

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA PROKARIOTSKIH ZAJEDNICA U EUKSINOM OKOLIŠU ROGOZNIČKOGA JEZERA

Čanković, Milan

Doctoral thesis / Doktorski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:762877>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-14**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Milan Čanković

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA
PROKARIOTSKIH ZAJEDNICA U
EUKSINOM OKOLIŠU ROGOZNIČKOGA
JEZERA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Milan Čanković

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA
PROKARIOTSKIH ZAJEDNICA U
EUKSINOM OKOLIŠU ROGOZNIČKOGA
JEZERA**

DOKTORSKI RAD

Mentori: dr. sc. Irena Ciglenečki-Jušić
dr. sc. Ines Sviličić Petrić

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Milan Čanković

**MOLECULAR CHARACTERISATION OF
THE PROKARYOTIC COMMUNITIES IN THE
EUXINIC ENVIRONMENT OF ROGOZNICA
LAKE**

DOCTORAL THESIS

Supervisors: dr. sc. Irena Ciglencečki-Jušić
dr. sc. Ines Sviličić Petrić

Zagreb, 2018

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za fiziku mora i kemiju vodenih sustava, Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, pod vodstvom dr. sc. Irene Ciglenečki-Jušić i dr. sc. Ines Sviličić Petrić te u Laboratoriju za mikrobnu ekofiziologiju i ekoinženjerstvo, Odjela za mikrobiologiju, Nacionalnog sveučilišta u Irskoj, Galway, u grupi dr. sc. Gavina Collinsa.

Istraživanja su financirana HRZZ projektom „Sulphur and carbon dynamics in the marine and freshwater environment“ (IP-11-2013-1205, SPHERE) i COST akcijom ES1302 „European Network on Ecological Functions of Trace Metals in Anaerobic Biotechnologies“.

ZAHVALA

Dr. sc. Ireni Ciglenečki-Jušić, hvala na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju, idejama, poticaju i pomoći tijekom izrade doktorskog rada.

Dr. sc. Ines Sviličić Petrić hvala na idejama, beskonačnom strpljenu i nesebično prenesenom znanju i iskustvu tijekom eksperimentalnog rada i obrade podataka.

Dr. sc. Gavinu Collinsu zahvaljujem na susretljivosti i pruženoj prilici za rad i boravak na Odjelu za mikrobiologiju, Nacionalnog sveučilišta u Irskoj, Galway i na smjernicama u interpretaciji rezultata.

Dr. sc. Estefaniji Porca Belio zahvaljujem na pomoći pri eksperimentalnom dijelu rada i na obradi podataka sekvenciranja.

Zahvaljujem članovima Laboratorija za fiziku mora i kemiju vodenih sustava, dr. sc. Mariji Marguš na pomoći prilikom uzorkovanja i elektrokemijskim mjerenjima, Jeleni Dautović na određivanju POC-a i Zdeslavu Zovku na određivanju DOC-a. Dr. sc. Iris Dupčić Radić s Instituta za more i priobalje u Dubrovniku zahvaljujem na analizama nutrijenata.

Hvala djelatnicima Morske postaje Martinska, dr.sc. Elviri Bura-Nakić, dr.sc. Nevenu Cukrovu i Nuši Cukrov na svim lijepim trenucima i ugodnom okruženju tijekom zajedničkih dana provedenih na Martinskoj.

Svim svojim prijateljima i kolegama, Niki, Ivanu, Sanji, Ivoni, Nenadu, Mavri i Abri hvala što su radno okruženje učinili i prijateljskim.

Mami i bratu veliko hvala na podršci i razumijevanju tijekom svih godina školovanja!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Geološki odsjek

Doktorski rad

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA PROKARIOTSKIH ZAJEDNICA U EUKSINOM OKOLIŠU ROGOZNIČKOGA JEZERA

Milan Čanković

Laboratorij za fiziku mora i kemiju vodenih sustava, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb

Sažetak

Primjenom sekvenciranja 16S rRNA gena Sangerovom metodom, sekvenciranjem nove generacije te kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom detaljno je istražena prostorno-vremenska raspodjela, taksonomska struktura i brojnost sulfat-reducirajućih bakterija i ukupnih prokariotskih zajednica u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera. Raspodjela ovih zajednica usko je povezana s fizičko-kemijskim obilježjima okoliša. Tijekom stratifikacije kemoklinom dominira porodica *Chromatiaceae*, monimolimnionom razred *Deltaproteobacteria* i koljeno *Bacteroidetes*, dok je značajno veći udio arheja pronađen u sedimentu. Struktura i brojnost ovih zajednica bila je stabilna tijekom različitih istraživanih sezona, a značajne sezonske promjene uočene su na nižim taksonomskim nivoima sulfat-reducirajućih bakterija gdje u zimskim uvjetima prevladava *Desulfovibrio/Desulfomicrobium* (DSV), a ljeti *Desulfococcus/Desulfonema/Desulfosarcina* (DCC) filogenetska podskupina, koja je karakteristična za sediment. Holomiktični uvjeti doveli su do gotovo potpune promjene u strukturi prokariota u vodenom stupcu jezera. Porodica *Chromatiaceae* zamijenjena je porodicom *Thioglobaceae* (SUP05 klaster), a došlo je i do razvoja razreda *Planctomycetacia* i *Chlorobia*, te pojave bakterija iz koljena *Epsilonbacteraeota* koje nisu zabilježene tijekom stratifikacije. Ciklusi ugljika, dušika i sumpora u jezeru ovisni su o relativno malom broju identificiranih svojti. Za razliku od holomiktičnih uvjeta, tijekom stratifikacije nisu pronađene potencijalne nitrificirajuće i denitrificirajuće bakterije, a udio bakterija s potencijalom za anammox bio je vrlo nizak. Također, pri stratificiranim uvjetima zabilježen je veliki udio neklasificiranih bakterija, posebno u sedimentu. Fiziologija i ekološka uloga ovih bakterija u jezeru je nepoznata, što ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima njihovih morfoloških i funkcionalnih karakteristika.

Ključne riječi: euksinija, prokariotske zajednice, Rogozničko jezero, sekvenciranje, 16S rRNA gen, qPCR

Rad sadrži: 111 stranica, 23 slike, 5 tablica, 258 literaturna navoda, 2 priloga, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb

Mentori: dr.sc. Irena Ciglencečki-Jušić, znanstvena savjetnica, IRB, Zagreb
dr.sc. Ines Sviličić Petrić, znanstvena suradnica, IRB, Zagreb

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Zrinka Ljubešić, PMF, Zagreb
prof. dr. sc. Mladen Šolić, znanstveni savjetnik, IOR, Split
prof. dr. sc. Jasna Hrenović, PMF, Zagreb

Rad je prihvaćen na sjednici Vijeća Geološkog odsjeka PMF-a 29. lipnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Geology

Doctoral thesis

MOLECULAR CHARACTERISATION OF THE PROKARYOTIC COMMUNITIES IN THE EUXINIC ENVIRONMENT OF ROGOZNICA LAKE

Milan Čanković

Laboratory For Physical Chemistry Of Aquatic Systems, Division for Marine and Environmental
Research, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb

Abstract

Spatio-temporal distribution, taxonomic structure as well as the abundance of sulfate-reducing bacteria and the total prokaryotic communities were investigated by Sanger's and next-generation 16S rRNA gene sequencing and quantitative polymerase chain reaction in the chemocline, monimolimnion and sediment of Rogoznica Lake. Distribution of these communities is consistent with physico-chemical partitioning. Clear vertical distribution of microbial communities with family *Chromatiaceae* dominating the chemocline, class *Deltaproteobacteria* and phylum *Bacteroidetes* dominating the monimolimnion with significantly more abundant archaeal populations in sediment, was revealed during the stratification. Their structure and the abundance during the investigated seasons was stable, however, seasonal changes were observed at lower taxonomic levels within sulfate-reducing bacteria. During the winter conditions *Desulfovibrio/Desulfomicrobium* (DSV) phylogenetic subgroup dominates, while during the summer *Desulfococcus/Desulfonema/Desulfosarcina* (DCC) subgroup, which is characteristic for the sediment, is more abundant. Holomictic conditions led to an almost complete change in the structure of the prokaryotic communities in the water column of the lake. *Chromatiaceae* were replaced by *Thioglobaceae* family (SUP05 cluster), while the abundance of *Planctomycetacia* and *Chlorobia* increased, and phylum *Epsilonbacteraeota*, which was not detected during the stratification, appeared. Low number of identified dominant groups underpins the carbon, nitrogen and sulfur cycle. In contrast to holomictic conditions, no potentially nitrifying nor denitrifying bacteria were found during stratification, while the potential for anammox was very weak. Also, in a stratified conditions, a large proportion of unclassified bacteria was detected, especially in the sediment. Their physiology and ecological role in the lake remains unknown, indicating the need for further investigation of their morphological and functional characteristics.

