ($3,393 \pm 0,682$), dok su prosječne vrijednosti za zimske i proljetne mjesecе bile između ($3,451 \pm 0,388$ odnosno $3,473 \pm 0,357$). Prosječna Pielouova ujednačenost pokazala je isti trend kao i Shannonovi indeksi, s najvišim prosječnim vrijednostima ljeti ($0,731 \pm 0,039$) i najnižima u jesen ($0,701 \pm 0,075$) (Tablica 3.9). Krivulja rarefakcije pokazala je zadovoljavajuću dubinu sekvenciranja uzoraka koja je bila dovoljna za adekvatan opis raznolikosti AAF zajednice (Slika 3.29).

Tablica 3.9. Indeksi alfa-raznolikosti AAF zajednice sa standardnim devijacijama (st. dev) temeljeni na *pufM* skupu podataka. Indeksi su prikazani po sezoni (prosječni broj ASV-ova, Shannonov i Pielouov indeks).

	Prosječni broj ASV-ova	St. dev. prosječnog broja ASV-ova	Prosječni Shannonov indeks	St. dev. Shannonovog indeksa	Prosječni Pielouov indeks	St. dev. Pielouov indeksa
Zima	124,34	50,90	3,451	0,388	0,729	0,045
Proljeće	129,93	45,59	3,473	0,357	0,722	0,041
Ljeto	129,68	50,94	3,499	0,441	0,731	0,039
Jesen	132,6	56,38	3,393	0,682	0,701	0,075



Slika 3.29. Krivulja rarefakcije koja pokazuje dovoljnu dubinu sekvenciranja po uzorku za procjenu ukupne AAF raznolikosti u srednjem Jadranu tijekom 2021./2022.

3.4.4. NG analiza podataka *pufM* metabarkodiranja aglomeriranih na razini reda

AAF redovi (clr-transfromirane vrijednosti) grupirani su u pet jedinstvenih jedinica odnosno okoliša (BMU). Za svaki BMU su izračunate prosječne vrijednosti bioloških i fizikalno-kemijskih varijabli kako bi se ustanovila veza između zajednice i okoliša. U svim su jedinicama redovi Pseudomonadales i Rhodobacterales bili sveprisutni i iskazivali konstantno visoke vrijednosti bez obzira na biotičke i abiotičke čimbenike okoliša. Naprotiv, redovi Acetobacterales, UBA8317, Gemmatimonadales, Xanthomonadales i Thalassobaculales imali su konstantno niske vrijednosti u svim okolišima (Slika 3.30).

BMU1 (34,57% ukupnog skupa podataka) opisuje toplo i nutrijentima najbogatije okruženje s najnižim prosječnim salinitetom (37,96) i prosječnom temperaturom 16,43 °C. Ovo je bila najveća jedinica koja je obuhvaćala 28 uzoraka. Uočena je najveća relativna zastupljenost gamaproteobakterijskog reda Burkholderiales i alfaproteobakterijske linije SP197. Suprotno navedenom, AAF redovi Rhizobiales, Sphingomonadales, Caulobacterales i Arenicellales zabilježeni su u manjim prosječnim vrijednostima u ovoj jedinici. Okolišni čimbenici koji definiraju ovu jedinicu su najveći apsolutni brojevi AAF-a, ukupnih heterotrofnih bakterija, *Synechococcus*-a i heterotrofnih nanoflagelata, zajedno s najvećim zabilježenim koncentracijama nitrata, otopljenog anorganskog dušika, fosfata, N/P omjera uz visoke koncentracije klorofila *a*. Uzimajući u obzir IC-FISH rezultate, *Roseobacter* je imao najviše prosječne relativne brojnosti u ovoj jedinici, dok su AAF-ovi taksonomski pripisani razredu Gammaproteobacteria imali najniže. U ovoj jedinici nije primijećena jasna sezonalnost niti prostorni obrasci.

BMU2 (19,75% ukupnog skupa podataka) karakterizira najviša zabilježena prosječna temperatura (16,63 °C) te povećane vrijednosti redova Rhizobiales, Sphingomonadales, Caulobacterales i Arenicellales. Ovaj okoliš je najplići, s prosječnom dubinom od 23,4 m, bez jasnog prostorno-sezonskog uzorka. Bakterije s visokim sadržajem nukleinske kiseline (HNA) imale su najveću apsolutnu abundanciju u ovoj jedinici, zajedno s visokom brojnošću *Synechococcus*-a. Nitrati su imali najniže prosječne koncentracije, a klorofil *a* najviše. Sve IC-FISH skupine imale su slične brojnosti.

BMU3 (14,81% ukupnog skupa podataka), slično kao i BMU2, je također karakteriziran redovima Rhizobiales, Sphingomonadales, Caulobacterales i Arenicellales za koje su zabilježene najveće vrijednosti u ovoj jedinici. Prosječna temperatura je također bila viša od 16 °C. Izdvojeni okolišni čimbenici koji opisuju ovu jedinicu su najniža bakterijska proizvodnja uz najnižu koncentraciju amonijaka. Uzimajući u obzir IC-FISH brojnosti, pripadnici razreda Gammaproteobacteria i Alphaproteobacteria imali su najveću relativnu abundanciju. Naprotiv, pripadnici klada *Roseobacter* imali su najmanju relativnu abundanciju.

BMU4 (22,22% ukupnog skupa podataka), za razliku od BMU2 i BMU3, karakteriziran je najnižim vrijednostima redova Rhizobiales, Sphingomonadales, Caulobacterales i Arenicellales, koji su ponovno pokazali zajednički obrazac pojavnosti. Suprotno navedenom, redovi Acetobacterales i Gemmatimonadales zabilježeni su u višim vrijednostima samo u ovom okolišu. Ova jedinica definirana je prosječnom temperaturom od 15,5 °C i najvišim koncentracijama nitrita. Prosječna dubina ovog okoliša iznosila je 42 m s najvećom apsolutnom

brojnošću *Prochlorococcus*-a i pikoeukariota. IC-FISH brojnosti pokazale su najnižu zastupljenost alfaproteobakterijskih AAF u ovoj jedinici.

BMU5 (8,64% ukupnog skupa podataka) je okoliš s najmanjim brojem od samo 7 uzoraka. Navedeno ukazuje da je ovo najrjeđi okoliš u ispitivanom području tijekom jednogodišnjeg uzorkovanja. Ova jedinica predstavlja najhladniji, nutrijentima najsiromašniji i najdublji okoliš, s prosječnom temperaturom od 15°C i prosječnom dubinom od 57,9 m. Salinitet je dosegnoo najviše vrijednosti od 38,71 u ovoj jedinici. Zanimljivo je da se AAF red UBA8366 pojavio u većim vrijednostima isključivo u ovoj jedinici, kao i neklasificirani red koji pripada razredu Alphaproteobacteria. Također je zabilježena najmanja brojnost ukupnih heterotrofnih bakterija, *Synechococcus*-a, *Prochlorococcus*-a, pikoeukariota, heterotrofnih nanoflagelata i AAF. Ovo je okoliš najoskudniji hranjivim tvarima, s najnižim koncentracijama nitrita i nitrata, otopljenog anorganskog dušika, fosfora, silikata, klorofila *a* i najnižim N/P omjerom. Međutim, koncentracija amonijaka i bakterijska proizvodnja dosegli su svoje maksimalne vrijednosti u ovoj jedinici. Uzimajući u obzir IC-FISH rezultate, *Roseobacter*, kao i gamaproteobakterijski AAF, pokazali su visoke relativne brojnosti. Ova je jedinica obuhvatila postaje prema otvorenom moru (CJ007 i CJ009) bez jasno uočene sezonalnosti.

UHB	0.4522	0.4096	0.4079	0.4157	0.3121
HIGH	25.343	29.288	28.892	25.472	26.529
SYN	19.526	19.249	15.154	15.651	11.931
PROCHL	1.6171	1.4425	1.1958	118.79	0.2671
PE	5.4614	3.3938	3.195	8.9533	2.71
BP	0.1274	0.128	0.1168	0.1565	0.2385
HNF	0.7497	0.6049	0.5127	0.5195	0.4681
AAP	1.6645	1.4277	1.0538	1.5327	0.852
Temp	16.439	16.628	16.178	15.371	15.017
Sal	37.967	38.191	38.457	38.357	38.71
NO ₃ ⁻	1.7343	0.8821	1.017	1.4039	0.9068
NO ₂ ⁻	0.222	0.1695	0.174	0.2806	0.1557
NH ₄ ⁺	0.2802	0.1933	0.1496	0.2102	0.3534
DIN	2.2685	1.2449	1.3407	1.8499	1.0243
PO ₄ ³⁻	0.0425	0.0373	0.0344	0.0357	0.0378
PTOT	0.1556	0.1773	0.1599	0.1873	0.1263
SiO ₄ ²⁻	2.1471	1.7983	1.5683	2.3332	1.5799
Chl <i>a</i>	0.3336	0.35	0.2733	0.335	0.2514
N/P	53.418	33.379	38.928	51.846	27.118
Alphaproteobacteria (%)	28.835	33.585	37.47	26.637	34.947
Gammaproteobacteria (%)	31.18	36.226	42.314	31.701	41.578
<i>Roseobacter</i> (%)	39.882	36.226	27.681	38.34	39.527
	BMU1	BMU2	BMU3	BMU4	BMU5
Pseudomonadales	9.3592	8.0675	8.786	10.43	8.6969
Rhodobacterales	8.4198	6.7861	7.2894	8.6113	7.8996
Unclassified (Alphaproteobacteria)	1.2974	2.2351	3.1981	-1.1265	4.9998
Rhizobiales	-0.1422	2.668	3.2207	-0.6277	1.4436
Burkholderiales	3.469	1.2635	-2.9749	0.1449	1.9003
Sphingomonadales	-0.7269	0.2067	0.3326	-1.3543	-0.9239
Caulobacterales	-2.3245	1.4653	1.7458	-1.7381	-2.8427
Arenicellales	-1.543	0.2733	0.5741	-1.711	-1.2847
SP197	0.2661	-0.5334	-2.297	-1.0703	-1.6652
UBA8366	-2.51	-2.2166	-1.9464	-1.64	2.2497
Acetobacterales	-1.6929	-3.004	-3.3936	-0.9584	-3.4122
UBA8317	-2.8029	-3.6686	-2.272	-1.9278	-3.4122
Gemmatimonadales	-2.7578	-2.9368	-3.5081	-1.4468	-3.4122
Unclassified (Proteobacteria)	-2.7055	-3.3779	-2.6793	-1.9278	-3.4122
Xanthomonadales	-2.8029	-3.6213	-3.0015	-1.73	-3.4122
Thalassobaculales	-2.8029	-3.6069	-3.0739	-1.9278	-3.4122

Slika 3.30. Prikaz rezultata NG analize temeljene na *pufM* skupu podataka aglomeriranom na razinu reda. Gornji dio tablice predstavlja biotičke (UHB, HIGH, SYN, PROCHL, PE, BP, HNF, AAP, postotci IC-FISH skupina) i abiotičke parametre (Temp, Sal, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, DIN, NTOT, SRP, PTOT, SiO₄²⁻, Chl *a*, N/P) izražene kao srednje vrijednosti za svaki BMU. Donji dio tablice predstavlja jedinstvene AAF redove s pripadajućim clr-vrijednostima. Zelena boja predstavlja najviše clr-vrijednosti, a crvena najniže.

3.4.5. NG analiza *pufM* metabarkodiranih podataka aglomeriranih na razini roda

NG analiza dodatno je provedena na razini roda kako bi se dobio detaljniji uvid u strukturu zajednice AAF na finijoj taksonomskoj razini, kao i odgovor navedene zajednice na okolišne čimbenike. Skup podataka dobiven sekvenciranjem *pufM* gena aglomeriran je na razinu roda (86 rodova) i clr-transformiran te je kao takav predstavljao ulazne podatke za NG algoritam koji je rezultirao s pet karakterističnih jedinica (BMU). Rod *Luminiphilus* (obitelj Halieaceae, red Pseudomonadales, razred Gammaproteobacteria) i nekulturable LFER01 (obitelj Rhodobacteraceae, red Rhodobacterales, razred Alphaproteobacteria) imali su gotovo iste visoke prosječne vrijednosti u svim jedinicama. Suprotno navedenom, brojni rodovi bili su prisutni u niskim vrijednostima u svim jedinicama (Slika 3.31, 3.32).

BMU1 (13,58% ukupnog skupa podataka) je okoliš bogat hranjivim tvarima s najnižim prosječnim salinitetom (37,568). Naprotiv, nitrati, amonijak, otopljeni anorganski dušik, fosfor i silikati imali su najveće prosječne koncentracije u uzorcima koji opisuju ovu jedinicu. Brojnost AAF-a bila je najveća u ovoj jedinici, kao i apsolutni broj ukupnih heterotrofnih bakterija i pikoeukariota. Nasuprot tome, bakterijska proizvodnja i brojnost heterotrofnih nanoflagelata bile su najmanje. Mjere raznolikosti, broj ASV-ova kao i Shannonov i Pielouov indeks dosegli su najviše vrijednosti u ovom okolišu. Neki od rodova AAF koji su imali najveću zastupljenost u ovoj jedinici su *Planktomarina*, *Nereida*, CYK10 i *Thalassobacter*, svi pripadnici obitelji Rhodobacteraceae (razreda Alphaproteobacteria) te RS62, *Rhodofera* i *Limnohabitans* iz obitelji Burkholderiaceae (razreda Gammaproteobacteria). U ovoj jedinici nisu primijećeni sezonski ni prostorni obrasci.

Jedinicu BMU2 (22,22% ukupnog skupa podataka) opisala je najviša prosječna temperatura zabilježena u svim okolišima (16,93 °C). U ovom okolišu nisu primijećeni jasni prostorno-sezonalni obrasci. Amonijak i klorofil *a* imali su najniže koncentracije uz niske koncentracije nitrata i nitrita. S obzirom na biotičke varijable, u ovom je okolišu zabilježena najmanja brojnost ukupnih heterotrofnih bakterija, *Synechococcus*-a, pikoeukariota te niska zastupljenost AAF i nanoflagelata. AAF rodovi koji su imali najviše prosječne vrijednosti bili su *Erythrobacter* iz obitelji Sphingomonadaceae (Sphingomonadales, Alphaproteobacteria), neklasificirani rod obitelji Xanthobacteraceae (Rhizobiales, Alphaproteobacteria), dva neklasificirana roda nepoznate obitelji koji pripadaju redu Rhizobiales zajedno s rodovima *Planktotalea* i *Palleronia* obitelji Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria).

BMU3 (20,99% ukupnog skupa podataka) definiran je najvećim zabilježenim prosječnim salinitetom (38,48). Drugi abiotički čimbenici koji se izdvajaju u ovom BMU-u su niske koncentracije nitrata i otopljenog anorganskog dušika. Suprotno navedenom, prosječne koncentracije klorofila *a* bile su povišene. U ovoj jedinici primijećena je najniža apsolutna brojnost AAF, ali je bakterijska proizvodnja bila najveća. Opaženi broj ASV-ova, Shannonov indeks i Pielouova ravnomjernost bili su visoki. Na razini rodova, vrijednosti *HIMB11* i *Nereida* iz obitelji Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria) bile su niže nego u ostalim jedinicama. Suprotno tome, rodovi *Roseovarius*, *Puniceibacterium* i *CACIIZ01* iz obitelji Rhodobacteraceae, kao i gamaproteobakterijski rod *CABYJX01* (Haliaceae, Pseudomonadales) pokazali su maksimalne vrijednosti u ovoj jedinici.

BMU4 (8,64% ukupnog skupa podataka) opisuje najmanji broj uzoraka (njih sedam). U ovoj je jedinici bila primjetna sezonalnost te su gotovo svi uzorci, osim jednog, bili prikupljeni u zimu. Uočen je i prostorni obrazac s prevladavajućim postajama prema otvorenom moru (CJ007 i CJ009). Ova jedinica je najplića (prosječna dubina 27,5 m) i definirana je najnižom prosječnom temperaturom od 14,7 °C te najnižim koncentracijama nitrata i silikata, dok je klorofil *a* bio viši od prosjeka u drugim jedinicama. Uzimajući u obzir biotičke varijable, najviša apsolutna brojnost *Synechococcus*-a i heterotrofnih nanoflagelata, kao i vrlo visoka brojnost AAF-a bili su izraženi u ovoj jedinici, dok je zastupljenost *Prochlorococcus*-a bila najmanja. Na razini rodova, *Planktomarina*, *CACIIZ01*, *Roseovarius* i *Planktotalea* iz obitelji Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria) pokazali su najniže prosječne vrijednosti dok su rodovi *CACIJG01*, *Rubricella*, *GCA2689605* (Hyphomicrobiaceae, Rhizobiales, Alphaproteobacteria) i *UBA868* (Arenicellales, Gammaproteobacteria) iskazali najviše vrijednosti u usporedbi s drugim jedinicama.

Jedinica BMU5 (34,57% ukupnog skupa podataka) prikupila je najveću količinu podataka, ukupno 28 uzoraka. Vrlo visoke prosječne vrijednosti saliniteta (38,35) i temperature veće od 16 °C zajedno s najvišim nitritima, silikatima i klorofilom *a* definiraju ovu jedinicu. Ovaj okoliš opisuje i najveća apsolutna brojnost *Prochlorococcus*-a i pikoeukariota, visoke brojnosti *Synechococcus*-a i AAF-a. Nasuprot tome, zabilježeni broj ASV-ova u ovoj jedinici bio je najmanji, kao i Shannonova raznolikost te Pielouova ujednačenost. Gamaproteobakterijski rod *Luminiphilus* i alfabroteobakterijski *LFER0*, rodovi dominantni u svim BMU-ovima, imali su najviše prosječne vrijednosti u ovoj jedinici. Iako su se rijetko pojavljivali u drugim jedinicama, *Roseobacter* i *Sphingomonas* iskazali su veće vrijednosti, dok su brojni rodovi poput *RS62*, *Rubricella*, *SP197* i *Erythrobacter* imali najniže.

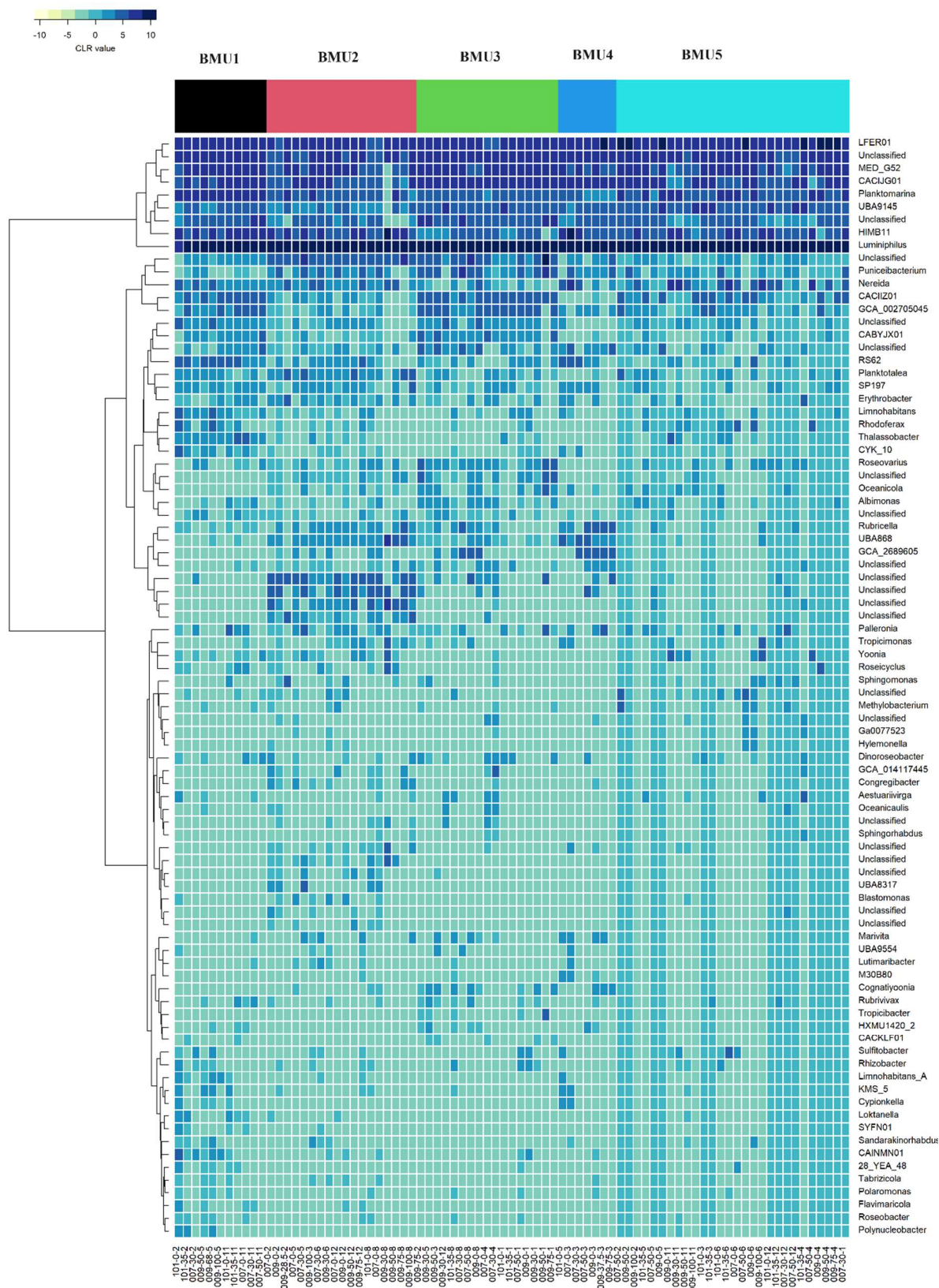
(A)