Key words: euxinia, Rogoznica Lake, prokaryotic communities, 16S rRNA gene, sequencing, qPCR

Thesis contains: 111 pages, 23 figures, 5 tables, 258 references, 2 appendices, original in: Croatian

Thesis deposited at National and University Library in Zagreb, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb

Supervisors: dr.sc. Irena Ciglencečki-Jušić, senior scientist, RBI, Zagreb
dr.sc. Ines Sviličić Petrić, research associate, RBI, Zagreb

Reviewers: dr. sc. Zrinka Ljubešić, Associate Professor, Faculty of Science, Zagreb
dr. sc. Mladen Šolić, senior scientist, Institute for Oceanography and Fisheries, Split
dr. sc. Jasna Hrenović, Full Professor, Faculty of Science, Zagreb

Thesis accepted by the Department of Geology, Faculty of Science on 29 June 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ciljevi istraživanja.....	6
2. LITERATURNI PREGLED	7
2.1. Osnovne značajke prokariota	8
2.2. Bakterije i arheje u euksinskim okolišima meromiktičkih jezera	9
2.3. Biogeokemijski procesi u meromiktičkim jezerima.....	12
2.4. Molekularne metode u okolišnoj mikrobiologiji.....	15
3. MATERIJALI I METODE	24
3.1. Uzorkovanje	25
3.2. Određivanje fizičko-kemijskih čimbenika	27
3.3. Izolacija nukleinskih kiselina i reverzna transkripcija	27
3.4. Umnožavanje ciljnih gena SRB i izrada klonskih knjižnica	30
3.4.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR) pri detekciji SRB	30
3.4.2. Kloniranje i izrada klonskih knjižnica SRB.....	32
3.5. Sekvenciranje i obrada podataka	33
3.5.1. Sekvenciranje Sangerovom metodom pri detekciji SRB.....	33
3.5.2. Sekvenciranje visoke propusnosti pri analizi prokariotskih zajednica	34
3.5.3. Statistička obrada podataka	34
3.6. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR).....	35
4. REZULTATI	38
4.1. Okolišni uvjeti u Rogozničkom jezeru	39
4.1.1. Fizičko-kemijski čimbenici tijekom stratifikacije	39
4.1.2. Fizičko-kemijski čimbenici tijekom holomiksije	42
4.2. Taksonomska struktura i prostorno-vremenska raspodjela SRB	44
4.3. Raznolikost sulfat-reducirajućih bakterija	48
4.4. Brojnost ukupnih i sulfat-reducirajućih bakterija.....	50
4.5. Taksonomska struktura i raspodjela prokariotskih zajednica tijekom stratifikacije ...	54
4.6. Taksonomska struktura i raspodjela prokariotskih zajednica tijekom holomiksije	58
4.7. Brojnost prokariotskih 16S rRNA gena	60
4.8. Utjecaj fizičko-kemijskih čimbenika na strukturu prokariotskih zajednica.....	61
4.9. Raznolikost prokariota u Rogozničkom jezeru	63

5. RASPRAVA	67
5.1. Prokariotske zajednice u Rogozničkom jezeru	68
5.2. Sulfat-reducirajuće bakterije u Rogozničkom jezeru	75
6. ZAKLJUČCI	80
7. POPIS LITERATURE	83
8. PRILOZI	103
9. ŽIVOTOPIS	107

1. UVOD

Antonie van Leeuwenhoek (1632.-1723.) otkrio je krajem XVII. stoljeća mikrobni svijet, koristeći ručno izrađeni mikroskop, koji je predstavljao revolucionarni metodološki napredak u to doba. Tijekom XVIII., XIX. i početkom XX. stoljeća napredak u istraživanju mikroorganizama odvijao se nešto sporijim tempom, prateći tehnološki razvoj koji je omogućio istraživanje mikroskopskih životnih formi iz dvije perspektive; kultiviranja i biokemijskih testova na određenom broju bakterijskih sojeva, te morfologije pomoću svjetlosnog, a od kasnih 1930-ih godina i elektronskog mikroskopa. U tom razdoblju, točnije 1866. godine, Ernst Haeckel (1834.-1919.) uveo je pojam *ekologija* kombinirajući grčku riječ *oikos* (grč. dom, prebivalište) i *logos* (grč. nauka, znanje) za ono što danas definiramo kao granu biologije koja proučava veze i interakcije među organizmima i njihovog okoliša. Ideju da su mikroorganizmi sveprisutni i da mogu doprinijeti razumijevanju teorije života na Zemlji začeli su početkom XX. stoljeća Martinus Beijernick (1851.-1931.) i Lourens Baas Becking (1895.-1963.) (de Wit i Bouvier, 2006.). Međutim, tek je Thomas D. Brock, kasnih 1960-ih uveo pojam *mikrobna ekologija*, kako bi integrirao sve discipline koje se bave proučavanjem mikroorganizama i njihovom vezom s okolišem. S obzirom na tehničke poteškoće pri proučavanju mikroorganizama *in situ*, mikrobna ekologija je oduvijek uvelike ovisila o dostupnim metodama.

Koristeći razlike u nukleotidnom slijedu male podjedinice ribosomalne RNA (16S rRNA) kao „molekularni sat“, Carl Woese (1928.-2012.) otkrio je potpuno novu domenu života te promijenio klasičnu podjelu od pet životnih carstava u novu paradigmu temeljenu na tri domene: *Archaea*, *Bacteria* i *Eukarya* (Woese i sur., 1990.). Međutim, *in situ* istraživanja mikroorganizama popularizirala su se tek kada su Norman Pace i suradnici kombinirajući reverznu transkriptazu s tehnikama kloniranja DNA, koje su potom dodatno unaprijeđene razvojem lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*), omogućili jednostavan način dobivanja 16S rRNA sekvenci iz okoliša (Lane i sur., 1985.; Mullis i Faloona, 1989.). Zahvaljujući ovim tehnikama molekularna mikrobna ekologija razvila se u važnu znanstvenu disciplinu koja omogućuje razumijevanje biokemijskih reakcija koje provode mikroorganizmi i njihove uloge u evoluciji života na Zemlji (O'Malley i Dupre, 2007.).

Danas u kopnenim i morskim ekosustavima prevladavaju aerobni procesi. Međutim, začeci života dogodili su se u ranim oceanima, koji su, kao i atmosfera, bili u potpunosti anoksični (Kasting i Siefert, 2003.). Anoksični uvjeti prevladavali su tijekom prve polovine Zemljine prošlosti, sve do pojave oksigene fotosinteze, biološkog procesa putem kojeg su cijanobakterije dobivale energiju pomoću svjetla i vode i otpuštale kisik kao nusprodukt. Mikrobna aktivnost promijenila je sastav atmosfere i dovela do velikog oksigenacijskog događaja prije 2,35

milijardi godina (Blaustein, 2016.). Međutim, dubokomorski okoliši ostali su anoksični, a tonjenje organske tvari iz produktivnog područja (uglavnom kontinentalnog šelfa) dovelo je do stvaranja reduktivnih, odnosno euksinskih uvjeta (vodeni okoliš bez kisika sa slobodnim sumporovodikom (H_2S)), što je poznato i kao Canfieldov ocean (Meyer i Kump, 2008.). Anoksične vodene sredine, bogate sulfidom, tradicionalno su se smatrale „mrtvim zonama“, jer takvi uvjeti uvelike ograničavaju preživljavanje eukariotskih organizama (Vaquer-Sunyer i Duarte, 2008.; Ekau i sur., 2010.), ali predstavljaju „vruće točke“ za istraživanje prokariota (Garcia-Cantizano i sur., 2005; Barberan i Casamayor, 2011.). Danas su anoksični i euksinski uvjeti rijetki, a javljaju se u poluzatvorenim bazenima, fjordovima, obalnim upwelling zonama i meromiktičkim jezerima (Hamilton i sur., 2016.). Zbog povećane primarne produkcije, uslijed eutrofikacije, broj hipoksičnih okoliša, koji posljedično dovode do anoksije i euksinije, od početka 1950-ih porastao s 20 na preko 400, čime je zahvaćeno $>245\ 000\ km^2$ obalnih područja (Diaz i Rosenberg, 2008.). Ova činjenica ukazuje na važnost razumijevanja fizičko-kemijskih i bioloških procesa koji se odvijaju u takvim područjima kako bi ih što bolje mogli pratiti, karakterizirati i definirati, te po mogućnosti spriječiti njihovo nastajanje.

Od navedenih okoliša, meromiktička jezera predstavljaju ekosustave od posebnog interesa. Zbog vertikalne stabilnosti, odnosno izražene stratifikacije vodenog stupca, jasno definirane kemokline i permanentno anoksičnog monimolimniona, meromiktička jezera predstavljaju idealne modele za istraživanje prijelaznih redoks zona (Baatar i sur., 2016.). Prema Hutchinsonu (1957.) meromiktično jezero je ono u kojem donji vodeni sloj (kemijski drukčiji) ostaje djelomično ili potpuno neizmješšan s površinskim vodenim slojem u razdoblju dužem od jedne godine. Findenegg (1935.) je uveo pojam monimolimnion za duboki pridneni sloj, a Hutchinson (1937) je površinski sloj, nazvao miksolimnion. Kemoklina je granični sloj između oksičnog miksolimniona i anoksičnog monimolimniona, unutar kojeg dolazi do naglih promjena mnogih fizičko-kemijskih parametara (Zadereev i sur., 2017.). Visoke koncentracije otopljenih tvari u monimolimnionu dovode do stvaranja gradijenta gustoće vodenog stupca, koji raste s dubinom i ograničava vertikalno miješanje vodenih slojeva, a samim tim i transport topline i otopljenih tvari. Posljedica toga je stvaranje izraženog i stabilnog kemijskog gradijenta duž vertikalnog profila vodenog stupca. Ti gradijenti mogu biti jako izraženi, tako da primjerice miksolimnion može biti slatkovodan, dok salinitet u monimolimnionu može prelaziti tipične vrijednosti za morsku vodu. Uvjeti u monimolimnion ostaju nepromijenjeni sve dok postoji dovoljno jaka stratifikacija tj. gravitacijska stabilnost vodenog stupca (Boehrer i sur., 2014.; Zachara i sur., 2016.). Međutim, gibanja unutar monimolimniona postoje, a nastaju kao rezultat razlike u tlakovima među slojevima. Također, zabilježena je i vertikalna cirkulacija unutar

monimolimniona uzrokovana dvostrukom difuznom konvekcijom (vrsta konvekcije koja nastaje između dva sloja različite gustoće i s različitim stupnjem difuzije), koja ne narušava stratifikaciju i meromiktička obilježja jezera (Imboden, 1995.; von Rohden i sur., 2009.). Zbog izoliranosti od atmosferskih utjecaja i izmjene plinova, u monimolimnionu prevladavaju procesi potrošnje u odnosu na procese proizvodnje kisika, što dovodi to stvaranja anoksije i sniženja redoks potencijala koji u tom sloju poprima negativne vrijednosti. Ove značajke meromiktičkih jezera omogućuju stvaranje mnogobrojnih niša unutar vodenog stupca i razvoj različitih mikroorganizama (Zadereev i sur., 2017.). Osim što su neobična, meromiktička jezera su i rijetka. Do danas ih je opisano 177 što čini < 1% svih jezera na svijetu, a najviše ih je u Sjevernoj Americi (79) i Europi (28) (Hall i Northcote, 2012.).

Na mediteranskoj obali nekoliko je morskih jezera s meromiktičkim obilježjima: Laguna de la Cruz, krška jezera Ciso i El Tobar u Španjolskoj, Slano jezero na Kreti, jezero Aitoliko u Grčkoj i Faro u Italiji (Miracle i sur., 1992.; Khresat i Rawajfih, 1999.; Kehayias i sur., 2013.; Zagami i Brugnano, 2013.). Jedinstveni primjer takvog okoliša na jadranskoj obali je Rogozničko jezero, među lokalnim stanovništvom poznato i kao Zmajevno oko. Smješteno je na poluotoku Gradina (43°32'N, 15°58'E) u mjestu Rogoznica. Jezero je krška depresija ispunjena morskom vodom, površine 10 276 m², maksimalne duljine 143 m i dubine do 15 m (Mihelčić i sur., 1996.; Žic i Branica, 2006.). Zaštićeno je od vjetra liticama visokim od 4 do 23 m, koje sprečavaju miješanje uzrokovano vjetrom. Budući da jezero nema vidljive površinske ili podpovršinske veze s morem, izmjena vode između jezera i otvorenog mora događa se kroz pore karbonatnih stijena. Morske mijene vidljive su na okolnim stijenama, ali s faznim pomakom od otprilike 2 sata u odnosu na otvoreno more (Ciglonečki i sur., 2017.). Rogozničko jezero je tijekom godine termalno i kemijski stratificirano u oksični u anoksični sloj. Zbog specifičnih uvjeta, u oksičnom miksolimnionu zastupljen je relativno mali broj fitoplanktonskih i zooplanktonskih vrsta. Od kopepodnih vrsta prisutni su *Acartia italica* Steuer (mediteranski endem), *Tigriopus* sp. i jedna neidentificirana harpaktikoidna vrsta (Kršinić i sur., 2013.; Ciglonečki i sur., 2015.). Među fitoplanktonom dominiraju dijatomeje (*Chaetoceros curvisetus*, *Thalassionema nitzschioides*, *Dactyliosolen fragilissimus*) koje su također zastupljene s relativno malim brojem vrsta, ali s gustoćom populacija većom nego u okolnom moru (Svensen i sur., 2008.; Burić i sur., 2009.). Zbog aktivnosti fitoplanktona, površinski sloj jezera je dobro oksigeniran, a visoka produkcija dovodi do povećanog donosa organske tvari i nutrijenata u dublje slojeve, uzrokujući hipoksiju/anoksiju i mikrobnu proizvodnju H₂S (Kamyshny i sur., 2011.; Pjevac i sur., 2015.). Na granici oksije i anoksije formira se 50-cm-debeo sloj kemokline, čija debljina i položaj unutar vodenog stupca variraju sezonski i ovisno o meteorološkim prilikama, a

monimolimnion se uglavnom stalno nalazi ispod 10 m dubine (Ciglenečki i sur., 2017.). Kemoklinu karakteriziraju guste populacije anoksiogenih fototrofa, koje ovom sloju daju vidljivu ružičastu boju (Ciglenečki i sur., 1998.; Pjevac i sur., 2015.). Zbog intenzivne biološke aktivnosti u kemoklini su povišene vrijednosti tiosulfata (do 80 μM) i elementarnog sumpora (do 150 μM) (Bura-Nakić i sur., 2009.; Kamyshny i sur., 2011.). U anoksičnom monimolimnionu povišene su koncentracije specija joda (do 1 μM), nutrijenata (NH_4^+ do 150 μM , PO_4^{3-} do 22 μM , SiO_4^{4-} do 400 μM), otopljenog organskog ugljika (DOC, do 6 mg/l) i reduciranih sumpornih specija, uglavnom u formi sulfida (do 5 mM). U odnosu na oksični miksolimnion, kemoklina i monimolimnion su slojevi s povećanom bakterijskom brojnošću i aktivnošću (Šestanović i sur., 2005.). Sediment u Rogozničkom jezeru je mulj i glina čija su najvažnija komponenta biološki nastali karbonati. Najzastupljeniji mineral je kalцит (65-92%) nakon čega slijede aragonit, kvarc, dolomit i pirit (Ciglenečki i sur., 2006.). Sediment je laminiran, što ukazuje da nema bioturbacije ili druge fizičke sile koja može uzrokovati njegovo miješanje. Holomiksija (miješanje cijelog vodenog stupca) ovisi meteorološkim prilikama koje utječu na vertikalnu stabilnost vodenog stupca, a najčešće se događa u jesen kada zbog naglog hlađenja dolazi do tonjenja gornjeg oksigeniranog sloja. Ova pojava zabilježena je 1997., 2003., 2011. i 2016. godine (Bura-Nakić i sur., 2009.; Ciglenečki i sur., 2015.). Tijekom holomiksije, visoke koncentracije H_2S iz pridnenog, dolaze u površinski sloj, gdje se oksidiraju do polisulfida i elementarnog sumpora, koji jezeru daju mliječno bijelu boju i smanjuju prozirnost vode (Ciglenečki i sur., 2017.). Potrošnja kisika tijekom ovog procesa oksidacije dovodi do pojave anoksije u cijelom vodenom stupcu, koja posljedično uzrokuje ugibanje fitoplanktonskih, zooplanktonskih i viših organizama (Kršinić i sur., 2000.; Barić i sur., 2003.). Takvi uvjeti pogoduju razvoju fotosintetskih sumpornih bakterija duž cijelog vodeog stupca jezera (Krstulović i Šolić, 2001.). Tijekom holomiksije transport amonijaka prema površinskom sloju omogućava proces nitrifikacije što je vidljivo iz povišenih koncentracija nitrata i nitrita (Žic i sur., 2013.). S druge strane, brzi donos nutrijentima bogate vode (posebno P) iz monimolimniona na površinu, smanjuje N:P omjer. Tijekom stratifikacije površinski sloj je limitiran fosforom, dok za vrijeme i nakon holomiksije cijeli vodeni stupac postaje limitiran dušikom, što uvelike utječe na biološke procese u jezeru (Ciglenečki i sur., 2015.; Ciglenečki i sur., 2017.)