	BMU1	BMU2	BMU3	BMU4	BMU5
UHB	0.451427	0.351533	0.407891	0.448285	0.443266
HIGH	26.4	28.78333	26.74118	27.87143	25.38929
SYN	12.58091	12.14278	17.67941	22.03571	21.07321
PROCHL	0.651818	1.835	0.329412	0.298571	77.67786
PE	4.62	3.168333	3.429412	4.277143	8.2
BP	0.116133	0.142573	0.167406	0.130212	0.139352
HNF	0.48265	0.494083	0.513182	1.0978	0.672788
AAP	1.697351	1.105886	1.08585	1.630879	1.68552
Temp	16.07599	16.92542	15.43336	14.70072	16.26807
Sal	37.5684	38.22743	38.48246	38.22176	38.35429
NO ₃ ⁻	2.681635	1.001308	0.942566	0.723363	1.353109
NO ₂ ⁻	0.279182	0.128715	0.155439	0.090143	0.303476
NH ₄ ⁺	0.32178	0.167023	0.271988	0.243839	0.218447
DIN	3.282597	1.297046	0.929726	1.057345	1.845999
PO ₄ ³⁻	0.047078	0.037263	0.037721	0.038208	0.036016
PTOT	0.168046	0.17957	0.144508	0.139429	0.173276
SiO ₄ ²⁻	2.675364	1.775111	1.573	1.398429	2.244821
Chl <i>a</i>	0.261818	0.203333	0.368824	0.351429	0.383571
Observed_ASVs	183.6945	128.1111	170.4612	103.0729	86.72893
Shannon index	3.92574	3.426338	3.837466	3.360835	3.06256
Pielou index	0.754071	0.715623	0.752401	0.729028	0.692974

(B)

	BMU1	BMU2	BMU3	BMU4	BMU5		BMU1	BMU2	BMU3	BMU4	BMU5
Luminiphilus	9.741949	9.928631	9.9779	10.43751	11.02328	Marivita	-2.05323	-1.26256	-0.830781	0.861126	-1.312495
LFER01	7.3671	6.697403	7.064911	8.404225	8.48778	Unclassified	-2.281292	1.248384	-1.735859	-1.749214	-1.312495
Planktomarina	7.569891	4.73787	5.00247	3.607404	5.936185	Aestuiriivirga	-1.472869	-2.167159	-0.899547	-1.749214	-0.661049
CACIJG01	6.672978	5.293128	7.715082	8.075739	5.946254	CAINMN01	0.179622	-2.09241	-1.704624	-1.380265	-1.312495
Unclassified	7.346993	6.380042	7.539821	6.999793	7.266677	Sandarakinorhabdus	-1.070124	-1.885603	-2.153414	-1.353903	-1.087166
MED_G52	7.23577	5.684924	7.409006	6.248432	6.751969	Blastomonas	-1.997416	-1.132839	-2.153414	-1.749214	-1.259309
HIMB11	6.762336	6.778027	3.96433	6.742278	5.472142	Dinoroseobacter	-0.817917	-1.43384	-0.384317	-1.211597	-0.734262
Unclassified	5.431393	2.762482	6.047825	4.372539	3.687729	Oceanicaulis	-2.171203	-1.973118	-1.125153	-1.749214	-1.190029
UBA9145	4.326503	3.403088	5.32409	4.213933	5.517011	UBA8317	-2.281292	-0.878587	-2.153414	-1.749214	-1.312495
Unclassified	1.795997	5.323126	4.64076	1.699923	0.619785	Rubrivivax	-1.074771	-2.061183	-0.842865	-1.317754	-1.052917
Nereida	3.435095	3.098889	2.25574	2.288289	2.748661	Sphingomonas	-1.975769	-1.313979	-1.581773	-1.749214	-0.755375
Puniceibacterium	-0.789689	2.948876	3.947066	2.392036	0.966093	KMS_5	-0.888441	-1.825891	-2.007445	-0.405999	-1.22895
Unclassified	-2.016476	4.133028	0.395791	-0.216394	-1.115995	Rhizobacter	-1.04712	-1.575148	-1.175476	-1.749214	-1.070325
RS62	4.447487	0.968181	0.287004	2.506996	-0.426858	Unclassified	-2.281292	-0.348258	-1.934022	-0.719764	-1.195998
CACHZ01	4.705957	0.700699	4.93904	-1.239281	2.57522	Tropicimonas	-2.052981	0.193815	-1.696642	-0.307446	-0.70169
GCA_014117445	-2.281292	-0.798037	-1.214868	-1.749214	-1.17691	Lutimaribacter	-2.100402	-1.498066	-1.927615	-0.961586	-1.312495
Unclassified	-2.281292	3.382597	-1.251862	-0.234073	-0.998784	Unclassified	-2.281292	-0.061027	-2.153414	-1.749214	-1.312495
GCA_002705045	3.725535	-0.235634	3.980536	1.334711	1.614264	Roseicyclus	-0.521956	-0.711322	-1.966044	-1.749214	-1.113532
Unclassified	-2.281292	2.807692	-1.841675	-1.749214	-0.992795	Loktanela	-0.512485	-2.012946	-2.153414	-1.749214	-1.21665
CABYJK01	1.950494	-0.770327	3.053396	-1.239281	-0.750651	Methylobacterium	-1.89031	-1.888754	-1.593845	-1.749214	-0.625386
Unclassified	3.378146	0.316354	2.539827	-1.074966	0.12811	Hylemonella	-2.281292	-1.861454	-2.153414	-1.749214	-1.01677
Rubricella	-0.51126	1.55175	0.376236	3.357102	-0.810515	Ga0077523	-2.281292	-2.085619	-1.82182	-1.749214	-0.911695
GCA_2689605	-2.281292	-0.816415	-0.434094	2.809097	-1.312495	Polynucleobacter	-0.738555	-2.366424	-2.153414	-1.749214	-1.271673
UBA868	-1.697801	2.814127	-0.056789	3.8168	-1.053089	Unclassified	-2.281292	-2.054994	-1.424228	-1.365548	-0.772509
Planktotalea	0.938765	3.058915	0.411323	-1.396554	0.056293	Flavimaricola	-0.959848	-2.069514	-2.153414	-1.749214	-1.312495
Roseovarius	-0.682988	0.089767	2.437455	-1.749214	0.07088	Unclassified	-2.281292	-0.774568	-2.000756	-1.749214	-1.312495
Unclassified	1.137133	0.11585	1.789082	2.680819	-0.047491	M30B80	-2.281292	-2.172233	-1.99138	0.229941	-1.312495
SP197	1.754217	0.862318	-0.001993	1.275784	-0.302629	Limnohabitans_A	-0.604801	-2.021611	-2.153414	-1.118294	-1.312495
Thalassobacter	3.104187	-1.41174	-1.684416	-1.749214	-0.681167	HXMU1420_2	-1.455216	-2.366424	-1.253066	-0.895452	-1.312495
Unclassified	-2.281292	0.326818	1.076219	-1.749214	-1.052119	Congregibacter	-2.281292	-0.698516	-1.819315	-1.298503	-1.312495
Yoonia	-0.376225	-0.079798	-1.996747	-1.749214	-0.176347	Unclassified	-2.281292	-1.410821	-1.334215	-1.749214	-1.312495
Albimonas	-0.706966	-1.371665	0.902024	-1.749214	-0.501727	Unclassified	-2.281292	-1.384139	-2.153414	-1.749214	-1.184824
Erythrobacter	0.480205	1.205135	-0.346988	0.284668	-0.875173	28_YEA_48	-0.915386	-2.366424	-1.968915	-1.749214	-1.083123
CVK_10	1.499689	-1.406709	-1.467331	-0.535666	-1.15875	Sphingorhabdus	-2.281292	-2.155519	-1.595831	-1.749214	-1.17691
Palleronia	-0.275747	0.594593	-0.474497	0.161607	-0.08032	CACKLF01	-1.720431	-2.366424	-1.344834	-1.749214	-1.312495
Oceanicola	-2.281292	-0.88922	0.62651	-0.758782	-0.521084	Tabrizicola	-1.338091	-1.895675	-2.153414	-1.487928	-1.312495
Limnohabitans	2.222375	-0.984794	-0.742266	-0.645592	-0.47018	Cypionkella	-1.230627	-2.366424	-2.153414	-0.614107	-1.312495
Sulfobacter	-1.045842	-1.864198	-1.63511	-1.179005	-0.603346	Roseobacter	-1.101129	-1.995332	-1.898485	-1.749214	-1.284654
Rhodiferax	0.781513	-1.160414	-1.521368	-1.749214	0.05944	UBA9554	-2.066806	-1.982255	-1.72831	-1.121099	-1.312495
Unclassified	-1.372281	-1.198745	-1.766322	-1.749214	-0.070064	SYFN01	-1.247434	-2.257082	-2.153414	-1.749214	-1.312495
Unclassified	-1.908235	-0.978017	-0.059077	0.766153	-1.195852	Polaromonas	-1.368148	-2.237943	-1.881367	-1.339789	-1.276543
Cognatyyoonia	-2.281292	-1.87594	-0.221973	0.344463	-1.312495	Tropicibacter	-2.281292	-2.366424	-1.114786	-1.749214	-1.312495
Unclassified	-0.026652	-0.692627	-0.254954	-1.01948	-1.119694	Unclassified	-2.281292	-1.493717	-2.153414	-1.749214	-1.312495

Slika 3.31. Rezultati NG analize temeljene na *pufM* skupu podataka aglomeriranog na razinu roda. Lijevi dio tablice (A) predstavlja biotičke (UHB, HIGH, SYN, PROCHL, PE, BP, HNF, AAP, mjere raznolikosti) i abiotičke čimbenike (Temp, Sal, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, DIN, NTOT, SRP, PTOT, SiO₄²⁻, Chl *a*) izražene kao srednjak za svaki BMU. Desni dio tablice (B) predstavlja jedinstvene AAF rodove s pripadajućim clr-vrijednostima. Zelena boja predstavlja najviše clr-vrijednosti, a crvena najniže.



Slika 3.32. Prikaz sastava AAF zajednice na razini roda za svaki BMU pomoću toplinske karte. Hijerarhijsko klasteriranje napravljeno je na Aitchisonovim udaljenostima, a dendrogram Ward. D2 metodom aglomeracije. Uzorci su označeni prema postaji, mjesecu i dubini uzorkovanja u israživanju provedenom u srednjem Jadranu tijekom 2021./2022. godine.

4. RASPRAVA

4.1. Procjena pet protokola izolacije DNA i izravnog PCR-a

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je procijeniti izvedbene značajke, prednosti i nedostatke standardnog protokola izolacije DNA temeljenog na fenol/kloroform/izoamilnom alkoholu u odnosu na njegove promijenjene, kraće i sigurnije varijante u kojima je izostavljen korak dodavanja fenola i kloroforma, a DNA istaložena izopropanolom ili etanolom. Uz ovo, cilj je bila usporedba i testiranje metoda izolacije DNA pomoću dva protokola temeljena na komercijalno dostupnom kitu te izravnog PCR pristupa koji u potpunosti zaobilazi korak izolacije. Uspoređeni su prinosi DNA, rezultati sekvenciranja te sastav bakterijske zajednice između različitih metoda na uzorcima „mock“ zajednice i uzorcima mora. Glavni cilj je bio procijeniti u kojoj se mjeri određeni koraci klasičnog protokola temeljenog na fenolu mogu zamijeniti drugim alternativnim pristupima, posebice za uzorke mora gdje je upotreba fenola potencijalno nepotrebna osim ukoliko uzorci nisu bogati organskim sadržajem. Iako komercijalno dostupni kitovi danas sve češće zamjenjuju standardne izolacije temeljene na fenolu, obično su skuplji od standardnih metoda te uglavnom rezultiraju malenim prinosima DNA.

4.1.1. Uzorci „mock“ zajednice

Kao što je pokazano u prethodnim istraživanjima koja su procijenjivala različite metode izolacije DNA na uzorcima „mock“ zajednica i uzorcima okoliša (Muñoz-Colmenero *i sur.*, 2021), tehničke replike „mock“ zajednica u ovom su istraživanju pokazale visoku promjenjivost unutar metode izolacije s obzirom na prinose DNA. Međutim, takvi su rezultati jasnije opaženi na „mock“ zajednicama nego na okolišnim uzorcima. Razlika u postignutom prinosu DNA nije bila statistički značajna između metoda izolacije testiranih za „mock“ zajednice. Nešto niži prinos postignut je protokolima temeljenima na PowerWater Kitu. Navedeno je u suprotnosti s rezultatima prethodnih istraživanja (Djurhuus *i sur.*, 2017), gdje je ovaj protokol, temeljen na mehaničkom razaranju bakterijskih staničnih stijenki, rezultirao poboljšanom učinkovitošću lize stanica, generalno većim prinosima DNA i pokazao se superiornim u odnosu na metode izolacije koje se temelje isključivo na (bio)kemijskoj lizi. U skladu s rezultatima prethodnog istraživanja (Hart *i sur.*, 2015), nepovoljne čistoće DNA

izolata procijenjene preko omjera apsorbancija 260/280 i 260/230 nisu pokazale vezu s uspješnosti PCR reakcija ni uspješnosti sekvenciranja. S obzirom na rezultate sekvenciranja 16S rRNA gena biljega, iako je konvencionalnim protokolom temeljenim na biokemijskoj lizi fenol/kloroform/izoamilom dobiven neznatno veći prinos DNA u usporedbi s ostalim metodama te su sve PCR amplifikacije bile uspješne, uočeno je da je ovaj protokol generalno rezultirao manjim brojem dobivenih sekvenci po uzorku. Navedeno bi moglo biti posljedica inhibicije amplifikacije tijekom PCR reakcije ili samog procesa sekvenciranja, što je poznato za fenol (Schrader *i sur.*, 2012). Suprotno navedenom, izravni PCR općenito je rezultirao većim brojem dobivenih sekvenci po uzorku, ali i većim nedosljednostima između tehničkih replika, što se može povezati s činjenicom da su samo maleni dijelovi PES filtera korišteni u protokolu lize za dobivanje DNA kalupa nužnog za amplifikaciju.

U skladu s drugim studijama (Kembel *i sur.*, 2012; Gloor *i sur.*, 2017; Muñoz-Colmenero *i sur.*, 2021) i u ovom je istraživanju primijećeno odstupanje u relativnoj brojnosti „mock“ taksona od teoretski očekivanih vrijednosti, bez obzira na metodu izolacije. Brojni mogući razlozi ovog odstupanja mogli bi se pripisati uporabi neakseničnih kultura, rezidualnoj bakterijskoj kontaminaciji u kitovima, kapacitetu i točnosti sekvenciranja, pristranosti PCR početnica, netočnom taksonomskom dodjeljivanju i/ili varijabilnom broju kopija 16S rRNA gena (Caporaso *i sur.*, 2010b; Pei *i sur.*, 2010; Kembel *i sur.*, 2012; Vetrovsky & Baldrian, 2013; Salter *i sur.*, 2014; Parada *i sur.*, 2016; Stoler & Nekrutenko, 2021). Nepravilna odnosno nehomogena raspodjela bakterija koja se potencijalno mogla dogoditi tijekom pripreme „mock“ zajednica i samog procesa filtracije (zbog mogućeg prijanjanja bakterija na površine posuđa, druge stanice ili čestice) također je mogla utjecati na rezultate (Djurhuus *i sur.*, 2017). Međutim, svi bakterijski izolati i njihovi alikvoti bili su temeljito resuspendirani prije procesa filtracije te su sve tehničke replike unutar metode pokazale sličan trend u sastavu bakterijske zajednice. Stoga je vjerojatnije da je iskrivljeni sastav „mock“ zajednice rezultat (kombiniranih) spomenutih pristranosti.

U pokušaju dodatnog smanjenja utjecaja PCR amplifikacije na stope pogrešaka i neželjeno stvaranje kimera, u ovom istraživanju upotrijebljena je robusna „*high-fidelity*“ Q5 polimeraza s najvećom dostupnom vjernošću amplifikacije uz minimiziranje broja PCR ciklusa pri amplifikaciji gena iz DNA izolata (Sze & Schloss, 2019). Zanimljivo, izravni PCR protokol testiran u ovom istraživanju, koji koristi drugu DNA polimerazu, Platinum II Taq Hot-Start, zajedno s većim brojem od trideset i pet ciklusa amplifikacije, rezultirao je sličnim sastavom i relativnim brojnostima pripadnika „mock“ bakterijske zajednice kao i drugi protokoli izolacije u kombinaciji s Q5 polimerazom. Proizvođač (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD)

tvrdi da spomenuta Platinum polimeraza posjeduje visoku osjetljivost i specifičnost, otpornost na inhibitore, univerzalnu temperaturu prijanjanja početnica, brzu i robusnu amplifikaciju AT- i GC- bogatih oligonukleotidnih slijedova te je kompatibilna sa Sangerovim sekvenciranjem. Prema našim rezultatima, sve izravne PCR amplifikacije bile su uspješne za umnažanje V4-V5 regija 16S rRNA gena bez prethodne optimizacije protokola reakcije.

Unatoč tome što je dodana u istom omjeru kao i svi drugi pripadnici umjetno stvorene „mock“ zajednice, morska Gram-pozitivna bakterija *Microbacterium sp.* dominirala je sastavom zajednice u svim uzorcima i svim testiranim metodama. Poznato je da je broj kopija gena 16S rRNA prijavljen za koljeno Actinobacteria u prosjeku $3,16 \pm 1,7$ kopija po genomu (Vetrovsky & Baldrian, 2013). Međutim, broj kopija gena često je specifičan za određenu vrstu, a u nekim slučajevima čak i za soj. Prema rrnDB bazi podataka, postoji 28 vrsta *Microbacterium sp.* za čije je genome poznato da posjeduju od 1 do 3 kopije 16S rRNA gena po genomu (Vetrovsky & Baldrian, 2013; Stoddard *i sur.*, 2015; Corretto *i sur.*, 2020). Poznato je da su sekvence varijanti amplicona veoma pristrane prema vrstama s većim brojem 16S rRNA kopija gena te da postojeći alati dostupni za predviđanje broja kopija gena pokazuju nezadovoljavajuće performanse za veliku većinu procijenjenih genoma. Dakle, problem korekcije broja kopija gena koja bi potencijalno mogla poboljšati kvantitativne relativne procjene sastava mikrobne zajednice dobivene putem NGS-a trenutno nema zadovoljavajuće rješenje (Kembel *i sur.*, 2012; Louca *i sur.*, 2018). Uz navedeno, pokazalo se i da broj kopija 16S gena možda nije dovoljan za opisivanje pristranosti PCR amplifikacije (Brooks *i sur.*, 2015). Na primjer, u istraživanju autora Brooks *i sur.* (2015), Gram-pozitivna bakterija *Streptococcus agalactiae* posjedovala je najveći broj 16S kopija gena (7 kopija gena po genomu) među proučavanim bakterijama, ali je ipak bila nedovoljno zastupljena u odnosu na teoretski očekivane omjere pripadnika „mock“ zajednice. Zanimljivo je da je u našem eksperimentu *Microbacterium* bila u prosjeku najmanje prezastupljena u uzorcima izravnog PCR-a. Potencijalni razlog navedenom mogao bi biti kratki korak lize prije izravnog umnažanja koji vjerojatno nije bio toliko učinkovit za lizu stanične stijeke debelog peptidoglikanskog sloja ove Gram-pozitivne bakterije kao u drugim testiranim metodama.

Za razliku od bakterije *Microbacterium*, članovi morske obitelji *Flavobacteriaceae* pokazali su najnižu prosječnu relativnu brojnost u svim uzorcima „mock“ zajednice neovisno o metodi. Pripadnici ove obitelji ključni su razlagači raznovrsnih ugljikovih polimera te su brojčano nadmoćni u morskim staništima (Gavriilidou *i sur.*, 2020). *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* i *Glaciecola* također su bili nedovoljno zastupljeni u svim metodama, ali su zajedno s *Flavobacteriaceae* pokazali nešto veću prosječnu relativnu brojnost kada su bili

izolirani K2 protokolom u usporedbi s drugim metodama. Navedeno ukazuje da bi ti taksoni, iako svi Gram-negativne bakterije, mogli biti podložniji rigoroznoj mehaničkoj lizi stanica nego isključivo (bio)kemijskoj. Navedeno bi također moglo biti pokazatelj da bi ove vrste mogle biti nedovoljno zastupljene u istraživanjima temeljenima na 16S metabarkodiranju morskih okoliša ako se primijene identični protokoli izolacije, par početnica i uvjeti amplifikacije kao u našem istraživanju. Međutim, kao što su autori Hermans *i sur.* (2018.) istaknuli, važno je napomenuti da sposobnost određene metode da uspješno izolira DNA određenog taksona u „mock“ zajednicama ne mora nužno odgovarati sposobnosti metode da izolira DNA istog taksona u daleko složenijim prirodnim bakterijskim zajednicama.

Analiza podataka o sastavu zajednice otkrila je da postoje statistički značajne razlike između metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a te da su uočene razlike uzrokovane i pripadnicima „mock“ zajednica kao i neciljanim taksonima. Izdvojeni taksoni uglavnom su specifični za određenu metodu i potencijalno povezani s produljenim korakom (bio)kemijske lize bakterijskih stanica u nekim metodama ili nedostatkom iste u izravnom PCR-u. Općenito, izravni PCR pokazao je najmanji doprinos neciljanih taksona, vjerojatno zbog vremenski najkraćeg rukovanja uzorcima u laboratoriju. Biokemijske metode B1, B2 i B3 pokazale su slične obrasce bez uočenih razlika između metoda. Prema ovim rezultatima na „mock“ uzorcima, izolacija DNA taloženjem izopropanolom odnosno etanolom (B2 odnosno B3 protokol) bi mogla zamijeniti standardne protokole temeljene na fenolu kao znatno kraća i manje toksična alternativa.

4.1.2. Uzorci okoliša

Pronalaženje odgovarajućeg protokola izolacije DNA koji rezultira što stvarnijim prikazom bakterijske zajednice za određeni ekosustav ključno je za istraživanja temeljena na DNA metabarkodiranju. Kao što su prethodna istraživanja naglasila (Deiner *i sur.*, 2015; Djurhuus *i sur.*, 2017; Hermans *i sur.*, 2018), točna identifikacija vrsta prisutnih u određenom staništu i procjene bioraznolikosti daleko su važnije od procjene količine i kvalitete DNA dobivene određenom metodom izolacije. U skladu s prethodnim istraživanjima (Deiner *i sur.*, 2015; Djurhuus *i sur.*, 2017; Hermans *i sur.*, 2018; Liu *i sur.*, 2019; Muñoz-Colmenero *i sur.*, 2021), i u ovom su uočene značajne razlike u sastavu prirodnih bakterijskih zajednica istraživanih različitim metodološkim pristupima. Čini se da ne postoji jedna optimalna metoda koja bi se mogla primijeniti na svaku morsku bakterijsku zajednicu, već je dosljednost u primjeni određene odabrane metode ključna za smanjenje pristranosti neizbježno unesenih u

pripremi uzoraka i procesu izolacije DNA. U skladu sa Djurhuus *i sur.* (2017), uočene su značajne razlike u prinosima DNA između različitih protokola izolacije primijenjenih na uzorke mora. Kao što je prethodno objavljeno (Liu *i sur.*, 2019), i u našem su istraživanju dobiveni značajno niži prinosi DNA DNeasy PowerWater Kitom nego drugim metodama. Međutim, promjena u tehnologiji mehaničke homogenizacije kuglicama koje je QIAGEN uveo nakon 2020. godine rezultirala je poboljšanim DNA prinosima za uzorke mora prikupljene 2022. godine koji su od tada bili sličniji drugim metodama izolacije. Prethodno je uočeno da se prinosi DNA značajno povećavaju primjenom kuglica manjeg promjera jer se njima pogađa veća relativna bakterijska površina prilikom mehaničke lize te se korištenjem manjih kuglica povećava učinkovitost razaranja bakterijskih stijenki (Ma *i sur.*, 2020).