Rogozničko jezero je, dakle, tipičan primjer euksinskog vodenog sustava, koji se u svojim biološkim, geokemijskim, geomorfološkim i hidrološkim značajkama, uključujući njegov volumen i dostupnost anoksičnog sloja, bitno razlikuje od dobro poznatih anoksičnih sustava kao što su Crno more, fjord Framvaren (Norveška) i jezero Pavin (Francuska) (Ciglenečki i

sur., 2017.). Ove specifičnosti, čine ga dobrom lokacijom za istraživanje bioloških i kemijskih procesa koji se odvijaju u hipoksičnim i anoksičnim, odnosno euksinskim morskim okolišima.

1.1. Ciljevi istraživanja

Poznavanje funkcioniranja meromiktičkih jezera, kao što je Rogozničko jezero, od iznimne je važnosti za razumijevanje Zemljine prošlosti kao i za razumijevanje okolišnih promjena budući da se pojavnost takvih područja u oceanima tijekom nekoliko proteklih desetljeća znatno povećala.

Istraživanje raznolikosti nekultiviranih mikroorganizama i metaboličkog potencijala kompleksnih prokariotskih zajednica u euksinskim okolišima, predstavlja izazov u modernoj mikrobnoj ekologiji, a danas dostupne molekularne tehnike omogućavaju detaljna istraživanja taksonomske i genetičke raznolikosti te uloge mikrobnih zajednica u ciklusima kruženja ugljika, dušika i sumpora u ovim ekosustavima (Wright i sur., 2012.). Mikroorganizmi žive u okolišima koji su u gotovo istoj mjeri definirani njima samima kao i fizičko-kemijskim obilježjima tog okoliša (Fuhrman, 2009.), stoga je pri istraživanju procesa koji reguliraju funkcioniranje ekosustava, uz strukturu i brojnost mikrobnih zajednica, nužno uzeti u obzir i fizičko-kemijske karakteristike samoga okoliša (Wright i sur., 2012.).

Stoga su ciljevi ovog rada:

1. Primjenom molekularnih metoda istražiti, okarakterizirati te utvrditi raznolikost i brojnost ukupnih prokariotskih zajednica u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera.
2. Primjenom molekularnih metoda istražiti, okarakterizirati te utvrditi raznolikost i brojnost sulfat-reducirajućih bakterija u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera.
3. Na temelju strukture zajednica i analiza fizičko-kemijskih čimbenika predložiti potencijalne biokemijske procese u istraživanim zonama jezera.

Istraživanjem će se testirati sljedeće hipoteze:

1. Promjene u strukturi i brojnosti zajednica u skladu su s fizičko-kemijskim uvjetima u različitim zonama jezera te pokazuju sezonsku varijabilnost.
2. Visoke koncentracije nutrijenata i organske tvari utječu na promjene u strukturi i brojnosti prokariotskih zajednica.
3. Kompleksni biokemijski procesi u istraživanim zonama jezera uključuju veliku mikrobnu bioraznolikost koja raste s dubinom.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Osnovne značajke prokariota

Bakterije i arheje u vodenim ekosustavima pripadaju pikoplanktonskoj frakciji (veličine 0,2 – 2 μm), a uključuju različite funkcionalne skupine poput primarnih proizvođača, fotoheterotrofa, heterotrofa, fiksatora dušika, nitrifikatora i denitrifikatora (Gasol i Kirchman, 2018.).

Arheje (prethodno nazvane arhebakterije), kao i bakterije pripadaju prokariotima. Otkrivene su tek 70-ih godina prošlog stoljeća kada su Carl Woese i suradnici (1977.) sekvencirajući 16S rRNA gen, otkrili postojanje dviju vrlo različitih skupina prokariota. Skupina „drukčijih bakterija“, koje su živjele u vrlo ekstremnim uvjetima okoliša ili su proizvodile metan, na filogenetskom stablu bila je u potpunosti odvojena od ostalih bakterija i eukariota, što je dovelo do podjele svih životnih formi u tri domene: *Bacteria*, *Archaea* i *Eukarya* (Munn, 2011.). Arheje su filogenetski bliže eukariotima nego bakterijama. Zajedničko obilježje im je jednostavna stanična organizacija bez jezgrine membrane, ali imaju niz fundamentalnih razlika, detaljno prikazanih u Tablici 1.

Tablica 1. Strukturne i fiziološke razlike između tri životne domene (modificirano iz Madigan i sur., 2017.)

	OBILJEŽJE	BAKTERIJE	ARHEJE	EUKARIOTI
1.	Prokariotska stanična struktura	+	+	-
2.	DNA u cirkularnom obliku	+	+	-
3.	Prisutnost histonskih proteina ^a	-	+	+
4.	Jezgrina membrana	-	-	+
5.	Stanična stijenka od mureinske kiseline	+	-	-
6.	Membranski lipidi	Masne kiseline	Ugljikohidrati	Masne kiseline
7.	Veličina ribosoma	70S	70S	80S
8.	Inicijator tRNA	Formil-metionin	Metionin	Metionin
9.	Introni u većini gena ^b	-	-	+
10.	Operoni	+	+	-
11.	Plazmidi	+	+	Rijetko
12.	Ribosomi osjetljivi na difterija toksin	-	+	+
13.	Osjetljivost na kloramfenikol, streptomycin i kanamicin	+	-	-
<i>Fiziologija i posebne strukture</i>				
14.	Metanogeneza	+	+	-
15.	Nitrifikacija	+	+	-
16.	Fiksacija dušika	+	+	-
17.	Fotosinteza (klorofil II)	+	-	+
18.	Plinske vakuole	+	+	-
19.	Kemolitotrofija	+	+	-
20.	Granule od poli- β -hidroksialkanoata	+	+	-
21.	Rast iznad 80°C	+	+	-
22.	Rast iznad 100°C	-	+	-

^a –Histoni: proteini prisutni u eukariotskim stanicama; histoni i DNA daju strukturu kromosoma u eukariota; proteini u kromosomima arheja su drukčiji; ^b – Nekodirajuća sekvenca unutar gena; ^c – Operoni su skupine gena kontrolirane jednim operatorom, obično prisutni u prokariotima

Prema podacima iz fosilnih ostataka, prokarioti su bili jedini oblici života tijekom prvih 2,1 milijardi godina od postanka Zemlje. Tijekom toga razdoblja, razvili su većinu metaboličkih puteva koji su danas prisutni u svim oblicima života, uključujući replikaciju DNA, sintezu proteina putem transkripcije i translacije, fotosintezu, te anaerobni i aerobni metabolizam (Parfrey i sur., 2011.; Pace i sur., 2012.). Od otprilike 22 000 ljudskih gena koji kodiraju proteine, 60% ih je homologno prokariotskim genima (Stein 2004.; Domazet-Lošo i Tautz, 2008.). Arheje, iako metabolički manje raznolike od bakterija i eukariota, dobro su prilagođene ekstremnim uvjetima, stoga mnogi termofilni, acidofilni, alkalofilni i halofilni mikroorganizmi pripadaju upravo ovoj domeni (Bench-Osmolovskaya i Atomi, 2015.).

2.2. Bakterije i arheje u euksinskim okolišima meromiktičkih jezera

Mikrobne zajednice u kemoklini potencijalno su važna komponenta hranidbene mreže meromiktičkih jezera. Prisutnost fototrofnih sumpornih bakterija uobičajena je u kemoklini mnogih meromiktičkih jezera, gdje koriste svjetlost kao izvor energije, a reducirane spojeve tj. sulfid kao izvor elektrona u procesu fotosinteze (Camacho i sur., 2000.). Dubina na kojoj se ove bakterije razvijaju, međutim, nije uniforma s obzirom da intenzitet svjetla, koje je nužno za njihov rast, uvelike ovisi o prozirnosti vode. U jezerima s relativno plitkim monimolimnionom ovi fototrofi obično formiraju tanke slojeve u kemoklini, dajući vizualno prepoznatljivu ljubičastu (PBS, purpurne sumporne bakterije), zelenu ili smeđu (GSO, zelene sumporne bakterije) boju vode (Tonolla i sur., 2003.). Osim dostupnosti svjetla i sulfida, razlike u salinitetu također mogu utjecati na razvoj različitih slojeva PSB i GSB i njihovu razdiobu u vertikalnom profilu jezera, kao što je primijećeno u meromiktičkom jezeru El Tobar (Španjolska) (Garcia-Gil i sur., 1999.; Camacho i sur., 2002.). Iako je ekofiziologija fototrofnih sumpornih bakterija proučavana u morskim i slatkovodnim ekosustavima (Overmann i van Gemerden, 2000.; Musat i sur., 2008.), trofička uloga ovih bakterijskih zajednica, koje često imaju i visoku biomasu i visoku proizvodnju, još uvijek nije dovoljno istražena.

Uporabom novih, molekularno-genetičkih metoda, uključujući i sekvenciranje, pokazalo se da se struktura bakterijskih zajednica uvelike razlikuje, čak i među meromiktičkim jezerima koja su geografski vrlo blizu. Nadalje, utvrđeno je i da se zajednice znatno razlikuju između oksičnog i anoksičnog sloja pojedinih jezera, te da su bakterijska raznolikost i brojnost konzistentno više u anoksičnom nego u oksičnom sloju (Baatar i sur., 2016.). Tako je primjerice filogenetska raznolikost u jezeru Mono (SAD) u kemoklini i monimolimnionu veća nego u

miksolimnionu, te uključuje i novi klad *Bacteroidetes* (Melack 2002.). Slični rezultati zabilježeni su i za prokariotske zajednice u hipersalinim meromiktičkim jezerima Ursu i Fara Fund (Rumunjska), te krškim jezerima u središnjoj Španjolskoj (Casamayor i sur., 2012.; Andrei i sur., 2015.). U tim jezerima otkrivena je velika prokariotska raznolikost i veliki broj OTU (engl. *Operational Taxonomic Unit*, konsenzusna definicija vrste kada su dostupne samo DNA sekvence) koje nisu slične do sada identificiranim vrstama, što pokazuje da su ovi okoliši potencijalni izvori novih mikroorganizama. Zanimljivo je da su te populacije, karakteristične za svako pojedino jezero, pokazale sličnost u procesima razgradnje ugljika i redukcije sulfata. Stoga, cikluse kruženja hranjivih tvari, koji su u meromiktičkim jezerima usko povezani, provode različiti mikroorganizmi, ali s istom biogeokemijskom ulogom (Casamayor i sur., 2012.; Andrei i sur., 2015.). Velika bakterijska raznolikost također je zabilježena i u monimolimnionu jezera Ace i jezera Mahoney (SAD), a kao mogući uzroci navode se brojne biogeokemijske niše, visoke koncentracije nutrijenata, nedostatak miješanja, različiti metabolički putevi i kompleksni procesi razgradnje organske tvari u anoksičnom sloju za koje su potrebne raznolike bakterijske zajednice (Yurkova i sur., 2002.; Biderre-Petit i sur., 2011.; Lauro i sur., 2011.; Klepac-Ceraj i sur., 2012.; Tiodjio i sur., 2014.).

Razvojem molekularnih metoda, pokazalo se da čak i karakteristični mikroorganizmi kao što su PSB i GSB taksonomski variraju među pojedinim meromiktičkim jezerima. Baatar i sur., (2016.) identificirali su dominantne vrste PSB u trima azijskim meromiktičkim jezerima i otkrili da *Halochromatium roseum* dominira u jezeru Oigon, *Thiocapsa rosea* u jezeru Shunet, dok su PSB u jezeru Shira identificirane kao nova vrsta. Iako su ova jezera međusobno udaljena svega 8 km, dominantne vrste PSB se jasno razlikuju. Slično, dominantne PSB vrste razlikuju se i između jezera Ciso i Vilar (Španjolska) koji su udaljeni 1 km (Casamayor i sur., 2000.). Ovi nalazi ukazuju na to da specifični fizički, kemijski i ekološki uvjeti pogoduju razvoju raznolikih i specifičnih bakterijskih zajednica čak i u jezerima koja su geografski blizu. Raznolikost u sastavu zajednica fototrofnih sumpornih bakterija također je vidljiva i unutar istog jezera, kao što je slučaj u kemoklini jezera Cadagno (Španjolska) gdje dominira sedam vrsta PSB i dvije vrste GSB (Bosshard i sur., 2000.; Tonolla i sur., 2003.; Peduzzi i sur., 2012.). Opsežne metode sekvenciranja pokazale su da brojna meromiktička jezera u monimolimnionu sadrže mnogo neklasificiranih prokariota. Tako se primjerice pirosekvenciranjem pokazalo da u anoksičnom sloju jezera Shunet (Rusija) gotovo četvrtina bakterija ne može biti identificirana (Baatar i sur., 2016.). Bioraznolikost arheja u vodenom stupcu jezera Ocnei (Rumunjska) raste s dubinom, a sekvenciranje 16S rRNA gena ukazalo je na 30% OTU koje nisu mogle biti klasificirane na nivou roda, ukazujući na postojanje novih arhejskih svojti (Baricz i sur., 2014.).

Istom metodom u jezeru Sakinaw (Kanada) se pokazalo da je broj metanogenih arheja značajno veći u anoksičnom nego u oksičnom sloju, te da veliki dio OTU nema kultiviranih srodnika (Gies i sur., 2014.). Metanogene arheje su također brojne i u mnogim drugim meromiktičkim jezerima kao što su jezero Matano (Indonezija), jezero Kivu (Kongo) i jezero Pavin (Francuska) (Lehours i sur., 2005.; Biderre-Petit i sur., 2011.; Crowe i sur., 2011.; Lliros i sur., 2015.). S obzirom na velik broj studija koje su pokazale postojanje neklasificiranih mikroorganizama, Geis i sur., (2014.) su uveli pojam *mikrobna tamna tvar* (engl. *microbial dark matter*) kako bi opisali skrivenu raznolikost mikrobnih zajednica u meromiktičkim jezerima, posebno u anoksičnom sloju.

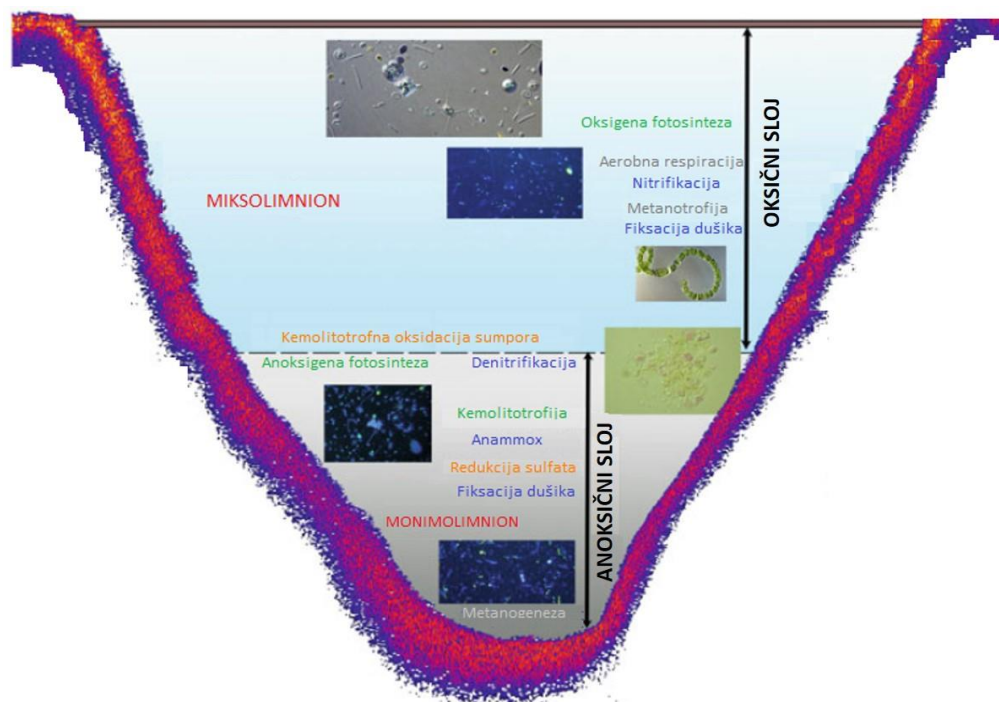
Anoksični uvjeti i dovoljno SO_4^{2-} , koji u morskim sredinama nije limitirajući faktor, čine pogodan okoliš za razvoj i aktivnost sulfat-reducirajućih prokariota (SRP). Zbog njihove sposobnost korištenja sulfata kao terminalnog elektron akceptora pri respiraciji, putem koje razgrađuju organsku tvar, smatraju se jedinstvenom fiziološkom skupinom (Barton i Hamilton, 2007.). Kao produkt ovog metaboličkog puta, koji je zaslužan za do 50% ukupne razgradnje organske tvari u morskim sedimentima, nastaje sumporovodik (H_2S) (Jorgensen, 1990.; Muyzer i Stams, 2008.). Smatra se da se ovaj proces odvijao prije 3,45 milijardi godina, odnosno dok su uvjeti u atmosferi bili reduktivni (Shen i Buick, 2004.). Pri redukciji sulfata u sulfide SRP kao elektron donore koriste različite organske spojeve ili vodik. U većini slučajeva elektron donor i izvor ugljika su isti spojevi (Tang i sur., 2009.). Sve do ranih 1980-ih godina, smatralo se da SRP igraju tek manju ulogu u ciklusu kruženja ugljika u okolišu. Vrste rodova *Desulfovibrio* i *Desulfomaculum*, koje su bile poznate u to vrijeme, koristile su vodik (litotrofni organizmi) i organske spojeve (organotrofni organizmi) kao što su etanol, formijati, laktati, piruvati, malati i sukcinati za rast, uz njihovu djelomičnu oksidaciju do acetata (Pfennig i sur., 1981.; Nazina i sur., 1988.; Ollivier i sur., 1988.; Henstra i sur., 2007.). Danas je jasno da ovi organizmi imaju mnogo značajniju ulogu u ciklusu ugljika, jer su izolirane i okarakterizirane mnoge vrste SRP koji su sposobno rasti i na kratkolančanim i dugolančanim masnim kiselinama i aromatskim spojevima kao što su benzoat i fenol (Zehnder, 1988.). Općenito, polimerni organski spojevi kao što su škrob, celuloza, proteini, nukleinske kiseline i lipidi nisu supstrati koje ove bakterije mogu koristiti za rast. Stoga su, u prirodnim sredinama, SRP ovisni o drugim mikroorganizmima koji razgrađuju ove polimere do jednostavnijih spojeva koji su pogodniji za njihov rast (Muyzer i Stams, 2008.). SRP stoga, uz bakterije koje provode fermentaciju, te metanogene bakterije, predstavljaju samo dio anaerobne zajednice mikroorganizama koji zajedničkim djelovanjem razgrađuju organsku tvar (Maier i sur., 2009.). Osim u ekološkom i evolucijskom smislu, SRP su značajni i u biotehnoškim procesima jer uzrokuju mikrobiološki