Zbog nekoliko detektiranih nedostataka prilikom korištenja Dneasy PowerWater Kit-a u kombinaciji s PES filterima kao što su malen prinos DNA i podcjenjivanje bioraznolikosti uzorka, predlažemo testiranje drugih komercijalno dostupnih kitova korištenih u literaturi (Djurhuus *i sur.*, 2017; Walden *i sur.*, 2017; Liu *i sur.*, 2019) poput primjerice DNeasy PowerSoil (QIAGEN), Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals) ili DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

U našem su istraživanju najveći prinosi DNA postignuti upravo protokolima temeljenima na biokemijskoj lizi stanica, B1, B2 i B3. Izgleda da je produljena biokemijska liza učinkovita čak i za razaranja staničnih stijenki Gram-pozitivnih bakterija, unatoč često istaknutoj potrebi za korakom mehaničke lize (Kennedy *i sur.*, 2014; Deiner *i sur.*, 2015; Pollock *i sur.*, 2018). Iako su se protokoli primijenjeni u našem istraživanju strogo slijedili bez naknadno uvedenih promjena, uočeno je da se iste metode ponašaju nedosljedno u pogledu dobivenih prinosa i učinkovitosti same izolacije. Navedeno bi moglo upućivati na potrebu za primjenom više od jedne metode izolacije u istom istraživanju na istom uzorku u svrhu dobivanja realističnijeg uvida u strukturu mikrobne zajednice, ako cijena navedenog pristupa nije previsoka. Prethodno je uočeno da su rijetki taksoni posebno osjetljivi na izbor pojedine metode izolacije (Liu *i sur.*, 2019), a isti je zaključak primijećen i u našem istraživanju gdje je primjena različitih metoda izolacije najviše utjecala na rijetko opažene ASV-ove (Stojan *i sur.*, 2023). Kako bi se poboljšala usporedivost između različitih metoda, predlaže se uklanjanje rijetkih OTU-ova, ili u našem slučaju, rijetkih ASV-ova (Liu *i sur.*, 2019; Stojan *i sur.*, 2023).

Značajne razlike u sastavu zajednice između različitih metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a primijećene su unutar oba skupa uzoraka, i za 2020. i 2022. godinu. Ovo je u skladu s jasnim razlikama uočenima između kemijskih i mehaničkih metoda lize stanica. Agresivno mehaničko razaranja kuglicama uzrokuje fragmentaciju DNA, što konačno može dovesti do

smanjenog opažanja bakterijske raznolikosti, dok (bio)kemijska liza rezultira genomskom DNA visoke molekularne težine (Wintzingerode *i sur.*, 1997). Izravni PCR zaobilazi ove probleme. Međutim, u ovom je istraživanju rezultirao značajno drugačijim sastavom bakterijske zajednice, posebno u odnosu na specifične taksone poput pripadnika obitelji Parvibaculaceae ili klada SAR86, te smanjenom detekcijom roda *Microbacterium* ili kontaminanata poput *Burkholderia–Caballeronia–Paraburkholderia*. Kao što je prethodno spomenuto, odabir metode izolacije DNA utječe i na učestale kao i na rijetke taksone, no na rijetke utječe značajno više. Na uzorcima okoliša, biokemijske metode B1, B2 i B3 pokazale su najmanje razlike među sobom. Međutim, uočena je povećana varijabilnost između tehničkih replika unutar iste metode, dosljedno reproducirana između oba skupa uzoraka prikupljenima 2020. odnosno 2022. godine (Stojan *i sur.*, 2023).

Jedan od glavnih nedostataka ovog istraživanja jest neujednačen broj tehničkih replika prikupljenih 2020. godine, što bi se moglo zaobići u daljnjim istraživanjima korištenjem većeg i dosljednijeg broja tehničkih replika za svaku metodu. Ako je moguće, preporučeno je koristiti i veću dubinu sekvenciranja. Za bolju procjenu učinkovitosti svake metode, interni DNA standard poznate količine mogao bi se uvesti tijekom DNA izolacije i kvantificirati pomoću qPCR-a (Boström *i sur.*, 2004; Fecskeová *i sur.*, 2021).

Zaključno, uputno je koristiti umjetno stvorene „mock“ zajednice prilikom optimizacije protokola u planiranju analiza ekoloških uzoraka kako bi se što bolje utvrdile pogreške neizbježno uvedene prilikom rukovanja uzorcima ili procesom sekvenciranja (Yeh *i sur.*, 2018; Stojan *i sur.*, 2023). Uz metodu izolacije DNA, postoje brojne dodatne i neizbježne pristranosti kojih treba biti svjestan u istraživanjima temeljenima na metabarkodiranju, poput strategije uzorkovanja, uvjeta skladištenja uzoraka, izbora para početnica i ciljane regije gena biljega od interesa, uvjeta PCR amplifikacije, pripreme knjižnica, odabira platforme za sekvenciranje i bioinformatičke analize podataka (Hermans *i sur.*, 2018; Pollock *i sur.*, 2018). Za svaki od navedenih koraka nužan je detaljan opis postupaka i dosljednost u njihovoj primjeni tijekom istraživanja.

4.2. Analiza ukupne mikrobne zajednice srednjeg Jadrana

Poznavanje bakterijske raznolikosti i njene promjenjivosti neizostavno je za razumijevanje ključnih procesa posredovanih pikoplanktonskom zajednicom u morskom ekosustavu. Rezultati ovog istraživanja se temelje na primjeni kombinacije dviju molekularnih

metoda, CARD-FISH i metabarkodiranja 16S rRNA gena, te NG algoritmu za grupiranje uzoraka mikrobne zajednice u slične podjedinice koje su potom opisane uz pomoć bioloških i fizikalno-kemijskih okolišnih uvjeta. Općenito, ekološki uvjeti istraživanog područja mogu se opisati kao oligotrofni, sa smanjenim koncentracijama dušika i fosfora, niskom bakterijskom produktivnošću, a u posljednje vrijeme i tendencijom povećanja saliniteta u odnosu na višegodišnje prosjeke (Vilibić *i sur.*, 2012; Beg Paklar *i sur.*, 2020). Iz prethodnih je istraživanja poznato da se temperatura od 16°C smatra ekološkom temperaturnom granicom za procese bakterijske proizvodnje i rasta, stoga je ista temperaturna granica korištena za definiranje toplog odnosno hladnog okruženja za daljnju raspravu o ovim rezultatima (Šolić *i sur.*, 2017).

4.2.1. Kvantitativna analiza

Prema udjelima CARD-FISH bakterijskih skupina te rezultatima NG algoritma, SAR11 je prevladavao u području istraživanja, a slijedile su Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacteroidetes i klad *Roseobacter*. SAR11 je također pokazao značajan udio u bakterijskim zajednicama u prethodnim istraživanjima u Jadranskom moru (Manti *i sur.*, 2012; Korlević *i sur.*, 2015). Poznato je da ova mala bakterija ubikvot prevladava u oligotrofnim morskim ekosustavima i može sačinjavati i do 33% mikrobnih zajednica eufotičkih zona (Morris, *i sur.*, 2002; Alonso-Sáez & Gasol, 2007; Nakai, 2020). SAR11 je K-strateg, odnosno spororastuća bakterija relativno stabilnih brojnosti u oligotrofnim uvjetima (Giovannoni, 2017). Kako bi opstali u uvjetima oligotrofnih ekosustava, slobodno živući su organizmi značajno smanjili potrebe svog metabolizma i veličinu genoma, na taj način reducirajući potrebe za hranjivim tvarima u okolišima siromašnim nutrijentima (Giovannoni *i sur.*, 2005; Zhao & Andersson, 2014). Proučavano područje Jadrana karakterizira niska bakterijska proizvodnja te prevladavanje LNA bakterija (Šantić *i sur.*, 2013). Mary *i sur.* (2006.) otkrili su da upravo LNA bakterije prevladavaju u zajednici SAR11 bakterija, što je u skladu s hipotezom Santosa *i sur.* (2012) koja tvrdi da su spororastući organizmi otporniji na uvjete nutrijentima siromašnih okoliša (Mary *i sur.*, 2006; Santos *i sur.*, 2012).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da SAR11 prevladava u okruženju CFBMU1, koje se na temelju bioloških i fizikalno-kemijskih parametara (visok udio pripadnika klada *Roseobacter*, visoke apsolutne brojnosti *Prochlorococcus*-a, pikoeukariota, AAF-a, veća bakterijska proizvodnja i više koncentracije Chl *a* pri temperaturi ~ 16 °C) može opisati kao

produktivno. Osim toga, SAR11 je prevladavao i na području otvorenog mora s iznimno visokim vrijednostima saliniteta (okoliš CFBMU8) te u hladnijem okruženju s nižim salinitetom i povećanim sadržajem nitrata (okoliš CFBMU9). Ovi podaci ukazuju na to da ova skupina, sastavljena od eurivalentnih mikroorganizama koji uspješno nastanjuju različite ekološke niše, prevladava u raznolikim uvjetima okoliša oligotrofnog područja (Šantić *i sur.*, 2023).

Obuhvaćajući već spomenute pripadnike klada SAR11, pripadnici razreda Alphaproteobacteria vjerojatno su najpoznatija i najbrojnija skupina od svih morskih Proteobacteria (Yarza *i sur.*, 2014). NG analiza pokazala je da pripadnici ovog razreda prevladavaju u dubljim i slanijim slojevima mora. U skladu s prethodnim istraživanjima, Alphaproteobacteria su pokazale sezonsku dinamiku, s najvećim brojnostima zimi, kao što je utvrđeno i u La Mancheu (Mary *i sur.*, 2006; Teira *i sur.*, 2009, Šantić *i sur.*, 2023). Općenito, njihov veći doprinos se može objasniti činjenicom da su dobri konkurenti u okolišima siromašnim hranjivim tvarima (Pinhassi & Berman, 2003). Dosadašnja istraživanja pokazala su važnost i prevalenciju ove skupine u južnom Jadranskom moru i priobalnim područjima Sredozemnog mora (Alonso-Sáez & Gasol, 2007; Šantić *i sur.*, 2021).

Prevladavanje pripadnika Bacteroidetes u bakterijskoj zajednici opisano je u okolišima CFBMU4 i CFBMU6 koji pokazuju njihovu brojčanu dominaciju istovremeno s velikim brojnostima pripadnika klada *Roseobacter*, ukupnih AAF-a, maksimalnom bakterijskom proizvodnjom, najvišom koncentracijom SRP-a, visokim sadržajem amonijaka i povišenom temperaturom. Navedeno opisuje topli i produktivni morski okoliš obogaćen hranjivim tvarima. Osim toga, sezonska raspodjela zajedno sa značajnim utjecajem temperature pokazuje prevalenciju pripadnika Bacteroidetes u proljeće i visoki doprinos ove skupine u sloju dubokog klorofilnog maksimuma bez obzira na godišnje doba. Poznato je da se pripadnici ove skupine pojavljuju u raznolikim morskim sredinama, međutim prevladavaju u eutrofnim okolišima gdje djeluju kao razlagači organske tvari (Eilers *i sur.*, 2001). Također je pokazano da su povezani s visokom bakterijskom biomasom, bakterijskom proizvodnjom i cvjetanjem fitoplanktona. (Eilers *i sur.*, 2001; Teira *i sur.*, 2008, 2009; Teeling *i sur.*, 2012).

Rezultati NG analize pokazuju da doprinos pripadnika razreda Gammaproteobacteria može biti značajan pri višim temperaturama što potvrđuju brojna prethodna istraživanja koja su prijavila porast brojnosti pripadnika Gammaproteobacteria i Bacteroidetes u toplijim godišnjim dobima, što je povezano s već spomenutim cvjetanjem fitoplanktona, ali i višim koncentracijama otopljenog organskog ugljika te većim ukupnim brojem bakterija (Mary *i sur.*, 2006; Alonso-Sáez & Gasol, 2007; Teira *i sur.*, 2009; Teeling *i sur.*, 2012; Sintés *i sur.*, 2013;

Korlević *i sur.*, 2015; Sánchez *i sur.*, 2020). Uz navedeno, Teira *i sur.* (2009) pretpostavili su da se brojnost Gammaproteobacteria u priobalnim ekosustavima može povezati s nestabilnošću vodenog stupca, odnosno da je njihova brojnost manja zimi kada je vodeni stupac izloženiji utjecaju vertikalnog miješanja (Teira *i sur.*, 2009).

Pripadnici klada *Roseobacter* bili su općenito prisutni u manjem broju u usporedbi s drugim skupinama bakterija, ali njihov se doprinos ne može smatrati zanemarivim. Okoliši koji pokazuju prevalenciju Bacteroidetes, CFBMU4 i CFBMU6, također uključuju i veći doprinos ove skupine. Uz visok relativni udio *Roseobacter*-a, podrazumijevali su i najveće brojnosti AAF, bakterijsku proizvodnju, veću koncentraciju amonijevih iona, maksimalnu koncentraciju SRP-a i više temperature mora. S obzirom na prostornu i sezonalnu distribuciju, veća brojnost uočena je u eutrofnim obalnim područjima nego u oligotrofnom otvorenom moru, dok su više vrijednosti zabilježene u otvorenom moru tijekom ljeta. U prethodnim istraživanjima je također zabilježen veći doprinos pripadnika klada *Roseobacter* ljeti (Mary *i sur.*, 2006; Teira *i sur.*, 2009; Teeling *i sur.*, 2012). Mnogi autori istaknuli su važnost ove skupine u obalnim područjima ili predložili da *Roseobacter* preferira eutrofne uvjete okoliša bogatih hranjivim tvarima (Moran *i sur.*, 2003; Brown *i sur.*, 2005; Alonso-Sáez & Gasol, 2007; Fuhrman & Hagestorm, 2008; Koblížek, 2015). Kao i u rezultatima prikazanim ovdje, mnoga prethodna istraživanja (Pinhassi *i sur.*, 2006; Teira *i sur.*, 2008; Sandaa *i sur.*, 2009; Fecskeová *i sur.*, 2021) pokazala su da ova metabolički aktivna skupina ovisi o okolišu s dovoljno fosfora te može doseći visoke relativne brojnosti i do čak 20% ukupne bakterijske populacije u priobalnim područjima i 15% ukupne bakterijske populacije na otvorenom moru, odnosno 30% i 20% u ovom istraživanju.

Uzimajući u obzir sezonsku raspodjelu bakterijskih grupa, SAR11 je prevladavao u proljeće i jesen, kada je Redfieldov omjer vrijednosti 61,89 upućivao da je ovo najoligotrofnije razdoblje u okolišu inače siromašnom hranjivim tvarima, što je u skladu s prethodnim nalazima u Jadranskom i Sredozemnom moru (Alonso-Sáez & Gasol, 2007; Korlević *i sur.*, 2015). Uz navedeno, uočena je sukcesija između SAR11 i ostalih pripadnika Alphaproteobacteria (koje su dosegle vrhunac zimi pri najvećoj slanosti mora), te između SAR11 i Gammaproteobacteria (koje su imale vrhunac ljeti). Pripadnici Bacteroides i *Roseobacter* pokazali su isti odgovor s povećanim udjelima u ukupnoj bakterijskoj zajednici u toplijem i hranjivim tvarima obogaćenom okolišu. Ovi rezultati upućuju na činjenicu da pripadnici klada SAR11 prevladavaju u različitim ekološkim uvjetima oligotrofnog ekosustava.

Rezultati NG analize pokazali su da obrasci prevladavanja specifične bakterijske skupine općenito nisu povezani s vremenom ni prostorom, već su posljedica promjena

relativnog sastava zajednice i povoljne kombinacije različitih čimbenika okoliša. Stoga se okoliš koji je obuhvatio najveći broj uzoraka, CFBMU2, u kojem su prisutni jednaki udjeli svih bakterijskih skupina, može opisati kao početno stanje pripravnosti (engl. *stand-by state*) koje biva stimulirano različitim čimbenicima okoliša (Lambert *i sur.*, 2019; Šantić *i sur.*, 2023).

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s nedavnim istraživanjem u južnom Jadranu gdje dobiveni klasteri također nisu bili prostorno ni sezonalno definirani (Šantić *i sur.*, 2021). Umjesto toga, proučavano područje predstavljalo je mozaik različitih uvjeta okoliša koji se izmjenjuju iz jednog stanja u drugo na vremenskoj skali. U svakom od stanja okoliša razvija se posebna struktura mikrobne hranidbene mreže koja pokazuje dosljedne i ponovljive promjene iz jednog stanja u drugo usko povezane s promjenama uvjeta okoliša (Šolić *i sur.*, 2022).

4.2.2. Kvalitativna analiza

Na temelju činjenice da se struktura mikrobne hranidbene mreže nužno mijenja kao odgovor na stalno promjenjive uvjete okoliša, primijenjen je NG algoritam na podatke dobivene metabarkodiranjem 16S rRNA gena. Navedena analiza omogućila je uočavanje različitih bakterijskih i arhealnih koljena koja prevladavaju u specifičnim uvjetima ili uvjete u kojima se njihova relativna zastupljenost smanjuje. Kao i prethodna NG analiza temeljena na CARD-FISH metodi, analiza na razini koljena također je pokazala da obrasci prevlasti određenog taksona nisu povezani ni s vremenom ni s prostorom, već su posljedica promjena u relativnim udjelima specifičnih OTU-ova ili određene kombinacije abiotičkih i biotičkih okolišnih čimbenika (Šantić *i sur.*, 2023).

Na višim taksonomskim razinama, koljena koja su pokazala neovisno ponašanje ili obrazac dominacije u odnosu na promjene uvjeta u sva četiri BMU-a uključuju Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidota, Actinobacteriota, Verrucomicrobiota, Marinimicrobia i Planctomycetota. Može se pretpostaviti da su navedena koljena doista eurivalentni mikroorganizmi prilagođeni na različite promjene u svojstvima ekosustava. Sličan je obrazac uočen i u prethodnim istraživanjima u Jadranu (Šantić *i sur.*, 2021), gdje su rezultati pokazali prevalenciju eurivalentnih koljena Proteobacteria i Cyanobacteria, a slijedile su Bacteroidota i Actinobacteriota, dok su promjene na finijim taksonomskim razinama bile povezane s različitim uvjetima okoliša na različitim dubinama. Obrasci uočeni za druga koljena mogu se povezati s različitim termohalinskim svojstvima morske vode i dostupnošću hranjivih tvari.

Dva arhealna koljena Thermoplasmata i Crenarchaeota zabilježena su u značajnoj relativnoj abundanciji u različitim okolišima, slično kao i u Južnom oceanu (Sow *i sur.*, 2022). Međutim, u ovom su istraživanju najveće brojnosti uočene u uvjetima najviših prosječnih vrijednosti saliniteta te rezultati ovog istraživanja predstavljaju prvi prostorno-vremenski obrazac sastava Archaea predstavljenih koljenima Crenarchaeota i Thermoplasmata u Jadranskom moru. Osim Archaea, veću su relativnu brojnost pokazali Nitrospinota, SAR324 i Chloroflexi u okolišu s najvećim prosječnim salinitetom obogaćenim nitratima i nitritima.

Iako je danas uvriježeno mišljenje kako su arheje sveprisutne u različitim ekosustavima, a ne samo u ekstremnima kako se donedavno smatralo, zbog nedostatka kulturabilnih predstavnika i malenog broja sekvenciranih genoma znanje o njima ostaje veoma ograničeno (Rinke *i sur.*, 2019; DeLong, 2021). Arheje su među najbrojnijim mikroorganizmima u mezopelagičkom sloju svjetskih oceana bez obzira na dostupnost svjetlosti, gdje mogu sačinjavati i više od 30% ukupnog morskog pikoplanktona (Karner *i sur.*, 2008). Unatoč njihovoj širokoj rasprostranjenosti u morskim staništima i važnosti u globalnim biogeokemijskim ciklusima kruženja ugljika, remineralizaciji dušika i proizvodnji dušikovog oksida, prilično malo je poznato o koljenu Crenarchaeota, također poznatom kao Thaumarchaeota, ili *Marine Group I* (Pinto *i sur.*, 2020; Zhong *i sur.*, 2020). Rod *Candidatus Nitrosopumilus*, pronađen u dubokim slojevima mora i slanom okolišu, kemolitoautotrofni je pripadnik koljena Crenarchaeota (Thaumarchaeota) koji uglavnom koristi amonijak i ureu kao izvore energije (Zhong *i sur.*, 2020). Poznato je da je *Candidatus Nitrosopumilus* mezofil te pokazuje osjetljivost na svjetlo uz obveznu metaboličku potrebu za solju s optimalnim rastom pri salinitetu u rasponu od 25 do 37‰. Stoga je bilo očekivano da će se pronaći u uglavnom dubljim slojevima mora (Qin *i sur.*, 2016), no u rezultatima predstavljenim ovdje zabilježen je na svim postajama i dubinama, potencijalno upućujući na njegovu eurivalentnu prirodu. *Candidatus Nitrosopelagicus*, zabilježen u svim uzorcima u našem istraživanju, ali s najvećom prosječnom relativnom zastupljenošću na dubinama ispod 50 m, također je kemolitoautotrofni arheon koji posjeduje sposobnost oksidacije amonijaka. Relativno nedavno je opisan kao sveprisutan u otvorenim oceanima s prijavljenom genomskom i proteomskom karakterizacijom (Santoro *i sur.*, 2015). Thermoplasmata, pronađena u svim uzorcima u ovom istraživanju, još je jedna veoma raznolika i ključna skupina arheja u ciklusu kruženja dušika u morskom ekosustavu (DeLong, 2021). Glavni predstavnici navedenog koljena anotirani su kao *Marine Group II*, nedavno pripisani redu Poseidoniales te u manjoj mjeri *Marine Group III* (Haro-Moreno *i sur.*, 2017; Rinke *i sur.*, 2019; DeLong, 2021). Pripadnici *Marine Group II*, bez još uvijek precizno opisane ekološke uloge, smatraju se najzastupljenijim arhealnim heterotrofima

u površinskim slojevima oceana i dubokom klorofilnom maksimumu. Uz navedeno, pokazuju izraženu nižu pojavnost u dubljim slojevima mora te primjetne prostorno-vremenske promjene u brojnosti (Zhang *i sur.*, 2015). S druge strane, njihovi vjerojatno bliski srodnici *Marine Group III*, za koje se smatra da su prisutni u malim brojnostima u mezopelagičkim i batipelagičkim zonama oceana, sposobni su za fotoheterotrofiju pomoću proteorhodopsina (Haro-Moreno *i sur.*, 2017). Uz samo nekoliko istraživanja koja prijavljuju o *Marine Group III* u eufotičkoj zoni (Haro-Moreno *i sur.*, 2017), u našem su istraživanju članovi ove arhealne skupine pronađeni na svim postajama i dubinama do 100 m s izraženim višim brojnostima u dubljim slojevima, naročito zimi. U skladu s prethodnom studijom provedenom u priobalnom Sredozemnom moru (Galand *i sur.*, 2010), najveća relativna brojnost arheja zabilježena je u prosincu i siječnju na svim postajama, s vrlo malom relativnom brojnošću tijekom ljeta, osim na dubinama od 75 i 100 m na CJ009 postaji. Štoviše, uz arheje, koljena Acidobacteriota, Chloroflexi, Gemmatimonadota, Marinimicrobia, Nitrospinota i Planctomycetota imali su najveću relativnu brojnost u dubljim i izrazito slanim okolišima obogaćenim nitratima i nitratima.