induciranu koroziju čelika i željeza što rezultira velikim financijskih gubicima, koji se u SAD-u procjenjuju na oko 100 milijuna \$ godišnje (Barton i Hamilton, 2007.). S druge se pak strane, mogu uspješno koristiti za precipitaciju (uklanjanje) metala pri tretiranju otpadnih voda (Tang i sur., 2009.).

SRP trenutno dijelimo u dvije osnovne skupine: one koji razgrađuju organske spojeve nepotpuno do acetata i one koje organske spojeve razgrađuju u potpunosti do CO₂ (Muyzer i Stams, 2008.). Oni ne čine metabolički i filogenetski koherentnu skupinu već su raspoređeni unutar obje domene prokariota (*Archaeoglobales*, *Firmicutes*, *δ-Proteobacteria*, *Thermodesulfobacteriaceae*, *Nitrospiraceae*). Opisano je 60 rodova s 220 vrsta od kojih većina pripada razredu *Deltaproteobacteria* (Barton i Fauque, 2009.).

2.3. Biogeokemijski procesi u meromiktičkim jezerima

Većina bioloških procesa koje doprinose stratifikaciji vodenog stupca u meromiktičkim jezerima uključuje mikrobiološku razgradnju tonućih čestica organske tvari i stvaranje topivih spojeva što dovodi do povećanja gustoće vode u monimolimnionu (Boehrer i Schultze, 2008.). Respiratorne aktivnosti mikroorganizama u meromiktičkim jezerima, povezuju cikluse nekoliko elemenata, budući da se različiti elektron akceptori mogu koristiti pri razgradnji organske tvari. Aerobna respiracija je energetski povoljniji proces, koji se javlja u prisustvu kisika. Kao i u drugim jezerima, oksigena fotosinteza u oksičnom sloju, glavni je proces fiksacije ugljika u meromiktičkim jezerima, ali su zbog njihovih značajki i procesi anoksigene fotosinteze i kemolitoautotrofije jednako važni. Kemolitoautotrofija se može odvijati u aerobnim (nitrifikacija), mikroaerofilnim i anoksičnim uvjetima. Pri nedostatku kisika, drugi oksidirani spojevi mogu se koristiti kao elektron akceptori pri razgradnji organske tvari. Glavni anaerobni procesi su (1) denitrifikacija, pri kojoj se kao elektron akceptor koristi nitrat, (2) redukcija sulfata i proizvodnja H₂S, te (3) metanogeneza, u kojoj CO₂ služi kao elektron akceptor pri čemu nastaje metan (Slika 1). S obzirom da ovi respiratorni procesi ovise o dostupnosti potencijalnih elektron akceptora i energetskom prinosu, relativna važnost pojedinog procesa varira s dubinom. Sukladno tome, aerobni procesi progresivno opadaju od površinskih, dobro oksigeniranih slojeva, prema dnu. U kemoklini stoga obično prevladava proces nitrifikacije, dok su u dubljim, anoksičnim slojevima, redukcija sulfata i metanogeneza dominantni respiratorni procesi (Schultze i sur., 2017.).



Slika 1. Glavni biogeokemijski procesi u različitim slojevima meromiktičkog jezera. Procesu vezani za fiksaciju anorganskog ugljika označeni su zelenom bojom. Respiratorni procesi i procesi potrošnje CO₂ označeni su sivom. Glavni procesi vezani za ciklus sumpora označeni su žutom, a za ciklus dušika plavom bojom (prilagođeno iz Zadereev i sur., 2017.).

U kemoklini, gdje reducirani spojevi (npr. H₂S, Fe²⁺) koegzistiraju s kisikom, sumporoksidirajuće bakterije, primjerice razred *Epsilonproteobacteria*, mogu postići visok stupanj fiksacije ugljika (Noguerola i sur., 2015.a). Isto vrijedi i za Fe²⁺ i kisik, koji uz dovoljan intenzitet svjetla u kemoklini, omogućuju fotoferotrofiju i kemolitoautotrofiju u jezerima bogatima željezom (Lliros i sur., 2015.).

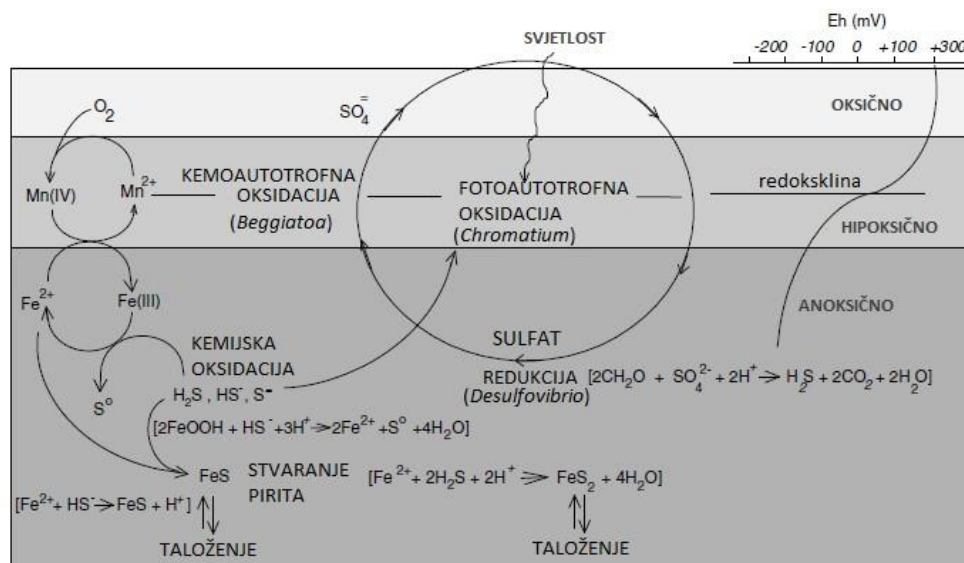
Guste populacije anoksičnih fototrofa koji se nalaze na ili neposredno ispod kemokline tipična su karakteristika meromiktičkih jezera i slojevi gdje se odvija proces anoksigene fotosinteze. Međutim, oni se ne pojavljuju u svim meromiktičkim jezerima, a zabilježeni su također i u nekim holomiktičkim jezerima u kojima se obično razvijaju u ili ispod termokline (Selig i sur., 2004.). Fototrofne sumporne bakterije umjesto kisika koriste sumpor iz sulfida kao elektron donore pri redukciji CO₂. U prvom koraku, sumpor se oksidira u elementarni oblik, kojeg bakterije mogu skladištiti intracelularno te ga, u slučaju nedostatka sulfida, mogu koristiti prilikom oksidacije u sulfate (Bosshard i sur., 2000.). Nadalje, u anoksičnim slojevima, anaerobna oksidacija amonijaka (*anammox*, engl. *Anaerobic Ammonium Oxidation*), koju provode obligatni anaerobni kemolitoautotrofi, također doprinosi fiksaciji ugljika. Općenito, svi ovi procesi fiksacije, povezuju ciklus ugljika s ciklusom sumpora (kemolitoautotrofne