Suprotno obrascu pojavnosti arheja, koljeno Verrucomicrobiota pokazalo je veće relativne brojnosti u toplijem i produktivnijem okolišu. Veća brojnost pripadnika Verrucomicrobiota kao važnih konzumenata fukoze i ramnoze prethodno je povezana s početkom cvjetanja dijatomeja, gdje su sačinjavali i do 8% ukupnog bakterioplanktona (Orellana *i sur.*, 2022). Kao što je prethodno pokazano, pripadnici raznolikog koljena Bacteroidota kemoorganotrofni su mikroorganizmi specijalizirani za razgradnju brojnih polimera poput celuloze, hitina i pektina (Kirchman, 2002; Alonso-Sáez & Gasol, 2007; Quero & Luna, 2014), a u rezultatima prikazanim u ovom istraživanju preferirali su najproduktivnije okruženje.

4.2.3. Raznolikost ukupne mikrobne zajednice

U ekologiji mikrobne zajednice jedno od temeljnih pitanja jest kako veliki broj međusobno konkurentnih vrsta može istovremeno obitavati u morskim ekosustavima koji su uglavnom ograničeni količinom dostupnih nutrijenata. Ipak, u većini vodenih sustava velik je broj raznolikih vrsta u suživotu tijekom cijele godine, čak i ljeti kada su hranjive tvari uglavnom potrošene. Općenito, ovdje dobiveni rezultati ukazuju na „planktonski paradoks” (Hutchinson, 1961). Naime, ovo istraživanje pokazuje da je raznolikost arheja i bakterija najmanja u okolišu

s najvećom brojnošću pripadnika pikoplanktona, bakterijskom proizvodnjom i koncentracijom klorofila *a*, kao što je prijavljeno u prethodnom istraživanju (Šantić *i sur.*, 2021). Osim toga, zabilježeno je da više vrsta bakterija postoji u slanim okolišima bogatim nitratima, nitritima i SRP-om, dok je veća raznolikost arheja s najvišim Shannonovim indeksom zabilježena u najhladnijoj okolini s povećanim koncentracijama amonijaka i ukupnog dušika. U oligotrofnom okruženju srednjeg Jadrana, najveća raznolikost bakterija pronađena je u okolišu karakteriziranom najvećom prosječnom dubinom, što potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja. (Ghiglione *i sur.*, 2009; Pommier *i sur.*, 2010; Korlević *i sur.*, 2015; Šantić *i sur.*, 2021).

4.3. Analiza zajednice aerobnih anoksigenih fototrofa

AAF-i su tijekom posljednjih desetljeća opsežno proučavani u različitim ekosustavima kao zanimljiva funkcionalna skupina sveprisutnih fotoheterotrofa važnih u ciklusu kruženja ugljika (Koblížek, 2015). Prethodna istraživanja u Jadranskom moru usredotočila su se na njihovu brojnost procijenjenu iz koncentracija Bchl *a* mjerenih duž latitudinalnog transeкта (Celussi *i sur.*, 2015) te brojnosti određenih ljeti infracrvenom epifluorescentnom mikroskopijom uzoraka iz obalnih i estuarijskih područja duž obale istočnog Jadrana (Šantić *i sur.*, 2017). Naknadna istraživanja temeljena na jednogodišnjem uzorkovanju duž trofičkog gradijenta opisala su njihovu prostorno-vertikalnu raspodjelu i maksimalnu brojnost zabilježenu u kasnu zimu (Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2019). Nedavno objavljen pregledni članak ujediniio je podatke prikupljene tijekom sedam godina s 34 lokacije sažimajući saznanja o njihovoj rasprostranjenosti i kontrolnim ekološkim čimbenicima u Jadranskom moru (Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2023b). Međutim, dosada nije opisana struktura njihove zajednice u Jadranu. U ovim rezultatima predstavljen je sastav zajednice AAF na finijoj taksonomskoj ljestvici tijekom jedne godine na prostorno-vremenskoj skali u srednjem Jadranskom moru na tri postaje koristeći kvalitativno *pufM* metabarkodiranje i kvantitativni IC-FISH pristup. Dodatno, provedeni su NG algoritmi na podacima sekvenciranja aglomeriranih na razini reda i roda kako bi se obrasci unutar strukture AAF zajednice protumačili s određenim fizikalno-kemijskim i biološkim varijablama.

Uočene su značajne razlike u sezonalnosti u svim skupovima podataka: u pogledu brojnosti AAF (najveća prosječna brojnosti u proljeće $2,136 \pm 0,081 \times 10^4$ stanica mL⁻¹, najmanja ljeti $0,86 \times 10^4$ stanica mL⁻¹), brojnostima AAF grupa određenima IC-FISH metodom (*Roseobacter* dominantan u jesen, Alpha- i Gammaproteobacteria ljeti) i podacima

sekvenciranja *pufM* gena. Uočena sezonalnost u skladu je s rezultatima prvog dugotrajnog (desetogodišnjeg) istraživanja koje se temeljilo na sekvenciranju *pufM* amplikona iz sjeverozapadnog Sredozemnog mora, a koje je otkrilo da je zajednica AAF izrazito sezonalnog karaktera i da specifični taksoni pokazuju ponavljajuće obrasce pojavnosti (Auladell *i sur.*, 2019). Međutim, kao što je ranije prijavljeno za obalnu lagunu Sredozemlja (Lamy *i sur.*, 2011), nije se izdvojio jasan prostorni obrazac. Dubina (standardne oceanografske dubine od 0 do 100 m i duboki klorofilni maksimum) također nije izdvojena kao značajan čimbenik koji kontrolira brojnost ni sastav zajednice AAF-a. Navedeno potencijalno ukazuje da, za razliku od prethodnih rezultata (Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2019), prozirnost mora srednjeg Jadrana do 100 m dubine nije bila ključni kontrolni čimbenik AAF zajednice u ovom istraživanju.

4.3.1. Brojnost AAF zajednice

Uzimajući u obzir apsolutnu brojnost AAF zajednice, prosječne vrijednosti iznosa $1,427 \pm 0,754 \times 10^4$ stanica mL^{-1} odgovaraju onima prethodno prijavljenim za središnji Jadran, međutim, raspon od $0,30 \times 10^4$ do $3,41 \times 10^4$ stanica mL^{-1} u rezultatima ovog istraživanja bio je uži jer nije uzorkovano ušće rijeke Krke kao u prethodnim istraživanjima (Šantić *i sur.*, 2017; Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2019, 2023b). Prosječna relativna brojnost iznosila je $3,862\% \pm 2,266\%$ ukupnih prokariota (u rasponu od najmanje 0,548% do najviše 10,258%) što je usporedivo s prethodnim rezultatima iz Jadrana (Šantić *i sur.*, 2017; Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2019) i Sredozemnog mora (Hojerová *i sur.*, 2011; Lamy *i sur.*, 2011; Ferrera *i sur.*, 2014), kao i globalne ekspedicije uzorkovanja oceana (Yutin *i sur.*, 2007). Kao i u istraživanju Ferrere *i sur.* (2014.) gdje su prijavljene maksimalne prosječne brojnosti AAF-a ljeti, jasna i značajna sezonalnost primijećena je i u ovom istraživanju u pogledu AAF brojnosti. Suprotno rezultatima prethodno spomenutog istraživanja, maksimalna prosječna brojnost u ovom je istraživanju zabilježena u proljeće, koje je bilo jedino godišnje doba značajno različito od ostalih. Maksimumi zabilježeni u mjesecima travnju (kasna zima) i lipnju (proljeće) usporedivi su s prethodnim rezultatima iz Jadrana gdje su maksimalne AAF brojnosti također dosegnute u travnju na svim postajama, s povišenim koncentracijama fosfora i povoljnijim N/P omjerom kao potencijalnim objašnjenjem (Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2019). Ipak, suprotno prethodno spomenutom istraživanju iz Sredozemlja (Ferrera *i sur.*, 2014), minimalne prosječne brojnosti AAF-a u ovom su istraživanju zabilježene ljeti.

4.3.2. Kvantitativne brojnosti AAF skupina procijenjene IC-FISH metodom

Kvantitativne procjene brojnosti određenih bakterijskih skupina se često navode u literaturi, a uglavnom proizlaze iz CARD-FISH metode (Pernthaler *i sur.*, 2002; Ferrera *i sur.*, 2011; Kubota, 2013; Magalhães *i sur.*, 2021, Šantić *i sur.* 2023). Suprotno tome, kvantitativne procjene sastava AAF zajednice relativno su rijetke, gdje je kombinacija dviju metoda temeljenih na epifluorescentnoj mikroskopiji (IC-FISH) prethodno korištena za njihovu filogenetsku anotaciju (Mašin *i sur.*, 2006; Kasalický *i sur.*, 2018).

U ovom je istraživanju IC-FISH metoda korištena za određivanje udjela AAF-a dodijeljenih razredima Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria ili kladu *Roseobacter* u okolišnim uzorcima. Općenito, zajednica AAF-a u srednjem je Jadranu prilično raznovrsna, s približno podjednakim doprinosima pripadnika klada *Roseobacter*, zatim razreda Gammaproteobacteria te Alphaproteobacteria. Jasan sezonalni obrazac zabilježen je za klad *Roseobacter*, općenito manje prosječne prevalencije u proljeće i ljeto, a veće prevalencije u jesen. Obrasci pripadnika razreda Alphaproteobacteria i Gammaproteobacteria bili su obrnuti onima *Roseobacter*-a. Klad *Roseobacter* predstavlja pripadnike morske obitelji Rhodobacteraceae (razreda Alphaproteobacteria) za koje je poznato da su sveprisutni u svjetskim oceanima i ključni u biogeokemijskom kruženju ugljika (Luo & Moran, 2014). S velikom raznolikošću metaboličkih sposobnosti, bilo slobodno živući ili povezani s fitoplanktonom i mikroalgama, rozeobakteri (engl. *roseobacters*) mogu sačinjavati i do 30% bakterijskih zajednica morskog okoliša (Luo & Moran, 2014; Simon *i sur.*, 2017). Niži doprinos ove skupine uočen ljeti, kao i ukupne AAF zajednice, drugačiji je u odnosu na prethodne rezultate (Mary *i sur.*, 2006, Šantić *i sur.* 2023) gdje je klad *Roseobacter*, prikazan kao udio ukupnih bakterija dobiven CARD-FISH metodom, imao najveći prosječni relativni doprinos ljeti. Sposobnost aerobne anoksigene fototrofije prisutna je naime u najmanje 14 filogenetski različitih sojeva klada *Roseobacter*, ali ne u svim pripadnicima ovog klada (Luo & Moran, 2014). Stoga, pretpostavka jest da se sezonalno ponašanje AAF rozeobaktera potencijalno razlikuje u usporedbi s ostalim članovima *Roseobacter* klada zbog mogućnosti fotoheterotrofije (Luo & Moran, 2014). Rezultati IC-FISH metode u kombinaciji s NG modelom na razini reda otkrili su da AAF rozeobakteri preferiraju toplije, manje slano i hranjivim tvarima bogato okruženje (BMU1 na razini reda), sukladno najvećim zabilježenim apsolutnim brojnostima AAF-a. Ovo ukazuje da rozeobakteri potencijalno prevladavaju u AAF zajednici u opisanom okruženju i bogatim uvjetima okoliša te su njeni najaktivniji članovi. Još jedan značajan uzorak uočen za AAF rozeobaktere njihov je afinitet prema amonijaku, bez

obzira na temperaturu okoliša. Naime, najniže brojnosti rozeobaktera se podudaraju s najnižom koncentracijom amonijaka u BMU3, a najviše brojnosti zabilježene su u okolišu obogaćenom amonijakom, BMU5. Navedeno je očekivano budući da brojni pripadnici klada *Roseobacter* mogu koristiti dušik isključivo u reduciranom obliku zbog neposjedovanja gena koji kodiraju enzime ključne za redukciju nitrata i nitrita, već posjeduju skupine gena koji kodiraju enzime za unos amonijaka, aminokiselina, spermidina i ureje (Giebel *i sur.*, 2019). Za AAF Alphaproteobacterie uočeno je obrnuto sezonalno ponašanje, s najvećim vrijednostima tijekom ljeta, u odnosu na ukupne Alphaproteobacterie (Šantić *i sur.*, 2023). U ovom istraživanju, uočena sezonalna dinamika za AAF-e dodijeljene dotičnom razredu podrazumijeva najveće prosječne relativne doprinose ljeti, a najniže u jesen. Navedeno je u suprotnosti s teorijom da su pripadnici Alphaproteobacteria općenito dobri konkurenti u oligotrofnim okruženjima, što upućuje na činjenicu da se ponašanje AAF-a vrlo vjerojatno razlikuje od obrazaca ukupne bakterijske zajednice, favorizirajući eutrofna staništa unatoč prednostima fototrofije (Pinhassi & Berman, 2003; Koblížek, 2015; Villena-Aleman *i sur.*, 2023). Suprotno obrascima uočenima za AAF rozeobaktere i AAF Alphaproteobacterije, najveće brojnosti AAF Gammaproteobacteria uočene ljeti u skladu su s prethodnim rezultatima koji ukazuju na afinitet Gammaproteobacteria prema višim koncentracijama hranjivih tvari, asimilaciji organskog ugljika i općenito višim temperaturama (Pinhassi & Berman, 2003).

Raspravljajući o ovim rezultatima nužno je uzeti u obzir ograničenja IC-FISH metode. Postotak AAF stanica hibridiziranih s ROS537 probom u ovom je istraživanju općenito bio veći od broja stanica obilježenih s općom ALF968 probom, ponekad dovodeći do ukupnog zbroja relativnih brojnosti svih probi većeg od 120%. Slična problematika primijećena je i u drugim studijama za iste probe, ali i za rezultate CARD-FISH metode (Alonso-Sáez & Gasol, 2007; Simonato *i sur.* 2010). Istraživanje Rioua *i sur.* (2017) procijenilo je *in silico* specifičnost jedanaest najučestalije korištenih bakterijskih i eukariotskih probi koje se redovito koriste za kvantifikaciju morskih mikroba putem CARD-FISH metode. Otkriveno je da su probe ROS537 i Roseo536R identificirale 91% alfaproteobakterijskog klada *Roseobacter*, ali su također označile i 2,9% sekvenci neklasificiranih kao *Roseobacter* (drugi članovi reda Rhodobacterales) (Riou *i sur.*, 2017). Uz navedeno, prethodna su istraživanja prijavila lažno pozitivne rezultate i pogrešnu klasifikaciju morskih Gammaproteobacteria s GAM42a probom, kao i morskih Alphaproteobacteria s ALF968 probom gdje je pokrivenost grupa iznosila 76% odnosno 81% (Amann & Fuchs, 2008). Dodatni značajni nedostaci FISH metode, osim specifičnosti i afiniteta probi za komplementarne slijedove nukleinskih kiselina, su mali broj ribosoma u određenim bakterijskim stanicama što otežava njihovu detekciju, loša

permeabilizacija bakterijskih staničnih stijenki i razlike u vezivanju nepotpuno komplementarnih oligonukleotida, o čemu se detaljno raspravljalo drugdje (Amann & Fuchs, 2008). Navedeni čimbenici zasigurno utječu na preciznost kvantitativnih procjena FISH-a navedenih u ovom istraživanju te upućuju na potrebu za novim dizajnom FISH probi i optimizaciji protokola u budućnosti. Još jedno ograničenje IC-FISH metode koje je potencijalno utjecalo na rezultate prikazane u ovom istraživanju jest brzo blijeđenje autofluorescencije pigmenta Bchl *a* prilikom istovremene detekcije infracrvenih signala i signala probi, što je često zahtijevalo brzu i ponavljaju manipulaciju prilikom snimanja fotografija.

4.3.3. Struktura AAF zajednice dobivena *pufM* metabarkodiranjem

Sastav zajednice AAF dobiven sekvenciranjem *pufM* gena odgovara već spomenutim rezultatima Auladell *i sur.* (2019.) iz sjeverozapadnog Sredozemlja gdje su Gammaproteobacteria pridružene kladu NOR5/OM60 (filogrupa K) prevladavale zajednicom AAF-a tijekom desetljeća, sa srednjom relativnom brojnošću od 83,8%, dok je u ovom istraživanju njihov prosječni relativni doprinos iznosio 75,9%. Zanimljivo je da je slično smanjenje prosječnog doprinosa Gammaproteobacteria, koje su spomenuti autori prijavili u mjesecima veljači i ožujku (59,6% odnosno 52%), također primijećeno i u rezultatima ovog istraživanja s relativnim doprinosom od prosječnih <40% za veljaču odnosno 50% za ožujak. Tijekom navedenih mjeseci primijećena je povećana relativna brojnost Alphaproteobacteria u veljači na postaji ST101 i u ožujku na postaji CJ007. Povremene pojavnosti određenih AAF-a u relativnim doprinosima iznad 1%, kao što je bilo prijavljeno i u drugim istraživanjima (Auladell *i sur.*, 2019; Villena-Alemaný *i sur.*, 2023), također su zabilježene u ovom istraživanju za redove Sphingomonadales s najvećim doprinosom u travnju, Caulobacterales u kolovozu te za rod *Planktomarina* u veljači i studenom. Međutim, nužno je provesti dugotrajno odnosno višegodišnje istraživanje kako bi se procijenilo jesu li navedene pojave ponovljive prirode.

Sastavom AAF zajednice u istraživanom području srednjeg Jadrana dominirale su Gammaproteobacteria s pripadnikom roda *Luminiphilus* (klada OM60/NOR5; red Pseudomonadales, obitelj Halieaceae). *Luminiphilus* je širokorasprostranjeni mezofilni i halofilni fotoheterotrof koji se često pojavljuje u većim brojnostima u moru i površinskom sloju litoralnih morskih sedimenata (Spring *i sur.*, 2013). Zanimljiv je nalaz o dva ASV-a koljena Gemmatimonadota na prijelaznoj postaji CJ007, iako u veoma malenim relativnim

doprinosa. Ovo ukazuje na činjenicu da sekvenciranje amplikona predstavlja prikladan alat za otkrivanje taksona vrlo malih zastupljenosti u zajednici (0,1-10%) zbog specifičnog koraka PCR umnažanja. Kao što je ranije istaknuto, za razliku od metabarkodiranja, metagenomika detektira samo najbrojnije članove bakterijske zajednice (Gazulla *i sur.*, 2023). Gemmatimonadota je nedovoljno proučeno bakterijsko koljeno s trenutno samo šest prijavljenih uzgojivih predstavnika čiji su pripadnici obično sveprisutni u tlu, eufotičkim zonama slatkih voda, postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda i sedimentima, ali ne i u morskim staništima (Mujakić *i sur.*, 2021). Dva ASV-a opažena u ovom istraživanju dodijeljena su neklasificiranim rodovima obitelji Gemmatimonadaceae. Trenutno su uzgojive samo dvije reprezentativne vrste, *Gemmatimonas phototrophica* i *Gemmatimonas groenlandica*, za koje je poznato da posjeduju sposobnost anoksigene fotosinteze. Međutim, analize genoma sastavljenih iz metagenoma (MAG, engl. *metagenome-assembled genome*) pokazale su sposobnost anoksigene fotosinteze i u neuzgojivim linijama koljena Gemmatimonadota (Mujakić *i sur.*, 2022). Pretpostavka je da pripadnici Gemmatimonadota otkriveni u području Jadrana vjerojatno potječu iz sliva jadranskih krških rijeka, Jadra i Cetine, ili su pak pasivno preneseni iz sedimenta. Kao što je ranije potvrđeno različitim metodološkim pristupima poput metagenomike (Galand *i sur.*, 2018; Auladell *i sur.*, 2019), sekvenciranja *pufM* amplikona (Auladell *i sur.*, 2019; Villena-Alemaný *i sur.*, 2023) i epifluorescentne mikroskopije (Ferrera *i sur.*, 2014), rezultati prikazani ovdje također ukazuju na obrnuti odnos AAF brojnosti i mjera raznolikosti ljeti. Najveća raznolikost AAF-a ogledana u Shannonovim indeksima zabilježena je kada je brojnost bila minimalna u kolovozu, suprotno prethodnim nalazima dugogodišnjeg istraživanja Auladell *i sur.*(2019) gdje je raznolikost bila najveća zimi kada je brojnost bila najmanja. U ovom istraživanju, za razliku od Auladell *i sur.*(2019), nije otkriven jasan obrnuti odnos brojnosti i raznolikosti za proljeće, zimu i jesen.

Široko rasprostranjeno sekvenciranje amplikona gena biljega određene zajednice trenutno je financijski isplativo i relativno jednostavno za primjenu u usporedbi s metagenomikom, osobito ukoliko je taksonomska klasifikacija glavni cilj istraživanja. Međutim, zbog velike varijabilnosti kodirajućih slijedova sekvenci ciljanog gena, poput *pufM* gena, pristranosti početnica ostaju glavni problem ovog pristupa (Gazulla *i sur.*, 2023). Gazulla *i sur.* (2023.) su nedavno usporedili metagenomiku i metabarkodiranje koristeći postojeće i novodizajnirane parove početnica (*pufMF/pufM* WAW, UniF/UniR i *pufMF_Y/pufM* WAW). Otkriveno je da su postojeći parovi početnica, među njima i onaj korišten u ovoj studiji, pristrani prema pripadnicima morskih Gammaproteobacteria i nekim pripadnicima Alphaproteobacteria, podcijenjujući neuzgojive pripadnike zajednice AAF. Stoga bi sastav

AAF zajednice procijenjen korištenjem *pufM* metabarkodiranja pomoću para početnica UniF/WAW u ovoj studiji trebalo tumačiti s oprezom jer vjerojatno precjenjuju doprinos AAF Gammaproteobacteria na štetu nekulturable predstavnika. Iako je prethodno prijavljeno da je PCR umnažanje *pufM* gena parom početnica UniF/WAW bilo neuspješno za uzorke mora (Tablica S2 dodatnog materijala u Gazulla *i sur.*, 2023), svi uzorci su u ovom istraživanju uspješno amplificirani navedenim parom početnica. Međutim, optimizacija reakcije bila je dugotrajna i problematična, vjerojatno zbog vrlo niskog GC sadržaja, niske temperature prijanjanja i deset degeneriranih nukleotida u slijedu početnice UniF. Umjesto toga, trenutno se predlaže upotreba novodizajnirane početnice *pufMF_Y* u kombinaciji s WAW kako bi se dobio manje pristran taksonomski prikaz sastava zajednice morskih AAF-a (Gazulla *i sur.*, 2023).

4.3.4. Okolišni čimbenici koji utječu na AAF zajednicu srednjeg Jadrana

U ovom su istraživanju NG algoritmi primijenjeni na skupovima podataka dobivenih *pufM* metabarkodiranjem. Stvorena su dva modela na razini reda i roda kako bi se izdvojili karakteristični uzorci koji bi potencijalno mogli rasvijetliti još neobjašnjenu ekologiju AAF-a.

U oligotrofnom okolišu šireg istraživanog područja nedavno je zabilježeno povećanje prosječnog saliniteta (Vilibić *i sur.*, 2012; Beg Paklar *i sur.*, 2020). Kao što je prethodno prijavljeno u literaturi (Koblížek, 2015; Villena-Alemaný *i sur.*, 2023), u oba je NG modela u ovom istraživanju uočena maksimalna brojnost AAF-a u produktivnijim okolišima (BMU1 u oba modela i BMU5 u modelu na razini roda), točnije onima s najvišim koncentracijama fosfata, nitrata i otopljenog anorganskog dušika te je sustavno povezana s najvećim brojnostima ukupnih heterotrofnih bakterija (Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2023a). Gamaproteobakterijski red Burkholderiales predstavljen rodovima *Rhodoferrax* i *Limnohabitans* kao i alphaproteobakterijski rodovi SP197, *Planktomarina*, *Nereida*, CYK10 i *Thalassobacter* (pripadnici obitelji Rhodobacteraceae) bili su prisutni s povećanim vrijednostima u okolišu bogatom hranjivim tvarima, zajedno s najvećim mjerama raznolikosti AAF-a. Upravo suprotno, brojnost AAF-a bila je najniža u oba NG modela u okolišima siromašnim nutrijentima, s niskim sadržajem dušika i fosfora. Druga značajka koja se izdvojila u oba modela jest jasan inverzan odnos između brojnosti AAF-a i saliniteta kao potencijalno važnog kontrolnog čimbenika. Najniža brojnost zabilježena je u najslanijem staništu i obrnuto. Međutim, suprotno prethodnom istraživanju provedenom u slanim jezera tibetanske visoravni (Jiang *i sur.*, 2009), u ovom istraživanju nije utvrđena jasna niti obrnuta veza između mjera

raznolikosti i saliniteta. Prosječni broj ASV-ova, Shannonov indeks i Pielouova ujednačenost dosegli su najveće vrijednosti u staništima s najnižom slanošću (BMU1), dok su slično visoke mjere raznolikosti otkrivene i u staništima s maksimalnom slanošću (BMU3). Navedeno ukazuje da je raznolikost AAF zajednice neovisna o salinitetu te je kontrolirana složenim međudjelovanjem različitih okolišnih čimbenika, a ne jednom varijablom. Nadalje, velika AAF raznolikost u različitim staništima, u bogatim (BMU1) tako i u onim oskudnim hranjivim tvarima (BMU3), bila je neovisna o temperaturi u proučavanom rasponu, što ponovno ukazuje na različito ponašanje AAF zajednice u usporedbi s općom populacijom bakterija. U analizi ukupne mikrobne zajednice metabarkodiranjem 16S rRNA gena (Šantić *i sur.*, 2021) predložen je „planktonski paradoks“: arhealna i bakterijska raznolikost bila je najmanja u okolišu s najvećim brojnostima pripadnika pikoplanktona, proizvodnjom bakterija i koncentracijom klorofila, dok su, naprotiv, najveće mjere bakterijske raznolikosti zabilježene u dubokim i slanim okolišima bogatim nitratima, nitritima i SRP-om. Unatoč navedenom, visoka prosječna slanost (38,35) u kombinaciji s temperaturom višom od 16°C i najvišim koncentracijama nitrita, silikata i klorofila negativno je utjecala na mjere raznolikosti zajednice AAF-a zabilježenih u BMU5.

Za razliku od prethodnih istraživanja (Auladell *i sur.*, 2019; Vrdoljak Tomaš *i sur.*, 2023b), u ovom nije uočen jasan niti linearan odnos između koncentracija Chl *a* i zajednice AAF-a. Karakteristični obrasci zabilježeni su na razini AAF redova povezanih s različitim varijablama okoliša. Alfaproteobakterijski redovi Rhizobiales, Sphingomonadales, Caulobacterales i Arenicellales istovremeno su se pojavili u većim vrijednostima u staništima oskudnim nitratima i amonijakom te pri temperaturama višim od 16°C (BMU 2 i 3). Suprotno navedenom, isti redovi imali su nisku relativnu zastupljenost u okolišima bogatim dušikom (BMU 1 i 4), što ukazuje na potencijalno inverzni odnos između njihove brojnosti i koncentracije dušikovih spojeva te njihovu potencijalnu sklonost prema staništima siromašnim dušikom. Caulobacterales, Rhizobiales i Sphingomonadales također su se zajedno pojavili u maksimumima uočenim u proljeće u nedavno objavljenom istraživanju provedenom u slatkovodnim jezerima (Villena-Alemaný *i sur.*, 2023), što vjerojatno upućuje na sklonost ovih redova prema istim uvjetima okoliša. Nedavno je kvantificiran doprinos fotoheterotrofne aktivnosti zajednice AAF ciklusu kruženja ugljika u slatkovodnom jezeru te je povezan s većom relativnom brojnošću redova Caulobacterales i Sphingomonadales, ukazujući na njihovu potencijalno važnu ulogu i u morskim staništima (Piwosz *i sur.*, 2022). Zanimljivo, nekulturalna alfaproteobakterijska linija UBA8366 i neklasificirani red razreda Alphaproteobacteria imali su najveće vrijednosti samo u najhladnijem i najdubljem okolišu

siromašnom hranjivim tvarima (BMU5), s prosječnom dubinom od 60 m i maksimalnim prosječnim salinitetom (38,71). U navedenom okolišu zabilježene su najmanje brojnosti AAF-a, ukupnih heterotrofnih bakterija, *Synechococcus*-a, *Prochlorococcus*-a, pikoeukariota, heterotrofnih nanoflagelata kao i najmanje mjere raznolikosti. Nadalje, nedavno objavljeno istraživanje temeljeno na usporednoj genomici MAG-ova Alphaproteobacteria prikupljenih iz Arktičkog oceana otkrilo je da je nekulturable linija UBA8366 uključena u razgradnju aromatskih spojeva (Grevesse *i sur.*, 2022).

NG model skupa *pufM* podataka aglomeriranih na razinu roda te povezanih s potencijalno kontrolirajućim čimbenicima okoliša pokušaj je razotkrivanja nerazjašnjene ekologije AAF-a na finoj taksonomskoj ljestvici. Osim eurivalentnog roda *Luminiphilus* i nekulturable LFER01 koji su prevladavali u svih pet različitih okoliša (BMU1-5 na razini roda, potencijalno zbog pristranosti početnica), alfa proteobakterijski rodovi *Planktomarina*, *Nereida*, *CYK10*, *Thalassobacter* (iz obitelji Rhodobacteraceae) kao i rodovi Gammaproteobacteria *RS62*, *Rhodoferrax* i *Limnohabitans* (iz obitelji Burkholderiaceae) pojavili su se u najvećim vrijednostima zajedno s najvećom brojnošću AAF, heterotrofnih bakterija i pikoeukariota u staništima bogatim hranjivim tvarima (BMU1). Ovi su rodovi preferirali okoliš niske slanosti, veoma raznolik te obogaćen nitratima, amonijakom, otopljenim anorganskim dušikom, fosforom i silikatima. Kao što je već spomenuto, dotično je očekivano od pripadnika klada *Roseobacter*, od kojih rodovi poput *Planktomarine* iskorištavaju dušik isključivo u reduciranom obliku, nemaju metaboličke putove za redukciju nitrata i nitrita te se oslanjaju na unos amonijaka, aminokiselina, spermidina i uree (Giebel *i sur.*, 2019). Rod *Erythrobacter*, neklasificirani rod obitelji Xanthobacteraceae, te rodovi *Planktotalea* i *Palleronia* (Rhodobacteraceae) grupirani su s najnižim brojnostima heterotrofnih bakterija, *Synechococcus*-a, pikoeukariota te niskim brojnostima AAF-a kao i nanoflagelata, favorizirajući najtopliji okoliš osiromašen amonijakom, Chl *a*, nitratima i nitritima (BMU2). U najslanijem, ali raznolikom okolišu smanjenih koncentracija nitrata i otopljenog anorganskog dušika, gdje su brojnosti AAF-a bile najniže, prevladavao je najveći relativni doprinos rodova *Roseovarius*, *Puniceibacterium* i *CACIIZ01* (Rhodobacteraceae) kao i gamaproteobakterijskog *CABYJX01* (Haliaceae, Pseudomonadales) gdje se čini da ovi rodovi nisu kontrolirani smanjenom koncentracijom dušika (BMU3).

Okoliš s najmanjom prosječnom dubinom i jasnim prostorno-sezonalnim uzorkom (gotovo svi zimski uzorci s prijelazne postaje CJ007 i postaje otvorenog mora CJ009) opisan najnižom prosječnom temperaturom te siromašan nitratima, silikatima, apsolutnim brojnostima *Prochlorococcus*-a, ali s velikim brojnostima *Synechococcus*-a, heterotrofnih nanoflagelata i

AAF-a, povezan je s povišenim vrijednostima rodova *CACIJG01*, *Rubricella*, *GCA2689605* (obitelj Hyphomicrobiaceae) i *UBA868* (Arenicellales) (BMU4). Navedeno ukazuje na sklonost ovih rodova hladnijim uvjetima okoliša. Rodovi *Roseobacter* i *Sphingomonas*, rijetki u drugim jedinicama, preferirali su okoliš bogat hranjivim tvarima (BMU5) opisan vrlo visokim prosječnim salinitetom i temperaturom većom od 16 °C, bogat nitritima, silikatima, Chl *a* i apsolutnim brojnostima *Prochlorococcus*-a, pikoekariota, *Synechococcus*-a i AAF-a, ali s najmanjom AAF raznolikošću.

5. ZAKLJUČCI

U ovom je istraživanju testirano pet metoda izolacije DNA (biokemijske i one temeljene na komercijalno dostupnom kitu) te izravni PCR pristup u 16S rRNA metabarkodiranju mikrobnih zajednica srednjeg Jadrana. Pokazano je da ne postoji jedna superiorna metoda izolacije ili eksperimentalni pristup koji je rezultirao teoretski očekivanim sastavom umjetno stvorene „mock“ zajednice. Budući da se izborom bilo koje metodologije nedvojbeno uvodi značajna pristranost prema određenom taksonu, nužno je donijeti opreznu, ali što je najvažnije dosljednu odluku o izboru pristupa koja se ne smije mijenjati tijekom istraživanja odnosno eksperimentalnog pristupa. Ukoliko početna čistoća uzorka nije problem, u ovom istraživanju je pokazano da se standardni protokol izolacije DNA temeljen na fenolu/kloroformu/izoamilnom alkoholu može zamijeniti njegovim kraćim i sigurnijim alternativama temeljenima na precipitaciji izopropanolom odnosno etanolom, koje u potpunosti zaobilaze korak korištenja toksičnih organskih otapala. Izravni PCR, kao zanemarena metodologija u mikrobnoj ekologiji, potencijalno predstavlja prikladan te vremenski i financijski isplativ pristup kada je nužna obrada velike količine uzoraka, prilikom čega je uočeno da smanjeno vrijeme rukovanja uzorcima u laboratoriju dovodi do smanjene detekcije kontaminantnih taksona. Zaključno, uputno je koristiti umjetno stvorene „mock“ zajednice prilikom optimizacija protokola kako bi se utvrdile pogreške neizbježno uvedene prilikom rukovanja uzorcima ili sekvenciranja.

Sažimajući rezultate terenskih istraživanja, primjenom *neural gas* (NG) algoritma na podacima dobivenim CARD-FISH metodom, može se zaključiti da okoliš opisan jednakim udjelima bakterijskih skupina predstavlja inicijalno stanje „pripravnosti” koje biva stimulirano različitim biotičkim i abiotičkim okolišnim uvjetima čime prelazi u ostale jedinice. Rezultati upućuju da su pripadnici klada SAR11 eurivalentni mikroorganizmi te da prevladavaju u raznovrsnim uvjetima. Ostali pripadnici razreda Alphaproteobacteria pokazali su pozitivan odgovor na povećani salinitet i niže temperature, dok su pripadnici Gammaproteobacteria prevladavali pri toplijim uvjetima. Pripadnici koljena Bacteroidetes i klada *Roseobacter* pojavili su se u povećanim brojnostima pri višim temperaturama te u okolišu bogatom hranjivim tvarima. Prema NG algoritmu koji je rezultirao jedinicama PHBMU temeljenima na podacima 16S rRNA sekvenciranja na razini koljena, pokazano je da koljena Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidota, Actinobacteriota, Crenarchaeota, Thermoplasmata, Verrucomicrobiota, Marinimicrobiota i Planctomycetota predstavljaju eurivalentne organizme prilagođene različitim svojstvima morskog okoliša. Dva koljena arheja, Thermoplasmata i

Crenarchaeota, pronađena su u značajnim udjelima u različitim okolišima te povišenih relativnih brojnosti u slanijoj okolini obogaćenju nitratima. Osim arheja, pripadnici koljena Nitrospinota, SAR324, Chloroflexi i Acidobacteriota imali su najveću relativnu brojnost u okolišu s iznimno visokim salinitetom, obogaćenim nitratima i nitritima. Suprotno navedenom, koljeno Verrucomicrobiota imalo je veću relativnu zastupljenost u manje slanom, ali produktivnijem okruženju. Pripadnici koljena Bacteroidetes, kao glavni razlagači polimera otopljene organske tvari u morskom ekosustavu, preferirali su nutrijentima bogat okoliš. Pripadnici koljena Dadabacteria, Desulfobacterota i Firmicutes pokazali su najveći relativni doprinos mikrobnoj zajednici u najhladnijem okruženju s najvećim koncentracijama amonijaka. Uočen je opći obrazac povećanja mikrobne raznolikosti sa smanjenjem brojnosti pripadnika mikrobne zajednice u oligotrofnim uvjetima, posebice prilikom povećanja saliniteta. Rezultati uočeni za obrasce raznolikosti pikoplanktona upućuju na postojanje različitih strategija koje su mikroorganizmi usvojili kako bi se prilagodili promjenjivim okolišnim uvjetima.

Raspodjela aerobnih anoksigenih fototrofa (AAF) i sastav zajednice po prvi put su određeni u Jadranu na finijim taksonomskim razinama na prostorno-vremenskoj ljestvici tijekom jedne godine metabarkodiranjem *pufM* gena biljega. Brojnosti AAF-a koji pripadaju razredima Alphaproteobacteria i Gammaproteobacteria ili kladu *Roseobacter* određene su IC-FISH metodom, a pokazale su da je zajednica AAF u istraživanom području raznovrsna s najvećim prosječnim relativnim udjelom njenih pripadnika taksonomski anotiranih kao klad *Roseobacter*, zatim Gammaproteobacteria i naposljetku Alphaproteobacteria. Općenito, primijećena je jasna i statistički značajna sezonalnost s obzirom na apsolutne brojnosti AAF s najvećim vrijednostima u proljeće, IC-FISH brojnosti (klad *Roseobacter* dominantan u jesen, razredi Alpha- i Gammaproteobacteria ljeti) i *pufM* podatke sekvenciranja aglomerirane na razinu roda. Nije uočen jasan niti značajan obrazac prostornih ni vertikalnih profila (standardne oceanografske dubine od 0 do 100 m i duboki klorofilni maksimum). Temeljem rezultata *pufM* metabarkodiranja, sastavom zajednice AAF dominirale su Gammaproteobacteria klada NOR5/OM60, točnije rod *Luminiphilus*, s brojnim drugim rodovima prisutnima u niskim relativnim brojnostima ispod 1%. Obrnuti odnos najmanje AAF brojnosti i najveće raznolikosti primijećen je ljeti, ali nije uočen za ostala godišnja doba. Nadalje, NG modeli provedeni na skupovima podataka sekvenciranja *pufM* gena povezali su ovu jedinstvenu funkcionalnu zajednicu s biotičkim i abiotičkim čimbenicima koji utječu na nju. Visoka raznolikost AAF zajednice bila je neovisna o temperaturi ili salinitetu u proučavanom rasponu u različitim okolišima te se pojavljivala i u okolišima bogatim i oskudnim hranjivim tvarima, što ukazuje

na potencijalno različito ponašanje navedene zajednice u usporedbi s općom bakterijskom populacijom. U kombinaciji s najvećim brojnostima ukupnih heterotrofnih bakterija i najvećom AAF raznolikošću, red Burkholderiales zastupljen rodovima *Rhodofera* i *Limnohabitans* kao i alfavroteobakterijska linija SP197, rodovi *Planktomarina*, *Nereida*, CYK10 i *Thalassobacter* zabilježeni su u povišenim vrijednostima u okolišu bogatom hranjivim tvarima s najvišim koncentracijama ortofosfata, nitrata i otopljenog anorganskog dušika. AAF redovi Rhizobiales, Sphingomonadales, Caulobacterales i Arenicellales zajedno su se pojavljivali u većim vrijednostima u toplijim staništima oskudnim nitratima i amonijakom s jasnim inverznim odnosom između njihovih vrijednosti i koncentracije dušikovih spojeva, što potencijalno upućuje na sklonosti spomenutih redova prema okolišima sa smanjenom koncentracijom dušika. AAF red UBA8366 pojavio se u većim vrijednostima isključivo u najhladnijem, najoligotrofnijem i najdubljem okolišu najviših koncentracija amonijaka s najnižom prosječnom temperaturom, najvećom prosječnom dubinom te rekordnim vrijednostima saliniteta. Rezultati IC-FISH metode u kombinaciji s NG modelom na razini reda otkrili su da AAF-i dodijeljeni kladu *Roseobacter* preferiraju toplije, manje slano stanište bogato amonijakom, popraćeno s najvećim prosječnim apsolutnim brojnostima AAF-a. Navedeno ukazuje da rozeobakteri dominiraju AAF zajednicom u opisanom okolišu i potencijalno su njeni najaktivniji članovi.

S obzirom na trenutne klimatske promjene, ovo istraživanje može pomoći prilikom razumijevanja moguće strukturne promjene ukupne mikrobne zajednice kao i zajednice AAF Jadranskog mora, koje bi mogle utjecati na više trofičke razine morske hranidbene mreže.

Preporuke za daljnja istraživanja su određivanje funkcionalnog potencijala zajednice metagenomikom te analiza cjelokupne mRNA odnosno uvid u diferencijalnu ekspresiju gena metatranskriptomikom. Također, poželjno je odrediti odgovor ukupne zajednice i zajednice AAF na određene okolišne čimbenike kontroliranim laboratorijskim eksperimentima. U svrhu poboljšanja kvantitativnih procjena, preporučuje se dizajn novih FISH probi odnosno sužavanje njihove specifičnosti za finije taksonomske razine poput roda i vrste te daljnja optimizacija protokola IC-FISH metode. Također, zanimljiv i potencijalno vremenski isplativ pristup predstavlja i *flow-fish* metodologija, kao kombinacija protočne citometrije i FISH-a.