sumpor-oksidirajuće bakterije i anoksigene fototrofne bakterije), dušika (nitrificirajuće i anammox bakterije) i željeza (fotoferotrofne i kemolitoautotrofne bakterije) (Zadereev i sur., 2017.). U anoksičnim okolišima organska tvar se razgrađuje do CH_4 i CO_2 djelovanjem barem triju metaboličkih skupina. Fermantativne bakterije razgrađuju kompleksne organske molekule do H_2 , formijata, CO_2 , acetata i hlapljivih masnih kiselina. Nastale masne kiseline se, potom, djelovanjem acetogenih bakterija, razgrađuju do acetata, H_2 i formijata koji služe kao supstrati za metanogenezu (Ferry i Lessner, 2008.). Metanogeneza je krajnji korak u mineralizaciji organske tvari, kojeg u anaerobnim morskim ekosustavima provode metanogene arheje (Delong, 1992.).

Biogeokemiski ciklus dušika sastoji se od različitih reakcija transformacije oksidacijsko-redukcijskog karaktera duška. To su procesi fiksacije, nitrifikacije, denitrifikacije i anaerobne oksidacije amonijaka (anammox). U vodenim okolišima, fiksaciju dušika provode aerobni i anaerobni mikroorganizmi. U anaerobnim uvjetima proces fiksacije dušika obično se povezuje s nekim klostridijama, rodom *Desulfovibrio*, grimiznim sumpornim bakterijama, grimiznim nesumpornim bakterijama i zelenim sumpornim bakterijama (Gruber, 2008.). U procesu nitrifikacije, kemoautotrofne bakterije pri sintezi organske tvari oksidiraju amonijak. Neke od njih, kao što je *Nitrosomonas*, kao nusprodukt ovog procesa, proizvode nitrite (NO_2^-), dok primjerice *Nitrobacter* proizvodi nitrat (NO_3^-) (Okafor, 2011). Denitrifikacijom se NO_3^- pretvara u plinovite spojeve (NO , N_2O i N_2). Ova smjesa plinova nastaje zbog postupnog korištenja NO_2^- , NO_3^- , NO i N_2O kao elektron akceptora pri anaerobnoj respiraciji (Capone i sur., 2008.). Najčešće denitrificirajuće bakterije su *Pseudomonas*, *Alkaligenes*, *Bacillus*, i *Paracoccus denitrificans*, a opisana je i autotrofna vrsta *Thiobacillus denitrificans* (Okafor, 2011.). Važan proces u ciklusu dušika je i direktna pretvorba NH_4^+ putem NO_2^- ili NO_3^- u N_2 u procesu anaerobne oksidacije amonijaka. Ovaj proces otkriven je tek ranih 1990-ih godina, a na temelju 16S rRNA gena utvrđeno je da ga provode neki članovi reda *Planctomycetales* (Kuenen 2008.). Ovaj proces je vrlo važan u zonama s minimumom kisika (OMZ, engl. *Oxygen Minimum Zones*) i u eutrofnim obalnim područjima (Lam i Kuypers, 2011.b).

Ciklus sumpora je kompleksan jer sumpor ima širok raspon oksidacijskih stanja od -2 (potpuno reduciran) do +6 (potpuno oksidiran), a koji može biti transformiran kemijskim i biološkim putem (Muyzer i Stams, 2008.) (Slika 2). Energetski stabilniji i najčešći izvor sumpora za organizme je sulfat, koji je u najvišem oksidacijskom stanju (+6), a njegovo stvaranje i redukcija jedan je od najvažnijih biogeokemijskih procesa koji regulira redoks stanje u oceanima (Widdel, 1988.). Svi organizmi imaju sposobnost provođenja asimilacijske redukcije sulfata, putem koje ugrađuju sumpor u stanice. Međutim, u biogeokemijskom smislu mnogo je

važnija disimilatorna redukcija sulfata, koja se događa isključivo u anaerobnim uvjetima, a provode je sulfat-reducirajuće bakterije (SRB). U ovom procesu, sulfat se koristi kao elektron akceptor za respiraciju, pri čemu nastaje H_2S (Llorens-Mares i sur., 2015.). Sumpor-oksidirajuće bakterije provode oksidaciju nastalih sulfida natrag u sulfate, pri čemu kao međuprodukti nastaju sumpor, tiosulfati i tetrationsi. Treba napomenuti da postoji i niz sumpor-oksidirajućih bakterija koje su sposobne provoditi samo određene reakcije pri oksidaciji sulfida u sulfate (npr. oksidacija tiosulfata u sulfate) (Kleinjan i sur., 2003.).



Slika 2. Glavne biogeokemijske reakcije ciklusa sumpora u moru i ilustrativni profil redoks potencijala (Eh) u oksidnim, hipoksidnim i anoksidnim uvjetima (prilagođeno iz Hargrave i sur., 2008.)

2.4. Molekularne metode u okolišnoj mikrobiologiji

Najveća bioraznolikost među svim organizmima koji žive na Zemlji nalazi se u „beskonačno malom“, tj. nevidljivom svijetu. Mikroorganizmi su, bez iznimke, kolonizirali sve ekosustave na našem planetu. Njihova sveprisutna raspodjela može se objasniti iznimnom prilagodljivošću i genetskom raznolikošću koja karakterizira mikrobnii svijet (Bouchez i sur., 2016.).

Mikroorganizmi su, kao i ostala živa bića, u stalnoj interakciji s okolišem. Vrlo su osjetljivi na promjene uvjeta u okolišu, što se očituje kroz promjene u njihovoj biomasi, raznolikosti i aktivnosti (Sharma i sur., 2010.; Pulleman i sur., 2012.). Razvoj novih molekularnih tehnika, temeljenih na ekstrakciji i karakterizaciji nukleinskih kiselina direktno iz okoliša (voda, tlo, sedimenti), revolucionarizirao je način na koji promatramo mikrobnii zajednice u okolišu i omogućio detaljne *in situ* analize njihove genetičke i funkcionalne raznolikosti. Naime, procjenjuje se da >99% prokariota prisutnih u okolišu nije moguće kultivirati standardnim metodama, stoga do sada uzgojeni mikroorganizmi u čistoj kulturi ne odražavaju funkcionalnu

i filogenetsku raznolikost u prirodnim staništima (Amann i sur., 1995.; Alain i Querellou, 2009.). Početkom ovog stoljeća, široka primjena sekvenciranja, dovela je do eksponencijalnog rasta broja sekvenci 16S rRNA gena u bazama podataka. Filogenetskim analizama 16S rRNA gena otkriveno je >60 novih koljena prokariota, te se očekuje da će taj broj i dalje rasti. S druge pak strane, oko 90% svih do sada uzgojenih bakterija, pripada u svega četiri koljena (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Bacteroidetes*), što uvelike ograničava razumijevanje njihove bioraznolikosti (Rinke i sur., 2013.). Ova diskrepancija u broju uzgojivih predstavnika poznata je kao „velika anomalija podloge“ (engl. *Great Plate Anomaly*) (Staley i Konopka, 1985.). Osim toga, do sada uzgojeni mikroorganizmi rijetko su abundantni ili funkcionalno značajni u okolišu iz kojeg su uzgojeni, te se smatraju „mikrobnim korovom“ i čine <1% svih mikrobnih vrsta (Hugenholtz, 2002.). Stoga su molekularne tehnike, koje zaobilaze potrebu za izolacijom i uzgojem, vrlo prikladne za dubinsku karakterizaciju mikrobnih zajednica u okolišu (Rastogi i Sani, 2011.).