6. LITERATURA

- Achenbach, L. A., Carey, J., & Madigan, M. T. (2001). Photosynthetic and Phylogenetic Primers for Detection of Anoxygenic Phototrophs in Natural Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2922–2926. doi: 10.1128/AEM.67.7.2922-2926.2001.
- Aitchison, J. (1982). The Statistical Analysis of Compositional Data. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 44, 139–160. doi: 10.1111/j.2517-6161.1982.tb01195.x.
- Aitchison, J., Barceló-Vidal, C., Martín-Fernández, J. A., & Pawlowsky-Glahn, V. (2000). Logratio analysis and compositional distance. *Math. Geol.* 32, 271–275. doi: 10.1023/A:1007529726302.
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25, 4692–4693.
- Alonso-Sáez, L., & Gasol, J. M. (2007). Seasonal variations in the contributions of different bacterial groups to the uptake of low-molecular-weight compounds in Northwestern Mediterranean coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3528–3535. doi: 10.1128/AEM.02627-06.
- Amann, R., & Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 339–348. doi: 10.1038/nrmicro1888.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169. doi: 10.25162/hermes-2017-0014.
- Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). *Wiley StatsRef Stat. Ref. Online*, 1–15. doi: 10.1002/9781118445112.stat07841.
- Anderson M. J. (2006) Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics* 62:245–53.
- Artegiani A., Bregant D., Paschini E., Pinarđi N., Raicich F. & Russo A. (1997) The Adriatic Sea general circulation. Part I: Air-sea interactions and water mass structure. *J Phys Oceanogr.*27:1492–514.
- Auladell, A., Sánchez, P., Sánchez, O., Gasol, J. M., & Ferrera, I. (2019). Long-term seasonal and interannual variability of marine aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria. *ISME J.* 13, 1975–1987. doi: 10.1038/s41396-019-0401-4.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., & Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257–263. doi: 10.3354/meps010257.
- Barbera, P., Kozlov, A. M., Czech, L., Morel, B., Darriba, D., Flouri, T., et al. (2019). EPA-ng: Massively Parallel Evolutionary Placement of Genetic Sequences. *Syst. Biol.* 68, 365–369. doi: 10.1093/sysbio/syy054.
- Barnett, D. J. M., Arts, I. C. W., & Penders, J. (2021). microViz : an R package for microbiome data visualization and statistics. *J. Open source Softw.* 6, 3201. doi: 10.21105/joss.03201.
- Beg Paklar, G., Vilibić, I., Grbec, B., Matic, F., Mihanović, H., Džoić, T., et al. (2020). Record-breaking salinities in the middle Adriatic during summer 2017 and concurrent changes in the microbial food web. *Prog. Oceanogr.* 185. doi: 10.1016/j.pocean.2020.102345.
- Béjā, O., Suzuki, M., Heidelberg, J., Nelson, W., Preston, C., Hamada, T., et al. (2002). Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* 415, 630–633. doi: https://doi.org/10.1038/415630a.
- Béjā, O., & Suzuki M. (2008). Photoheterotrophic marine prokaryotes. In: D.L. Kirchman (ed.), *Microbial Ecology of the Oceans* 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, pp. 131-157.
- Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P., Rumble, D., Stein, H. J., Hannah, J. L., et al. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* 427, 117–120.
- Ben-Amar, A., Oueslati, S., & Mliki, A. (2017). Universal direct PCR amplification system: a time- and cost-effective tool for high-throughput applications. *3 Biotech* 7, 246. doi: 10.1007/s13205-017-0890-7.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53–59. doi: 10.1038/nature07517.
- Biebl, H., & Wagner-Döbler, I. (2006). Growth and bacteriochlorophyll *a* formation in taxonomically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in chemostat culture: Influence of light regimen and starvation. *Process Biochem.* 41, 2153–2159. doi: 10.1016/j.procbio.2006.06.029.
- Boström, K. H., Simu, K., Hagström, Å., & Riemann, L. (2004). Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnol. Oceanogr. Methods* 2, 365–373. doi: 10.4319/lom.2004.2.365.
- Boudouresque, C. F., Caumette, P., Bertrand, J. C., Normand, P., & Sime-Ngando, T. (2015). “Systematic & Evolution of Microorganisms: General Concepts,” in *Environmental Microbiology: Fundamentals & Applications*, ed. J. . Bertr& (Springer Science+Business Media Dordrecht), 107–144. doi: 10.1007/978-94-017-9118-2.
- Brooks, J. P., Edwards, D. J., Harwich, M. D., Rivera, M. C., Fettweis, J. M., Serrano, M. G., et al. (2015). The truth about metagenomics: Quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies *BMC Microbiol.* 15, 1–14. doi: 10.1186/s12866-015-0351-6.
- Brown, M. V., Schwalbach, M. S., Hewson, I., & Fuhrman, J. A. (2005). Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: Development and application to a time series. *Environ. Microbiol.* 7, 1466–1479. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00835.x.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 11, 2639–2643. doi: 10.1038/ismej.2017.119.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25. doi: 10.1093/bioinformatics/btp348.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010a). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi: 10.1038/nmeth0510-335.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., et al. (2010b). Global

- patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS* 108, 4516–4522. doi: 10.1073/pnas.100080107.
- Caroppo, C., Azzaro, F., Bergamasco, A., Caruso, G., & Decembrini, F. (2022). Phytoplankton and Bacterial Communities' Patterns in a Highly Dynamic Ecosystem (Central Mediterranean Sea). *Water* 14, 1–23. doi: 10.3390/w14132057.
- Celussi, M., Gallina, A. A., Ras, J., Giani, M., & Negro, P. Del (2015). Effect of sunlight on prokaryotic organic carbon uptake and dynamics of pigments relevant to photoheterotrophy in the Adriatic Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 74, 235–239. doi: 10.3354/ame01738.
- Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2015). Primer: User manual/tutorial. *Prim. Ltd., Plymouth, UK*, 93.
- Corretto, E., Antonielli, L., Sessitsch, A., Höfer, C., Puschenreiter, M., Widhalm, S., et al. (2020). Comparative Genomics of Microbacterium Species to Reveal Diversity, Potential for Secondary Metabolites and Heavy Metal Resistance. *Front. Microbiol.* 11, 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2020.01869.
- Cotner, J. B., & Biddanda, B. A. (2002). Small players, large role: Microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5, 105–121. doi: 10.1007/s10021-001-0059-3.
- Csotonyi, J. T., Swiderski, J., Stackebrandt, E., & Yurkov, V. (2010). A new environment for aerobic anoxygenic phototrophic bacteria: Biological soil crusts. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 651–656. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00151.x.
- Czech, L., Barbera, P., & Stamatakis, A. (2020). Genesis and Gappa: Processing, analyzing and visualizing phylogenetic (placement) data. *Bioinformatics* 36, 3263–3265. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa070.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all Bacteria: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434–444. doi: 10.1016/S0723-2020(99)80053-8.
- Deiner, K., Walser, J. C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol. Conserv.* 183, 53–63. doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.018.
- DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5685–5689. doi: 10.1073/pnas.89.12.5685.
- DeLong, E. F. (2021). Exploring Marine Planktonic Archaea: Then and Now. *Front. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.616086.
- Djurhuus, A., Port, J., Closek, C. J., Yamahara, K. M., Romero-Maraccini, O., Walz, K. R., et al. (2017). Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Front. Mar. Sci.* 4, 314. doi: 10.3389/fmars.2017.00314.
- Dubnau, D., Smith, I., Morell, P., & Marmur, J. (1965). Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 491–498. doi: 10.1073/pnas.54.2.491.
- Durazzi, F., Sala, C., Castellani, G., Manfreda, G., Remondini, D., & Cesare, A. De (2021). Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Sci. Rep.* 11, 1–10. doi: 10.1038/s41598-021-82726-y.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996–998. doi: 10.1038/nmeth.2604.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity & speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381.
- Eiler, A. (2006). Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: Implications & consequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7431–7437. doi: 10.1128/AEM.01559-06.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glöckner, F. O., Gerdts, G., & Amann, R. (2001). Isolation of Novel Pelagic Bacteria from the German Bight and Their Seasonal Contributions to Surface Picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5134–5142. doi: 10.1128/aem.67.11.5134-5142.2001.
- Fecskeová, L. K., Pivosz, K., Šantić, D., Šestanović, S., Vrdoljak Tomaš, A., Hanusova, M., et al. (2021). Lineage-Specific Growth Curves Document Large Differences in Response of Individual Groups of Marine Bacteria to the Top-Down and Bottom-Up Controls. *mSystems* 6, e00934-21. doi: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00934-21>.
- Fenchel, T. (2008). The microbial loop-25 years later. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 366, 99–103. doi: 10.1016/j.jembe.2008.07.013.
- Fernandes, D. A., Reid, J., Macklaim, M. J., McMurrough, T. A., Edgell, D. R., & Gloor, B. G. (2014). Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome* 2, 1–13.
- Fernández-Gómez, B., Richter, M., Schüller, M., Pinhassi, J., Acinas, S. G., González, J. M., et al. (2013). Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *ISME J.* 7, 1026–1037. doi: 10.1038/ismej.2012.169.
- Ferrera, I., Borrego, C. M., Salazar, G., & Gasol, J. M. (2014). Marked seasonality of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the coastal NW Mediterranean Sea as revealed by cell abundance, pigment concentration & pyrosequencing of *pufM* gene. *Environ. Microbiol.* 16, 2953–2965. doi: 10.1111/1462-2920.12278.
- Ferrera, I., Gasol, J. M., Sebastián, M., Hojerová, E., & Koblížek, M. (2011). Comparison of growth rates of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria and other bacterioplankton groups in coastal mediterranean waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7451–7458. doi: 10.1128/AEM.00208-11.
- Ferrera, I., Sánchez, O., Kolářová, E., Koblížek, M., & Gasol, J. M. (2017). Light enhances the growth rates of natural populations of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *ISME J.* 11, 2391–2393. doi: 10.1038/ismej.2017.79.
- Flombaum, P., Gallegos, J. L., Gordillo, R. A., Rincón, J., Zabala, L. L., Jiao, N., et al. (2013). Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9824–9829. doi: 10.1073/pnas.1307701110.
- Francis, B., Urlich, T., Mikolasch, A., Teeling, H., & Amann, R. (2021). North Sea spring bloom-associated Gammaproteobacteria fill diverse heterotrophic niches. *Environ. Microbiomes* 16, 1–16. doi: 10.1186/s40793-021-00385-y.
- Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G. W., Coleman, M. L., Schuster, S. C., Chisholm, S. W., et al. (2008). Microbial community

- gene expression in ocean surface waters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3805–3810. doi: 10.1073/pnas.0708897105.
- Fuhrman, J. A., & Azam, F. (1982). Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66, 109–120. doi: 10.1007/BF00397184.
- Fuhrman, J. A., & Hagestorm, A. (2008). Bacterial and Archaeal Community structure and its patterns. in *Microbial Ecology of the Oceans, Second Edition*, ed. D. L. Kirchman (John Wiley & Sons, Inc), 45–90.
- Fuks, D., Radić, J., Radić, T., Pečar, O., (2004). Northern Adriatic mesocosm experiment Rovinj 2003: pico- and nanoplankton dynamics. *Periodicum biologorum* 106, 39-47
- Fuks, D., Radić, J., Radić, T., Najdek, M., Blažina, M., Degobbis, D., et. at. (2005). Relationships between heterotrophic bacteria and cyanobacteria in the northern Adriatic in relation to the mucilage phenomenon. *Sci. Total Environ.*, 353, 178-188
- Galand, P. E., Gutiérrez-Provecho, C., Massana, R., Gasol, J. M., & Casamayor, E. O. (2010). Inter-annual recurrence of archaeal assemblages in the coastal NW Mediterranean Sea (Blanes Bay Microbial Observatory). *Limnol. Oceanogr.* 55, 2117–2125. doi: 10.4319/lo.2010.55.5.2117.
- Galand, P. E., Pereira, O., Hochart, C., Auguet, J. C., & Debroas, D. (2018). A strong link between marine microbial community composition and function challenges the idea of functional redundancy. *ISME J.* 12, 2470–2478. doi: 10.1038/s41396-018-0158-1.
- Gasol, J. M., & Morán, X. A. G. (2015). Flow Cytometric Determination of Microbial Abundances and Its Use to Obtain Indices of Community Structure and Relative Activity. in *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* 159–187. doi: 10.1007/8623_2015_139.
- Gavriilidou, A., Gutleben, J., Versluis, D., Forgiarini, F., Van Passel, M. W. J., Ingham, C. J., et al. (2020). Comparative genomic analysis of Flavobacteriaceae: Insights into carbohydrate metabolism, gliding motility and secondary metabolite biosynthesis. *BMC Genomics* 21, 1–21. doi: 10.1186/s12864-020-06971-7.
- Gazulla, C. R., Cabello, A. M., Sánchez, P., Gasol, J. M., Sánchez, O., & Ferrera, I. (2023). A metagenomics and amplicon sequencing combined approach reveals the best primers to study marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Microb. Ecol.* 86, 2161–2172. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02220-y>.
- Ghiglione, J. F., Conan, P., & Pujo-Pay, M. (2009). Diversity of total and active free-living vs. particle-attached bacteria in the euphotic zone of the NW Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol. Lett.* 299, 9–21. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01694.x.
- Giebel, H. A., Wolterink, M., Brinkhoff, T., & Simon, M. (2019). Complementary energy acquisition via aerobic anoxygenic photosynthesis and carbon monoxide oxidation by *Planktomarina temperata* of the Roseobacter group. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, 1–9. doi: 10.1093/femsec/fiz050.
- Giovannoni, S. J., Tripp, H. J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K. J., Baptista, D., et al. (2005). Genome Streamlining in a Cosmopolitan Oceanic Bacterium. *Science* 309, 1242–1245. doi: 10.1126/science.1101010.
- Giovannoni, S. J. (2017). SAR11 Bacteria: The Most Abundant Plankton in the Oceans. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 9, 231–255. doi: 10.1146/annurev-marine-010814-015934.
- Giovannoni, S. J., Cameron Thrash, J., & Temperton, B. (2014). Implications of streamlining theory for microbial ecology. *ISME J.* 8, 1553–1565. doi: 10.1038/ismej.2014.60.
- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V., & Egozcue, J. J. (2017). Microbiome datasets are compositional: and this is not optional. *Front. Microbiol.* 8, 1–6. doi: 10.3389/fmicb.2017.02224.
- Gonzalez, J. M., Simo, R., Massana, R., Covert, J. S., Casamayor, E. O., Pedros-Alio, C., et al. (2000). Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4237–4246. doi: 10.1128/AEM.66.10.4237-4246.2000.
- Grevesse, T., Guéguen, C., Onana, V. E., & Walsh, D. A. (2022). Degradation pathways for organic matter of terrestrial origin are widespread and expressed in Arctic Ocean microbiomes. *Microbiome* 10, 1–21. doi: 10.1186/s40168-022-01417-6.
- Grote, J., Cameron Thrash, J., Huggett, M. J., Landry, Z. C., Carini, P., Giovannoni, S. J., et al. (2012). Streamlining and core genome conservation among highly divergent members of the SAR11 clade. *MBio* 3, 1–13. doi: 10.1128/mBio.00252-12.
- Harashima, K., Shiba, T., & Murata, N. (1989). Aerobic Photosynthetic Bacteria. *Japan Scientific Societies Press*, 167 pp.
- Harding, T., Jungblut, A. D., Lovejoy, C., & Vincent, W. F. (2011). Microbes in High Arctic Snow and Implications for the Cold Biosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3234–3243. doi: 10.1128/AEM.02611-10.
- Haro-Moreno, J. M., Rodríguez-Valera, F., López-García, P., Moreira, D., & Martín-Cuadrado, A. B. (2017). New insights into marine group III Euryarchaeota, from dark to light. *ISME J.* 11, 1102–1117. doi: 10.1038/ismej.2016.188.
- Harrison, J. P., Chronopoulou, P. M., Salonen, I. S., Jilbert, T., & Koho, K. A. (2021). 16S and 18S rRNA Gene Metabarcoding Provide Congruent Information on the Responses of Sediment Communities to Eutrophication. *Front. Mar. Sci.* 8. doi: 10.3389/fmars.2021.708716.
- Hart, M. L., Meyer, A., Johnson, P. J., & Ericsson, A. C. (2015). Comparative Evaluation of DNA Extraction Methods from Feces of Multiple Host Species for Downstream Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 10. doi: 10.1371/journal.pone.0143334.
- Hauruseu, D., & Koblížek, M. (2012). Influence of light on carbon utilization in aerobic anoxygenic phototrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7414–7419. doi: 10.1128/AEM.01747-12.
- Henderson, G., Cox, F., Kittelmann, S., Miri, V. H., Zethof, M., Noel, S. J., et al. (2013). Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS One* 8, 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0074787.
- Hermans, S. M., Buckley, H. L., & Lear, G. (2018). Optimal extraction methods for the simultaneous analysis of DNA from diverse organisms and sample types. *Mol. Ecol. Resour.* 18, 557–569. doi: 10.1111/1755-0998.12762.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* 35, 518–522. doi: 10.1093/molbev/msx281.

- Hoarfrost, A., Nayfach, S., Ladau, J., Yooseph, S., Arnosti, C., Dupont, C. L., et al. (2020). Global ecotypes in the ubiquitous marine clade SAR86. *ISME J.* 14, 178–188. doi: 10.1038/s41396-019-0516-7.
- Hodzic, J., Gurbeta, L., Omanovic-Miklicanin, E., & Badnjevic, A. (2017). Overview of Next-generation Sequencing Platforms Used in Published Draft Plant Genomes in Light of Genotypization of Immortelle Plant (*Helichrysum Arenalium*). *Med. Arch. (Sarajevo, Bosnia Herzegovina)* 71, 288–292. doi: 10.5455/medarh.2017.71.288-292.
- Hojerová, E., Mašin, M., Brunet, C., Ferrera, L., Gasol, J. M., & Koblížek, M. (2011). Distribution and growth of aerobic anoxygenic phototrophs in the Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol.* 13, 2717–2725. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02540.x.
- Hutchinson, G. E. (1961). The paradox of the plankton. *Am. Nat.* 95, 137–145. doi: 10.1017/CBO9781139095075.008.
- Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Lv, G., Deng, S., Wu, Y., et al. (2009). Abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes on the Tibetan plateau. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 268–278. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00616.x.
- Jiao, N., Zhang, Y., Zeng, Y., Hong, N., Liu, R., Chen, F., et al. (2007). Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean. *Environ. Microbiol.* 9, 3091–3099. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01419.x.
- Justić, D., Rabalais, N. N., Turner, R. E., & Dortch, Q. (1995). Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: Stoichiometric nutrient balance and its consequences. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 40, 339–356. doi: 10.1016/S0272-7714(05)80014-9.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* 14, 587–589. doi: 10.1038/nmeth.4285.
- Karner, M., DeLong, E., & Karl, D. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409, 507–510. doi: 10.1038/35054051
- Kasalický, V., Zeng, Y., Piwosz, K., Šimek, K., Kratochvilová, H., & Koblížek, M. (2018). Aerobic anoxygenic photosynthesis is commonly present within the genus *Limnohabitans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84. doi: 10.1128/AEM.02116-17.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010.
- Kembel, S. W., Wu, M., Eisen, J. A., & Green, J. L. (2012). Incorporating 16S Gene Copy Number Information Improves Estimates of Microbial Diversity & Abundance. *PLoS Comput. Biol.* 8. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002743.
- Kennedy, N. A., Walker, A. W., Berry, S. H., Duncan, S. H., Farquarson, F. M., Louis, P., et al. (2014). The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One* 9. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0088982.
- Kirchman, D. L. (2002). The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 91–100. doi: 10.1016/S0168-6496(01)00206-9.
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., et al. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 410–422. doi: 10.1038/s41579-018-0029-9.
- Koblížek, M. (2015). Ecology of aerobic anoxygenic phototrophs in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 854–870. doi: 10.1093/femsre/fuv032.
- Koblížek, M., Mašin, M., Ras, J., Poulton, A. J., & Prášil, O. (2007). Rapid growth rates of aerobic anoxygenic phototrophs in the ocean. *Environ. Microbiol.* 9, 2401–2406. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01354.x.
- Koblížek, M., Mlčoušková, J., Kolber, Z., & Kopecký, J. (2010). On the photosynthetic properties of marine bacterium COL2P belonging to Roseobacter clade. *Arch. Microbiol.* 192, 41–49. doi: 10.1007/s00203-009-0529-0.
- Koblížek, M., Moulisová, V., Muroňová, M., & Oborník, M. (2015). Horizontal transfers of two types of puf operons among phototrophic members of the Roseobacter clade. *Folia Microbiol. (Praha)*. 60, 37–43. doi: 10.1007/s12223-014-0337-z.
- Kohonen, T. (2013). Essentials of the self-organizing map. *Neural Networks* 37, 52–65. doi: 10.1016/j.neunet.2012.09.018.
- Kolber, Z. S., Plumley, F. G., Lang, A. S., Beatty, J. T., Blankenship, R. E., Vandover, C. L., et al. (2001). Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* 292, 2492–2495. doi: 10.1126/science.1059707.
- Korlević, M. (2015). Detaljna analiza bakterijske raznolikosti jadranskoga mora. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
- Korlević, M., Pop Ristova, P., Garić, R., Amann, R., & Orlić, S. (2015). Bacterial diversity in the South Adriatic Sea during a strong, deep winter convection year. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1715–1726. doi: 10.1128/AEM.03410-14.
- Koroleff, F., & Grasshoff, K. (1976). *Methods of seawater analysis*. ed. K. Grasshoff doi: 10.1002/ange.19770890738.
- Krstulović, N., & Šolić, M. (2006). *Mikrobiologija mora*. Institut za Oceanografiju i Ribarstvo, Split.
- Kubota, K. (2013). CARD-FISH for environmental microorganisms: Technical advancement and future applications. *Microbes Environ.* 28, 3–12. doi: 10.1264/jisme2.ME12107.
- Labrenz, M., Tindall, B. J., Lawson, P. A., Collins, M. D., Schumann, P., & Hirsch, P. (2000). *Staleyia guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., α -3-proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 303–313. doi: 10.1099/00207713-50-1-303.
- Lahti, L., Shetty, S., Blake, T., & Salojarvi, J. (2017). microbiome R package.
- Lambert, S., Tragin, M., Lozano, J. C., Ghiglione, J. F., Vaulot, D., Bouget, F. Y., et al. (2019). Rhythmicity of coastal marine picoeukaryotes, bacteria and archaea despite irregular environmental perturbations. *ISME J.* 13, 388–401. doi: 10.1038/s41396-018-0281-z.
- Lamy, D., De Carvalho-Maalouf, P., Cottrell, M. T., Lami, R., Catala, P., Oriol, L., et al. (2011). Seasonal dynamics of aerobic anoxygenic phototrophs in a Mediterranean coastal lagoon. *Aquat. Microb. Ecol.* 62, 153–163. doi: 10.3354/ame01467.
- Lee, M. (2019). Happy Belly Bioinformatics: an open-source resource dedicated to helping biologists utilize bioinformatics. *J. Open Source Educ.* 2, 53. doi: 10.21105/jose.00053.

- Lehours, A. C., Enault, F., Boeuf, D., & Jeanthon, C. (2018). Biogeographic patterns of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria reveal an ecological consistency of phylogenetic clades in different oceanic biomes. *Sci. Rep.* 8, 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-22413-7.
- Liu, M., Xue, Y., & Yang, J. (2019). Rare Plankton Subcommunities Are Far More Affected by DNA Extraction Kits Than Abundant Plankton. *Front. Microbiol.* 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00454.
- Louca, S., Doebeli, M., & Parfrey, L. W. (2018). Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome* 6, 1–12. doi: 10.1186/s40168-018-0420-9.
- Luo, H., & Moran, M. A. (2014). Evolutionary Ecology of the Marine Roseobacter Clade. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 573–587. doi: 10.1128/mmbr.00020-14.
- Ma, Z. Y., Zhang, X. M., Wang, R., Wang, M., Liu, T., & Tan, Z. L. (2020). Effects of Chemical and Mechanical Lysis on Microbial DNA Yield, Integrity, and Downstream Amplicon Sequencing of Rumen Bacteria and Protozoa. *Front. Microbiol.* 11, 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2020.581227.
- Magalhães, C., Semedo, M., Vezzi, A., Øvreås, L., Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., et al. (2021). Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3-V4 and V4-V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Front. Microbiol.* 12, doi: 10.3389/fmicb.2021.637526.
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963. doi: 10.1093/bioinformatics/btr507.
- Manti, A., Boi, P., Semprucci, F., Cataudella, R., & Papa, S. (2012). Picoplankton Community Composition by CARD-FISH and Flow Cytometric Techniques: A Preliminary Study in Central Adriatic Sea Water. *Int. J. Oceanogr.* 2012, 1–8. doi: 10.1155/2012/909718.
- 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. doi: 10.1099/13500872-142-5-1097.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., & Schleifer, K. H. (1992). Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593–600. doi: 10.1016/S0723-2020(11)80121-9.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* 17, 10–12.
- Martinetz, T. M., Berkovich, S. G., & Schulten, K. J. (1993). “Neural-Gas” Network for Vector Quantization and its Application to Time-Series Prediction. *IEEE Trans. Neural Networks* 4, 558–569. doi: 10.1109/72.238311.
- Mary, I., Cummings, D. G., Biegala, I. C., Burkill, P. H., Archer, S. D., & Zubkov, M. V. (2006). Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure at a coastal station in the western English Channel. *Aquat. Microb. Ecol.* 42, 119–126. doi: 10.3354/ame042119.
- Mašin, M., Nedoma, J., Pechar, L., & Koblížek, M. (2008). Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in temperate freshwater systems. *Environ. Microbiol.* 10, 1988–1996. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01615.x.
- Mašin, M., Zdun, A., Stoň-Egiert, J., Nausch, M., Labrenz, M., Moulisová, V., et al. (2006). Seasonal changes and diversity of aerobic anoxygenic phototrophs in the Baltic Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 45, 247–254. doi: 10.3354/ame045247.
- Mateus-Barros, E., Meneghini, A. K., Bagatini, I. L., Fernandes, C. C., Kishi, L. T., Vieira, A. A. H., et al. (2019). Comparison of two DNA extraction methods widely used in aquatic microbial ecology. *J. Microbiol. Methods* 159, 12–17. doi: 10.1016/j.mimet.2019.02.005.
- McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2017). Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. *Mol. Diagnostics Third Ed.*, 371–394. doi: 10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Comput. Biol.* 10. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003531.
- Medová, H., Boldareva, E. N., Hrouzek, P., Borzenko, S. V., Namsaraev, Z. B., Gorlenko, V. M., et al. (2011). High abundances of aerobic anoxygenic phototrophs in saline steppe lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 393–400. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01059.x.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., et al. (2020). IQ-TREE 2: New Models & Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1530–1534. doi: 10.1093/molbev/msaa015.
- Moran, M. A., González, J. M., & Kiene, R. P. (2003). Linking a bacterial taxon to sulfur cycling in the sea: Studies of the marine Roseobacter group. *Geomicrobiol. J.* 20, 375–388. doi: 10.1080/01490450303901.
- Morris, R. M., Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., Siebold, W. A., Carlson, C. A., et al. (2002). SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420, 806–810. doi: 10.1038/nature01240.
- Mujakić, I., Andrei, A. Ş., Shabarova, T., Fecskeová, L. K., Salcher, M. M., Piwosz, K., et al. (2021). Common Presence of Phototrophic Gemmatimonadota in Temperate Freshwater Lakes. *mSystems* 6. doi: 10.1128/msystems.01241-20.
- Mujakić, I., Piwosz, K., & Koblížek, M. (2022). Phylum Gemmatimonadota and Its Role in the Environment. *Microorganisms* 10, 1–17. doi: 10.3390/microorganisms10010151.
- Muñoz-Colmenero, M., Sánchez, A., Correa, B., Figueiras, F. G., Garrido, J. L., & Sotelo, C. G. (2021). Evaluation of DNA Extraction Methods and Bioinformatic Pipelines for Marine Nano- & Pico-Eukaryotic Plankton Analysis. *Front. Mar. Sci.* 7. doi: 10.3389/fmars.2020.584253.
- Nakai, R. (2020). Size matters: Ultra-small and filterable microorganisms in the environment. *Microbes Environ.* 35, 1–11. doi: 10.1264/jsme2.ME20025.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: Regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 43–60. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134247.
- Okamura, K., Mitsumori, F., Ito, O., Takamiya, K. I., & Nishimura, M. (1986). Aerobic Photosynthetic Bacterium,

- Erythrobacter* sp. Strain OCh14. *J. Bacteriol.* 168, 1142–1146.
- Okamura, K., Takamiya, K. & Nishimura, M. (1985). Photosynthetic electron transfer system is inoperative in anaerobic cells of *Erythrobacter* species strain OCh14. *Arch. Microbiol.* 142, 12–17. doi: 10.1007/BF00409229.
- Oksanen, A. J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., et al. (2020). vegan community ecology package version 2.5-7 November 2020.
- Orellana, L. H., Francis, T. Ben, Ferraro, M., Hehemann, J. H., Fuchs, B. M., & Amann, R. I. (2022). Verrucomicrobiota are specialist consumers of sulfated methyl pentoses during diatom blooms. *ISME J.* 16, 630–641. doi: 10.1038/s41396-021-01105-7.
- Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734–740. doi: 10.1126/science.276.5313.734.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. 1–55. doi: 10.1007/978-1-4757-0611-6_1.
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* 18, 1403–1414. doi: 10.1111/1462-2920.13023.
- Partensky, F., Blanchot, J., & Vaulot, D. (1999). Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. in *Marine Cyanobacteria, Bull. l'institut océanographique* 19, 457–475.
- Pedersen, T. L. (2022). patchwork: The Composer of Plots. R package version 1.1.2.
- Pei, A. Y., Oberdorf, W. E., Nossa, C. W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E. A., et al. (2010). Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3886–3897. doi: 10.1128/AEM.02953-09.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2002). Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3094–3101. doi: 10.1128/AEM.68.6.3094-3101.2002.
- Pernthaler, J. (2005). Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 537–546. doi: 10.1038/nrmicro1180.
- Pinhassi, J., & Berman, T. (2003). Differential growth response of colony-forming α - and γ -proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the Eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 199–211. doi: 10.1128/AEM.69.1.199-211.2003.
- Pinhassi, J., Gómez-Consarnau, L., Alonso-Sáez, L., Sala, M. M., Vidal, M., Pedrós-Alió, C., et al. (2006). Seasonal changes in bacterioplankton nutrient limitation and their effects on bacterial community composition in the NW Mediterranean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 44, 241–252.
- Pinto, O. H. B., Silva, T. F., Vizzotto, C. S., Santana, R. H., Lopes, F. A. C., Silva, B. S., et al. (2020). Genome-resolved metagenomic analysis provides insights into the ecological role of Thaumarchaeota in the Amazon River and its plume. *BMC Microbiol.* 20, 1–11. doi: 10.1186/s12866-020-1698-x.
- Piwoz, K., Villena-Aleman, C., & Mujakić, I. (2022). Photoheterotrophy by aerobic anoxygenic bacteria modulates carbon fluxes in a freshwater lake. *ISME J.* 16, 1046–1054. doi: 10.1038/s41396-021-01142-2.
- Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T., & Watson, M. (2018). The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus “Best Practice” for 16S Microbiome Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02627-17. doi: 10.1128/AEM.02627-17.
- Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K. H., Simu, K., Lundberg, P., et al. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol. Ecol.* 16, 867–880. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03189.x.
- Pommier, T., Neal, P. R., Gasol, J. M., Coll, M., Acinas, S. G., & Pedrós-Alió, C. (2010). Spatial patterns of bacterial richness and evenness in the NW Mediterranean Sea explored by pyrosequencing of the 16S rRNA. *Aquat. Microb. Ecol.* 61, 221–233. doi: 10.3354/ame01484.
- Poretsky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One* 9. doi: 10.1371/journal.pone.0093827.
- Qin, W., Martens-Habben, W., Kobelt, J. N., & Stahl, D. A. (2016). *Candidatus Nitrosopumilus*. *Bergey's Man. Syst. Archaea Bact.*, 1–9. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01290.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219.
- Quero, G. M., & Luna, G. M. (2014). Diversity of rare and abundant bacteria in surface waters of the Southern Adriatic Sea. *Mar. Genomics* 17, 9–15. doi: 10.1016/j.margen.2014.04.002.
- Rappe, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., & Giovannoni, S. J. (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418, 1–3.
- Radić, T., Radić, J., Najdek, M., Fuks, D., Blažina, M. (2003) Potential of the northern Adriatic bacterioplankton for the production of transparent exopolymer particles. *Periodicum biologorum*, 105, 381–387.
- Radić, T., Kraus, R., Fuks, D., Radić, J., Pečar, O. (2005) Transparent exopolymeric particles' distribution in the northern Adriatic and their relation to microphytoplankton biomass and composition. *Sci. Total Environ.*, 353, 151–161.
- Renshaw, M. A., Olds, B. P., Jerde, C. L., Mcveigh, M. M., & Lodge, D. M. (2015). The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 168–176. doi: 10.1111/1755-0998.12281.
- Rinke, C., Rubino, F., Messer, L. F., Youssef, N., Parks, D. H., Chuvochina, M., et al. (2019). A phylogenomic and ecological analysis of the globally abundant Marine Group II archaea (Ca. Poseidoniales ord. nov.). *ISME J.* 13, 663–675. doi: 10.1038/s41396-018-0282-y.
- Riou, V., Périot, M., & Biegala, I. C. (2017). Specificity re-evaluation of oligonucleotide probes for the detection of marine picoplankton by tyramide signal amplification-fluorescent in situ hybridization. *Front. Microbiol.* 8, 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2017.00854.

- Russel, J. (2022). MicEco: Various functions for microbial community data. R package version 0.9.18. Available at: <https://github.com/Russel88/MicEco>.
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., et al. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 12, 1–12. doi: 10.1186/s12915-014-0087-z.
- Sánchez, O., Ferrera, I., Mabrito, I., Gazulla, C. R., Sebastián, M., Auladell, A., et al. (2020). Seasonal impact of grazing, viral mortality, resource availability and light on the group-specific growth rates of coastal Mediterranean bacterioplankton. *Sci. Rep.* 10. doi: 10.1038/s41598-020-76590-5.
- Sandaa, R. A., Gómez-Consarnau, L., Pinhassi, J., Riemann, L., Malits, A., Weinbauer, M. G., et al. (2009). Viral control of bacterial biodiversity - Evidence from a nutrient-enriched marine mesocosm experiment. *Environ. Microbiol.* 11, 2585–2597. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01983.x.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Santoro, A. E., Dupont, C. L., Richter, R. A., Craig, M. T., Carini, P., McIlvin, M. R., et al. (2015). Genomic and proteomic characterization of “*Candidatus Nitrosopelagicus brevis*”: An ammonia-oxidizing archaeon from the open ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1173–1178. doi: 10.1073/pnas.1416223112.
- Santos, A. L., Oliveira, V., Baptista, I., Henriques, I., Gomes, N. C. M., Almeida, A., et al. (2012). Effects of UV-B radiation on the structural and physiological diversity of bacterioneuston and bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2066–2069. doi: 10.1128/AEM.06344-11.
- Santos, A., van Aerle, R., Barrientos, L., & Martinez-Urtaza, J. (2020). Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 296–305. doi: 10.1016/j.csbj.2020.01.005.
- Sarmiento, J. L., Hughes, T. M. C., Stouffer, R. J., & Manabe, S. (1998). Simulated response of the ocean carbon cycle to anthropogenic climate warming. *Nature* 393, 245–249. doi: 10.1038/258748a0.
- Schada von Borzyskowski, L., Severi, F., Krüger, K., Hermann, L., Gilardet, A., Sippel, F., et al. (2019). Marine Proteobacteria metabolize glycolate via the β -hydroxyaspartate cycle. *Nature* 575, 500–504. doi: 10.1038/s41586-019-1748-4.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., et al. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing & comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & John, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Schwalbach, M. S., & Fuhrman, J. A. (2005). Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR. *Limnol. Oceanogr.* 50, 620–628. doi: 10.4319/lo.2005.50.2.0620.
- Shiba, T. (1987). O₂ regulation of bacteriochlorophyll synthesis in the aerobic bacterium *Erythrobacter*. *Plant Cell Physiol.* 28, 1313–20.
- Shiba, T. (1991). *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., Aerobic Pink-Pigmented Bacteria which Contain Bacteriochlorophyll a. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 140–145. doi: 10.1016/S0723-2020(11)80292-4.
- Shiba, T., & Simidu, U. (1982). *Erythrobacter longus* gen. nov., sp. nov., an Aerobic Bacterium Which Contains Bacteriochlorophyll a. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 211–217.
- Simon, M., Scheuner, C., Meier-Kolthoff, J. P., Brinkhoff, T., Wagner-Döbler, I., Ulbrich, M., et al. (2017). Phylogenomics of Rhodobacteraceae reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats. *ISME J.* 11, 1483–1499. doi: 10.1038/ismej.2016.198.
- Simonato F., Gómez-Pereira P.R., Fuchs B.M., & Amann R. (2010). Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Syst Appl Microbiol.* 33, 128–38
- Sintes, E., Witte, H., Stodderegger, K., Steiner, P., & Herndl, G. J. (2013). Temporal dynamics in the free-living bacterial community composition in the coastal North Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 413–424. doi: 10.1111/1574-6941.12003.
- Sisk-Hackworth, L., & Kelley, S. T. (2020). An application of compositional data analysis to multiomic time-series data. *NAR Genomics Bioinforma.* 2. doi: 10.1093/nargab/lqaa079.
- Sow, S. L. S., Brown, M. V., Clarke, L. J., Bissett, A., van de Kamp, J., Trull, T. W., et al. (2022). Biogeography of Southern Ocean prokaryotes: a comparison of the Indian and Pacific sectors. *Environ. Microbiol.* 24, 2449–2466. doi: 10.1111/1462-2920.15906.
- Spring, S., Riedel, T., Spröer, C., Yan, S., Harder, J., & Fuchs, B. M. (2013). Taxonomy and evolution of bacteriochlorophyll a-containing members of the OM60/NOR5 clade of marine gammaproteobacteria: Description of *Luminiphilus sylvensis* gen. nov., sp. nov., reclassification of *Halia rubra* as *Pseudohalia rubra* gen. nov., comb. nov. *BMC Microbiol.* 13, 1–21. doi: 10.1186/1471-2180-13-118.
- Stegman, M. R., Cottrell, M. T., & Kirchman, D. L. (2014). Leucine incorporation by aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Delaware estuary. *ISME J.* 8, 2339–2348. doi: 10.1038/ismej.2014.75.
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., & Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 43, D593–D598. doi: 10.1093/nar/gku1201.
- Stoecker, D. K., Hansen, P. J., Caron, D. A., & Mitra, A. (2017). Mixotrophy in the Marine Plankton. *Annual review of marine science*, 9, 311–335. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060617>
- Stoler, N., & Nekrutenko, A. (2021). Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. *NAR Genomics Bioinforma.* 3. doi: 10.1093/nargab/lqab019.
- Stojan I., Trumbić Ž., Lepen Pleić I., & Šantić D. (2023). Evaluation of DNA extraction methods and direct PCR in metabarcoding of mock and marine bacterial communities. *Front. Microbiol.* 14. doi: 10.3389/fmicb.2023.1151907

- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis*. doi: 10.2307/1979241.
- Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K. Q., & Yang, J. (2012). Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: Methods, application, and perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 993–1003. doi: 10.1007/s00253-011-3800-7.
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses - Major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 801–812. doi: 10.1038/nrmicro1750.
- Suyama, T., Shigematsu, T., Suzuki, T., Tokiwa, Y., Kanagawa, T., Nagashima, K. V. P., et al. (2002). Photosynthetic apparatus in *Roseateles depolymerans* 61A is transcriptionally induced by carbon limitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1665–1673. doi: 10.1128/AEM.68.4.1665-1673.2002.
- Sze, M. A., & Schloss, P. D. (2019). The Impact of DNA Polymerase and Number of Rounds of Amplification in PCR on 16S rRNA Gene Sequence Data. *mSphere* 4, 1–13. doi: 10.1128/msphere.00163-19.
- Šantić, D., Kovačević, V., Bensi, M., Giani, M., Vrdoljak Tomaš, A., Ordulj, M., Santinelli, C., Šestanović, S., Šolić, M., & Grbec, B. (2019). Picoplankton Distribution and Activity in the Deep Waters of the Southern Adriatic Sea. *Water*. 11, 1655. doi:10.3390/w11081655.
- Šantić, D., Krstulović, N., Šolić, M., Ordulj, M., & Kušpilić, G. (2013). Dynamics of prokaryotic picoplankton community in the central and southern Adriatic Sea (Croatia). *Helgol. Mar. Res.* 67, 471–481. doi: 10.1007/s10152-012-0336-x.
- Šantić, D., Piwoż, K., Matic, F., Vrdoljak Tomaš, A., Arapov, J., Dean, J. L., et al. (2021). Artificial neural network analysis of microbial diversity in the central and southern Adriatic Sea. *Sci. Rep.* 11, 1–15. doi: 10.1038/s41598-021-90863-7.
- Šantić, D., Šestanović, S., Vrdoljak, A., Šolić, M., Kušpilić, G., Ninčević Gladan, Ž., et al. (2017). Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in the Eastern Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.* 130, 134–141. doi: 10.1016/j.marenvres.2017.07.012.
- Šantić, D., Stojan, I., Matic, F., Trumbić, Ž., Tomaš, A. V., Fredotović, Ž., et al. (2023). Picoplankton diversity in an oligotrophic and high salinity environment in the central Adriatic Sea. *Sci. Rep.* 13. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-023-34704-9.
- Šlouf, V., Fuciman, M., Dulebo, A., Kaftan, D., Koblížek, M., Frank, H. A., et al. (2013). Carotenoid charge transfer states and their role in energy transfer processes in LH1-RC complexes from aerobic anoxygenic phototrophs. *J. Phys. Chem. B* 117, 10987–10999. doi: 10.1021/jp309278y.
- Šolić, M., Grbec, B., Matic, F., Šantić, D., Šestanović, S., Ninčević Gladan, Ž., et al. (2018). Spatio-temporal reproducibility of the microbial food web structure associated with the change in temperature: Long-term observations in the Adriatic Sea. *Prog. Oceanogr.* 161, 87–101. doi: 10.1016/j.pcean.2018.02.003.
- Šolić, M., Krstulović, N., Šantić, D., Šestanović, S., Kušpilić, G., Bojanić, N., et al. (2017). Impact of the 3 °C temperature rise on bacterial growth and carbon transfer towards higher trophic levels: Empirical models for the Adriatic Sea. *J. Mar. Syst.* 173, 81–89. doi: 10.1016/j.jmarsys.2017.01.001.
- Šolić, M., Šantić, D., Šestanović, S., Bojanić, N., Jozić, S., Ordulj, M., et al. (2020). Changes in the trophic pathways within the microbial food web in the global warming scenario: An experimental study in the adriatic sea. *Microorganisms* 8, 1–23. doi: 10.3390/microorganisms8040510.
- Šolić, M., Šantić, D., Šestanović, S., Kušpilić, G., Matic, F., Vrdoljak Tomaš, A., et al. (2022). Changing Ecological Conditions in the Marine Environment Generate Different Microbial Food Web Structures in a Repeatable Manner. *Front. Mar. Sci.* 8. doi: 10.3389/fmars.2021.811155.
- Takaichi, S., Shimada, K., & Ishidzu, J. (1990). Carotenoids from the aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus*: β -Carotene and its hydroxyl derivatives. *Arch. Microbiol.* 153, 118–122. doi: 10.1007/BF00247807.
- Tang, K., Jiao, N., Liu, K., Zhang, Y., & Li, S. (2012). Distribution and functions of tonB-dependent transporters in marine bacteria and environments: Implications for dissolved organic matter utilization. *PLoS One* 7. doi: 10.1371/journal.pone.0041204.
- Tao, Z.-Y., Zhang, P.-Y., Zhang, L., Li, C.-C., Hu, R., Zhu, H.-W., et al. (2022). The Comparison of PCR Kits for the Detection of Erythrocytic Parasites on Filter Paper. *J. Trop. Med.* doi: 10.1155/2022/5715436.
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C. M., et al. (2012). Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science* 336, 608–611. doi: 10.1126/science.1218344.
- Teira, E., Gasol, J. M., Aranguren-Gassis, M., Fernández, A., González, J., Lekunberri, I., et al. (2008). Linkages between bacterioplankton community composition, heterotrophic carbon cycling and environmental conditions in a highly dynamic coastal ecosystem. *Environ. Microbiol.* 10, 906–917. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01509.x.
- Teira, E., Martínez-García, S., Lønborg, C., & Álvarez-Salgado, X. A. (2009). Growth rates of different phylogenetic bacterioplankton groups in a coastal upwelling system. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 545–554. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00079.x.
- Teng, Z. J., Qin, Q. L., Zhang, W., Li, J., Fu, H. H., Wang, P., et al. (2021). Biogeographic traits of dimethyl sulfide & dimethylsulfoniopropionate cycling in polar oceans. *Microbiome* 9, 1–17. doi: https://doi.org/10.1186/s40168-021-01153-3.
- Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. (2011). Environmental & gut Bacteroidetes: The food connection. *Front. Microbiol.* 2, 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2011.00093.
- Tsilimigras, M. C. B., & Fodor, A. A. (2016). Compositional data analysis of the microbiome: fundamentals, tools, and challenges. *Ann. Epidemiol.* 26, 330–335. doi: 10.1016/j.annepidem.2016.03.002.
- Vetrovsky, T., & Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS One* 8. doi: 10.1371/journal.pone.0057923.
- Vilibić, I., & Šantić, D. (2008). Deep water ventilation traced by *Synechococcus* cyanobacteria. *Ocean Dynamics* 58, 119–125. doi: 10.1007/s10236-008-0135-8.
- Vilibić, I., Matijević, S., Šepić, J., & Kušpilić, G. (2012). Changes in the Adriatic oceanographic properties induced by the

- Eastern Mediterranean Transient. *Biogeosciences* 9, 2085–2097. doi: 10.5194/bg-9-2085-2012.
- Villena-Aleman, C., Mujakić, I., Porcal, P., Koblížek, M., & Piwosz, K. (2023a). Diversity dynamics of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a freshwater lake. *Environ. Microbiol. Rep.* 15, 60–71. doi: 10.1111/1758-2229.13131.
- Villena-Aleman, C., Mujakić, I., Fecskeova, L. K., Woodhouse, J., Auladell, A., Dean, J., et al. (2023b). Phenology and ecological role of Aerobic Anoxygenic Phototrophs in fresh waters. *Microbiome* 12(65) doi:10.1186/s40168-024-01786-0
- Vinayaka, A. C., Ngo, T. A., Kant, K., Engelsmann, P., Dave, V. P., Shahbazi, M. A., et al. (2019). Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration & direct PCR. *Biosens. Bioelectron.* 129, 224–230. doi: 10.1016/j.bios.2018.09.078.
- Vrdoljak Tomaš, A. (2020). Uloga aerobnih anoksiogenih fototrofa u strukturi i dinamici mikrobne zajednice na području Srednjeg Jadrana. Sveučilište u Splitu
- Vrdoljak Tomaš, A., Šantić, D., Šolić, M., Ordulj, M., Jozić, S., Šestanović, S., et al. (2019). Dynamics of Aerobic Anoxygenic Phototrophs along the trophic gradient in the central Adriatic Sea. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 164, 112–121. doi: 10.1016/j.dsr2.2019.06.001.
- Vrdoljak Tomaš, A., Šantić, D., Šolić, M., Skejić, S., Milinković, A., Kušan, A. C., et al. (2023a). How do open coastal fire episodes' impact sea surface microlayer neuston communities? *Sci. Total Environ.* 861. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160593.
- Vrdoljak Tomaš, A., Šantić, D., Stojan, I., & Šolić, M. (2023b). Aerobic anoxygenic phototrophs of the Adriatic Sea. *Acta Adriat.* 64, 1–10. doi: 10.32582/aa.64.1.1.
- Waidner, L. A., & Kirchman, D. L. (2007). Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3936–3944. doi: 10.1128/AEM.00592-07.
- Walden, C., Carbonero, F., & Zhang, W. (2017). Assessing impacts of DNA extraction methods on next generation sequencing of water and wastewater samples. *J. Microbiol. Methods* 141, 10–16. doi: 10.1016/j.mimet.2017.07.007.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07.
- Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., et al. (2022). gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data. R package version 3.1.3. Available at: <https://cran.r-project.org/package=gplots>.
- Wesolowska-Andersen, A., Bahl, M. I., Carvalho, V., Kristiansen, K., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., et al. (2014). Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. *Microbiome* 2. doi: 10.1186/2049-2618-2-19.
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer, NY*.
- Wintzingerode, F. V., Göbel, U. B., & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213–229. doi: 10.1016/S0168-6445(97)00057-0.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms (archaeobacteria/eubacteria/urkaryote/16S ribosomal RNA/molecular phylogeny). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090.
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17, 1–8. doi: 10.1186/s12859-016-0992-y.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., et al. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 635–645. doi: 10.1038/nrmicro3330.
- Yeh, Y.C., Needham, D. M., Sieradzki, E. T., & Fuhrman, J. A. (2018). Taxon Disappearance from Microbiome Analysis Reinforces the Value of Mock Communities as a Standard in Every Sequencing Run. *mSystems* 3, 1–9. doi: 10.1128/msystems.00023-18.
- Yurkov, V., & Beatty, J. T. (1998a). Isolation of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria from black smoker plume waters of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 337–341. doi: 10.1128/aem.64.1.337-341.1998.
- Yurkov, V., & Csotonyi, J. T. (2009). New Light on Aerobic Anoxygenic Phototrophs. 31–55. doi: 10.1007/978-1-4020-8815-5_3.
- Yurkov, V. V., & Beatty, J. T. (1998b). Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 695–724. doi: 10.1128/membr.62.3.695-724.1998.
- Yutin, N., Suzuki, M. T., & Béjà, O. (2005). Novel primers reveal wider diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8958–8962. doi: 10.1128/AEM.71.12.8958-8962.2005.
- Yutin, N., Suzuki, M. T., Teeling, H., Weber, M., Venter, J. C., Rusch, D. B., et al. (2007). Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes. *Environ. Microbiol.* 9, 1464–1475. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01265.x.
- Zhang, C. L., Xie, W., Martin-Cuadrado, A. B., & Rodriguez-Valera, F. (2015). Marine Group II Archaea, potentially important players in the global ocean carbon cycle. *Front. Microbiol.* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01108.
- Zhao, W., & Andersson, S. G. E. (2014). Single cell genomics of deep ocean bacteria. *Trends Microbiol.* 22, 233–234. doi: 10.1016/j.tim.2014.03.002.
- Zhong, H., Zhong, H., Lehtovirta-Morley, L., Liu, J., Liu, J., Zheng, Y., et al. (2020). Novel insights into the Thaumarchaeota in the deepest oceans: Their metabolism and potential adaptation mechanisms. *Microbiome* 8, 1–16. doi: 10.1186/s40168-020-00849-2.
- Zhu, X. Y., Li, Y., Xue, C. X., Lidbury, I. D. E. A., Todd, J. D., Lea-Smith, D. J., et al. (2023). Deep-sea Bacteroidetes from the Mariana Trench specialize in hemicellulose and pectin degradation typically associated with terrestrial systems. *Microbiome* 11, 1–15. doi: 10.1186/s40168-023-01618-7.

7. PRILOZI

Prilog S1: Detaljni protokoli izolacije DNA iz 0,22 µm PES filtera taloženjem izopropanolom i etanolom (protokoli B2, odnosno B3)

1. Izrezati PES filter veličine pora 0,22 µm (promjera 47 mm) sterilnim skalpelom na pola, a potom na manje dijelove.
2. Pripremiti svježi 10 x TEN pufer sastava 0,1 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA pH 8,0, 1 M NaCl, konačni pH otopine 8,0. Pufer je potrebno temeljito promiješati te filter-sterilizirati kroz filter veličine pora 0,1 µm. Dodati 750 µL svježe pripremljenog 10 x TEN pufera za lizu stanica u svaku tubicu, filteri moraju biti u potpunosti uronjeni.
3. Inkubirati 1 sat pri sobnoj temperaturi.
4. Svakom uzorku dodati 25 µl otopine lizozima konačne koncentracije 1 mg/ml otopljenog u TEN puferu (svježe pripremljenog, 1 mg lizozima potpuno otopiti u 1 mL svježe pripremljenog TEN pufera, 25 µl takve svježe otopine dodati u svaku tubicu). Temeljito promiješati okretanjem tubice nekoliko puta. Od ove točke nadalje ne smije se vorteksirati.
5. Inkubirati 1,30 h pri 37°C u bloku za grijanje.
6. Dodati 0,2 mg/ml proteinaze K u svaki uzorak.
7. Dodati 40 µl 20% SDS i lagano resuspendirati.
8. Inkubirati 1 h pri 65 °C, nakon čega slijedi 10 min inkubacije pri 95 °C (grijaći blok).
9. Centrifugirati na 18000 RCF 20 min pri sobnoj temperaturi.
10. Prebaciti vodeni sloj (~700 µL) u novu tubicu volumena 2 mL, oprezno izbjegavajući ostatke stanica.
11. Za taloženje izopropanolom: dodati **jedan volumen izopropanola (protokol B2)**; za taloženje etanolom: dodati **dva volumena apsolutnog etanola (protokol B3)**.
12. Inkubirati preko noći pri -20°C.
13. Centrifugirati na 20000 RCF, 30 min pri 4°C.
14. Odbaciti supernatant i talog isprati dvaput s 500 µl hladnog 70% etanola.
15. Centrifugirati na 20000 RCF 10 min pri 4°C.
16. Ukloniti sav zaostali etanol (kratko centrifugirati i odpipetirati).
17. Osušiti talog na zraku ili ga kratko inkubirati pri 37°C dok sav etanol ne ispari u potpunosti.
18. Resuspendirati osušeni talog u 35 µl čiste H₂O ili u 1 x TE puferu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH ~8,0). Pohraniti izoliranu DNA do daljnje upotrebe pri -20°C.

Prilog S2. Broj sekvenci po uzorku koje su prošle kroz svaki korak *dada2* tijekom obrade podataka; „input“- broj neobrađenih sirovih sekvenci, „filtered“- filtrirane (uklonjene) sekvence niske kvalitete i repovi sekvenci, $Q < 30$, „denoisedF“ i „denoisedR“- sekvence nakon *dada* algoritma „forward“ odnosno „reverse“ očitavanja, „merged“: spojene sekvence „forward“ i „reverse“ očitavanja s najmanje 12 preklopljenih identičnih baza u području preklapanja, „nonchim“- sekvence nakon uklanjanja kimera. Uzorci 10-16S i 35-16S izbačeni su iz daljnjih analiza zbog nezadovoljavajućeg početnog broja sekvenci. B1: standardna fenol/kloroform/izoamil izolacija, B2 i B3: izopropanol i etanol precipitacija, K1: DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), K2: modificirani DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN), P: izravni PCR, Platinum Universal Master Mix (Invitrogen).

Sample_ID	Metoda	input	filtered	denoisedF	denoisedR	merged	nonchim
UZORCI „MOCK“ ZAJEDNICE							
1-16S	K2	148050	73246	73071	73033	72544	71973
2-16S	K2	102885	66073	65891	65821	65441	64741
3-16S	K2	93632	57054	56832	56776	56185	55167
4-16S	K1	26067	14123	14066	13999	13774	13384
5-16S	K1	209148	142488	142126	142020	141190	138938
6-16S	K1	162192	106225	105950	105968	105279	103611
8-16S	B1	12004	8281	8206	8174	7983	7772
9-16S	B1	7212	4712	4655	4531	4366	4265
10-16S	B1	348	201	180	174	169	167
11-16S	B1	3032	1825	1797	1783	1738	1735
23-16S	B1	2723	1419	1351	1335	1276	1273
12-16S	B2	16038	8899	8830	8779	8627	8574
13-16S	B2	58830	40477	40274	40128	39653	39043
14-16S	B2	28062	18255	18121	18109	17858	17674
15-16S	B2	6862	4634	4576	4541	4399	4356
24-16S	B2	98342	53325	53097	53041	52362	51578
25-16S	B2	54600	39116	38880	38797	38343	37895
16-16S	B3	10238	6977	6897	6820	6604	6563
17-16S	B3	219478	110818	110522	110524	109219	106028
18-16S	B3	214378	128246	127821	127715	126060	121166
19-16S	B3	17950	9598	9515	9465	9133	8977
26-16S	B3	9046	6873	6727	6689	6455	6315
27-16S	B3	24477	18036	17804	17751	17348	16987
dPCR4	P	73721	61108	60937	60897	60490	59263
dPCR5	P	436222	355294	353623	354203	349089	334541
dPCR6	P	21484	17856	17718	17603	17097	16177
UZORCI MORA IZ 2022. GODINE							

29-16S	K1	2603	2273	2036	1971	1603	1561
30-16S	K1	2688	2259	2041	2046	1650	1578
31-16S	K1	2280	1937	1763	1722	1394	1310
32-16S	K2	1553	1319	1162	1094	908	857
33-16S	K2	1964	1655	1474	1462	1159	1142
34-16S	K2	3328	2922	2685	2594	2117	2037
35-16S	B1	285	219	157	132	112	108
36-16S	B1	2483	1975	1782	1739	1427	1395
37-16S	B1	3840	3287	3031	2979	2482	2400
38-16S	B2	5161	4158	3856	3798	3220	3148
39-16S	B2	2853	2198	1973	1971	1686	1630
40-16S	B2	10809	8701	8217	8182	7124	6965
41-16S	B3	3446	2720	2527	2369	1948	1875
42-16S	B3	2858	2349	2114	2070	1673	1609
43-16S	B3	4647	3786	3484	3359	2726	2659
dPCR1	P	15592	14326	13539	13353	11281	10751
dPCR2	P	15028	13704	12987	12680	10680	10190
dPCR3	P	24917	22848	21494	21284	17682	16654
UZORCI MORA IZ 2020. GODINE							
1	B1	28783	25250	24681	24632	23298	22832
2	B1	22471	19704	19223	19186	18173	17896
3	B1	59311	51895	51193	51086	49492	48862
4	B3	49539	43104	42220	42221	40269	39727
5	B2	72052	62147	61286	61331	59507	58656
6	B3	51376	45118	44385	44171	42676	42005
7	B2	42852	37608	36902	36862	35448	34915
8	K1	21115	17932	17800	17729	17375	16999
9	K1	21165	18279	18169	18218	17966	17710
10	K1	17028	14897	14683	14694	14363	14049
11	P	47636	42218	41026	40826	37874	36964
12	P	53571	47185	46137	45830	42724	41511
13	P	57985	49356	48196	47947	44610	43218

8. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

U ovom je doktorskom radu određena prostorno-sezonalna dinamika mikrobne zajednice područja srednjeg Jadrana tijekom jednogodišnjeg terenskog istraživanja s naglaskom na zajednicu aerobnih anoksigenih fototrofa (AAF). Metabarkodiranjem 16S rRNA gena biljega ukupne bakterijske i arhealne zajednice te metabarkodiranjem *pufM* gena biljega zajednice aerobnih anoksigenih fototrofa, određene su strukture zajednica na finijim taksonomskim razinama te su procijenjene mjere raznolikosti. CARD- i IC-FISH metodama određene su brojnosti i dinamika glavnih bakterijskih skupina. Kako bi se otkrili obrasci unutar zajednica i protumačili u odnosu na najznačajnije okolišne čimbenike, provedeni su algoritmi umjetnih neuronskih mreža (NG, *neural gas*). Pripadnici klada SAR11 prevladavali su u raznolikim uvjetima. Ostali pripadnici razreda Alphaproteobacteria preferirali su okoliš povećanog saliniteta, dok su pripadnici Gammaproteobacteria prevladavali ljeti. Uočen je opći obrazac povećanja ukupne mikrobne raznolikosti pripadnika mikrobne zajednice na račun brojnosti u oligotrofnim uvjetima, posebice prilikom povećanja saliniteta. Uzimajući u obzir AAF zajednicu, primijećena je statistički značajna sezonalnost s obzirom na apsolutne brojnosti (maksimalne prosječne brojnosti u proljeće: $2,136 \pm 0,081 \times 10^4$ stanica mL^{-1} , minimalne ljeti: $0,86 \times 10^4$ stanica mL^{-1}), IC-FISH brojnosti grupa (klad *Roseobacter* prevladavao je u jesen, razredi Alpha- i Gammaproteobacteria ljeti) i *pufM* podatke aglomerirane na razinu roda (razlike u mjerama raznolikosti). Nisu uočene razlike u prostornom ni vertikalnom profilu. AAF zajednica je u istraživanom području bila poprilično heterogena s najvećim prosječnim relativnim udjelom pripadnika klada *Roseobacter* (37,66%), zatim Gammaproteobacteria (35,25%) i naposljetku Alphaproteobacteria (31,15%). Sastavom zajednice dominirale su Gammaproteobacteria klada NOR5/OM60, točnije rod *Luminiphilus*, s brojnim drugim rodovima prisutnima u niskim relativnim brojnostima ispod 1%. Inverzni odnos AAF brojnosti i raznolikosti (Shannonov i Pielouov indeks) primijećen je ljeti, ali nije uočen za ostala godišnja doba. Visoka raznolikost AAF zajednice bila je neovisna o temperaturi i salinitetu te trofičkom statusu okoliša što ukazuje na potencijalno različito ponašanje navedene zajednice u usporedbi s općom bakterijskom populacijom. Uz navedeno, izvršena je detaljna usporedba pet različitih metoda izolacije DNA i izravnog PCR-a na uzorcima „mock“ i morske mikrobne zajednice kao temeljnog koraka u istraživanjima temeljnim na metabarkodiranju. Svaka je metoda rezultirala pristranostima prema određenom taksonu dodanom u umjetno stvorenu „mock“ zajednicu te nijedna nije bila najbliža teoretski očekivanom sastavu. Dokazano je da se konvencionalni protokol DNA izolacije temeljen na fenolu i kloroformu može zamijeniti njegovim kraćim i sigurnijim varijantama temeljenima na precipitaciji izopropanolom odnosno etanolom. Rezultati izravnog PCR pokazali su prednosti smanjenog vremena manipulacije uzorcima.

9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

In this doctoral thesis, spatio-temporal dynamics of the microbial community of the central Adriatic Sea during a one-year field study was determined, with an emphasis on the community of aerobic anoxygenic phototrophs (AAPs). By 16S rRNA gene metabarcoding of the total bacterial and archaeal communities as well as *pufM* gene metabarcoding of the AAP community, community structures at finer taxonomic scale were determined and measures of diversity were estimated. CARD- and IR-FISH methods were used to enumerate the abundances and dynamics of the main bacterial groups. In order to detect and interpret patterns within microbial communities in relation to the most significant environmental factors, artificial neural network algorithms (NG, *neural gas*) were implemented. Members of the SAR11 clade prevailed under diverse environmental conditions. Other members of Alphaproteobacteria class preferred an environment of increased salinity, while members of Gammaproteobacteria predominated in summer. A general pattern of increasing microbial diversity at the expense of microbial abundance was observed in oligotrophic conditions, especially when salinity increased. Considering the AAP community, statistically significant seasonality was observed regarding absolute abundances (maximum average abundances in spring $2.136 \pm 0.081 \times 10^4$ cells mL⁻¹, minimum in summer 0.86×10^4 cells mL⁻¹), IR-FISH groups (*Roseobacter* clade prevalent in autumn, classes Alpha- and Gammaproteobacteria in summer) and *pufM* data agglomerated at genus level (differences in diversity metrics). No differences were observed in spatial or vertical profile. The AAF community in research area was quite heterogeneous with the highest average relative contribution of *Roseobacter* clade (37.66%), followed by Gammaproteobacteria (35.25%) and finally Alphaproteobacteria (31.15%). The community composition was dominated by Gammaproteobacteria clade NOR5/OM60, specifically genus *Luminiphilus*, with numerous other genera present in low relative abundances below 1%. An inverse relationship between AAF abundance and diversity metrics (Shannon's and Pielou's indices) was observed in summer, but not in other seasons. The high diversity of the AAF community was independent of temperature and salinity, as well as the trophic status, indicating a potentially different behavior of this community compared to the general bacterial population. Additionally, a detailed comparison of five different methods of DNA isolation and direct PCR was performed on mock community samples and marine microbial communities as a fundamental step in metabarcoding-based research. Each method resulted in biases towards a particular taxon added to the artificially created mock community, and none was closest to the theoretically expected microbial composition. It has been shown that the conventional DNA isolation protocol based on phenol and chloroform can be replaced by its shorter and safer alternatives based on precipitation with isopropanol or ethanol. The results of direct PCR showed the advantages of reduced sample manipulation time.

10. ZNANSTVENI RADOVI I SUDJELOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

Objavljeni znanstveni radovi:

- **Stojan, I.**, Šantić, D., Villena-Alemaný, C., Trumbić, Ž., Matic, F., Vrdoljak Tomaš, A., et al. (2024). Ecology of Aerobic Anoxygenic Phototrophs on a fine-scale taxonomic resolution in Adriatic Sea unravelled by unsupervised neural network. *Environ. microbiome*
- **Stojan, I.**, Trumbić, Ž., Lepen Pleić, I., and Šantić, D. (2023). Evaluation of DNA extraction methods and direct PCR in metabarcoding of mock and marine bacterial communities. *Front. Microbiol.* 14:1151907. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1151907>.
- Šantić, D., **Stojan, I.**, Matic, F., Trumbić, Ž., Tomaš, A. V., Fredotović, Ž., et al. (2023). Picoplankton diversity in an oligotrophic and high salinity environment in the central Adriatic Sea. *Sci. Rep.* 13, 7617. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34704-9>.
- Vrdoljak Tomaš, A., Šantić, D., **Stojan, I.**, and Šolić, M. (2023). Aerobic anoxygenic phototrophs of the Adriatic Sea. *Acta Adriat.* 64, 1–10. doi: 10.32582/aa.64.1.1.

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima:

- **Stojan, I.**, Trumbić, Ž., Fredotović, Ž., and Šantić, D. (2022). Ecology of the Aerobic Anoxygenic Phototrophs in the Adriatic Sea (ADRISAAF) // ISME18 Lausanne, Švicarska
- Trumbić Ž., **Stojan I.**, Lepen Pleić I. Vrdoljak Tomaš A., Fredotović Ž., and Šantić D. (2022). Seasonal aspects of bacterial diversity along trophic gradient in the eastern Adriatic Sea // ISME18 Lausanne, Švicarska

11. KRATKI ŽIVOTOPIS

Rođena sam 8.1.1996 godine u Splitu. Završila sam preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije 2014. godine (*magna cum laude*), a potom i diplomski sveučilišni studij molekularne biologije 2019. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija bila sam demonstrator na laboratorijskim praktikumima kolegija Zoologije, Biljne fiziologije te Molekularne biologije stanice. Istovremeno 2019. godine završavam i dislocirani diplomski studij bioindustrijske tehnike te stječem dodatnu diplomu „*Master in Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*” Sveučilišta u Orleansu, Francuska. Diplomski rad pod naslovom „*Design and production of novel class of miRNA synthetic oligonucleotides for cancer applications*“ izradila sam na Institutu Pasteur u Parizu u Laboratoriju za bioorgansku kemiju nukleinskih kiselina pod vodstvom mentora dr. sc. Marcel Hollensteina. Od 2020. radim kao doktorand/asistent na projektu UIP-2019-04-8401 „*Ekologija aerobnih anoksiogenih fototrofa u Jadranskom moru (ADRISAAP)*” u Laboratoriju za mikrobiologiju na Institutu za okeanografiju i ribarstvo u Splitu, pod mentorstvom dr. sc. Danijele Šantić i komentorstvom izv. prof. dr. sc. Željke Trumbić. Iste godine upisujem poslijediplomski sveučilišni studij Biofizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Tijekom studija sudjelovala sam na dvije bioinformatičke radionice Physalia tečajeva „*Metabarcoding of microbial communities*“ i „*Introduction to UNIX & shell scripting*” te radionicama za PRIMER7/PERMANOVA softver. U svrhu stručnog usavršavanja u bioinformatičkoj obradi podataka dobivenih metabarkodiranjem, provela sam dva tjedna u Laboratoriju za anoksi genu fotosintezu pod vodstvom dr. sc. Michal Kobližeka u Centru Algatech, Češka. Prisustvovala sam simpoziju mikrobne ekologije „*18th International Symposium on Microbial Ecology (ISME18)*“ 2022. godine u Lausanne, Švicarska. Glavno područje interesa su mi primjena i optimizacija protokola molekularne biologije u istraživanjima bakterijskih zajednica s naglaskom na bioinformatičku obradu podataka.