Inicijalni korak u svim molekularnim metodama, osim onih baziranih na bojenju stanica i mikroskopiranju (FISH, CARD-FISH), je izolacija nukleinskih kiselina. U tu svrhu danas postoji niz komercijalno dostupnih setova za izolaciju i pročišćavanje DNA/RNA iz okoliša, koji međutim često ne funkcioniraju dobro na svim vrstama uzoraka, posebno onima koji su bogati organskom tvari. Uz setove razvijeni su i brojni laboratorijski protokoli u kojima se izolacija bazira na kemijskoj (deterdženti, lizozim...) i/ili mehaničkoj (vorteks, razarači stanica) liziji stanica (Massana i sur., 1997.; Hurt i sur., 2001.; Martin-Laurent i sur., 2001.; Luna i sur., 2006.). Općenito, uspješna izolacija uključuje četiri glavna koraka: (1) učinkovitu disrupciju stanica ili tkiva, (2) denaturaciju nukleoproteinskih kompleksa, (3) inaktivaciju nukleaza (npr. RNaze pri izolaciji RNA i DNaze pri izolaciji DNA) i (4) uklanjanje kontaminanata (Doyle, 1996.). Izolirana nukleinska kiselina ne smije sadržavati inhibitore, uključujući i proteine, ugljikohidrate, lipide, humičnu kiselinu i druge nukleinske kiseline (Buckingham, 2011). Također, tijekom postupka izolacije mora biti zadržana njihova cjelovitost, jer ona može direktno utjecati na predstojeće analize (Cseke i sur., 2011.). Izolacija RNA je delikatan postupak, budući da je to vrlo nestabilna molekula koja ima kratak poluživot kada se izolira iz stanice ili tkiva (Brooks, 1998.). RNA je osobito nestabilna zbog RNaze, enzima koji je prisutan u krvi, svim tkivima, kao i u većini bakterija i gljivica u okolišu (Brooks, 1998.; Buckingham, 2011.). Stoga, uspješna izolacija RNA uvelike ovisi o dobroj laboratorijskoj praksi i tehnici te korištenju inhibitora endogene RNaze (Doyle 1996.). Uputno je odmah nakon izolacije iz RNA procesom reverzne transkripcije sintetizirati cDNA, budući da je ona znatno stabilnija i omogućuje lakšu manipulaciju (Ohan i Heikkila, 1993.). Analize temeljene na DNA daju nam

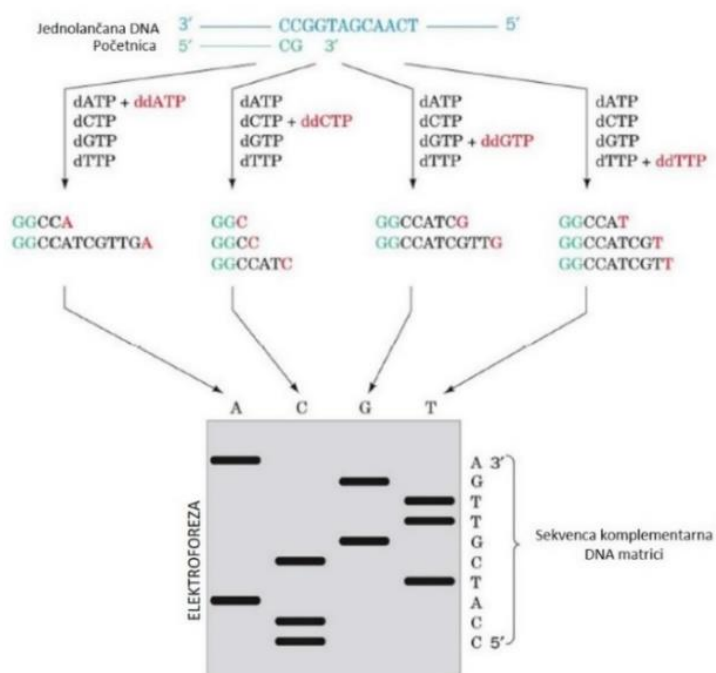
informacije o dormantnim mikrobnim zajednicama, odnosno o njihovom ukupnom genetičkom potencijalu, dok analize RNA daju informacije o aktivnoj frakciji unutar zajednice jer se rRNA i mRNA smatraju indikatorima funkcionalno aktivnih populacija (Torsvik i Ovreas 2002.). Količina rRNA u stanici korelira s brzinom rasta bakterija, a mRNA funkcionalnih gena omogućuje detekciju i identifikaciju bakterija kod kojih dolazi do eksprimiranja ključnih enzimatskih aktivnosti pod određenim uvjetima (Wellington i sur., 2003.).

Analize DNA/RNA uključuju metode bazirane na lančanoj reakciji polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) u kojoj se izolirane nukleinske kiseline koriste kao matrica pri umnožavanju ciljnih gena. Produkti reakcije odražavaju mješavinu gena iz svih organizama prisutnih u uzorku. Najčešće korišteni gen za identifikaciju prokariota u mikrobnjoj ekologiji je gen koji kodira 16S rRNA jer je on (1) prisutan u svim prokariotima, (2) strukturalno i funkcionalno konzerviran, (3) sadrži varijabilne i konzervirane regije (Hugenholtz 2002.). Nadalje, njegova veličina (~ 1500 pb) i veliki broj sekvenci dostupnih u bazama podataka, omogućuju dobru usporedbu među različitim skupinama prokariota, što ga čini „zlatnim standardom“ u mikrobnjoj ekologiji (Fuhrman i Hagström 2008.; Rastogi i Sani 2011.).

Najčešće korištena metoda za analizu PCR produkata, odnosno ciljnih gena je kloniranje i izrada klonskih knjižnica. Pojedini klonovi se potom sekvenciraju metodom po Sangeru, te se sekvence individualnih fragmenata uspoređuju s bazama podataka kao što su GenBank, Ribosomal Database Project (RDP) i Greengenes. Analizirane sekvence se klasificiraju u taksonomske skupine na temelju njihove sličnosti. Kao granična vrijednost za koljeno obično se uzima sličnost od 80%, za razred 85%, za red 90%, za porodicu 92%, podporodicu 94% i vrstu 97% (DeSantis i sur., 2007.). Neke studije su pokazale da je za okolišne uzorke poput tla potrebno više od 40000 klonova da bi se otkrilo 50% ukupne bioraznolikosti (Dunbar i sur., 2002.). Međutim, tipične klonske knjižnice 16S rRNA gena sadrže manje od 1000 sekvenci i stoga otkrivaju samo mali dio mikrobne raznolikosti u uzorku. Iako je konstrukcija klonskih knjižnica zahtjevan, dugotrajan i skup laboratorijski posao, ova metoda je i dalje u širokoj primjeni pri istraživanju mikrobne raznolikosti (Rastogi i Sani 2011.).

Metodu za određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje) u molekuli DNA razvio je sredinom sedamdesetih Frederick Sanger sa suradnicima u Cambridgeu. Metoda se zasniva na zaustavljanju enzimske sinteze lanca DNA ugradnjom dideoksiribonukleozid-trifosfata pa se ova metoda još naziva i enzimatskom dideoksi-metodom. Sinteza DNA ide u 5' → 3' smjeru, a preduvjet za sintezu je početnica koja pronalazi sebi homologan slijed i čijim produžavanjem nastaje novi DNA lanac (Sanger i sur., 1977.). DNA polimeraze, enzimi koji sintetiziraju DNA, mogu u rastući lanac ugraditi i analoge dNTP-ova, dideoksiribonukleozid-trifosfate (ddNTP)

koji nemaju hidroksilnu skupinu na 3' položaju deoksiriboze, pa nakon njihove ugradnje dolazi do zaustavljanja daljnje sinteze DNA, zbog nemogućnosti uspostavljanja nove fosfodiesterske veze. Za enzimatsku sintezu DNA isprva se koristio Klenowljev fragment DNA polimeraze I iz bakterije *E. coli*, koji nema 5' → 3' egzonukleaznu aktivnost. Enzim nove generacije koji se danas koristi je modificirana DNA polimeraza iz virusa T7 (sekvenaza) (Tabor i Richardson 1989.). Kao kalup služi jednolančana DNA dobivena denaturacijom dvolančane plazmidne DNA ili denaturacijom dvolančane DNA koja je produkt PCR reakcije. Enzimatska sinteza ide u četiri odvojene reakcije (Slika 3). U svakoj reakcijskoj smjesi nalaze se sva četiri dNTP-a, te samo jedan ddNTP. Omjer dNTP-a i ddNTP-a podešen je tako da se ddNTP ugrađuje u DNA s manjom učestalošću. Tako će se u smjesi u kojoj je npr. korišten ddATP (i sva četiri dNTP-a) reakcija sinteze zaustaviti svaki put kad se ugradi ddATP, a to je onda kad je u lancu kalup timin. Kako ova reakcijska smjesa sadrži dATP i ddATP, to će se u novonastaloj DNA ponekad ugraditi jedan, a ponekad drugi nukleotid. Zahvaljujući tome nastat će molekule različitih dužina, i to tako da postoje molekule čija je sinteza zaustavljena kod svakog timina u originalnoj molekuli DNA. Ekeltroforezom se potom utvrdi na kojim je mjestima koji nukleotid. U novije vrijeme koristi se neradioaktivno, odnosno florescentno obilježavanje jednog od četiri dNTP-a, a ovisno o protokolu, mogu se obilježiti i početnica ili ddNTP. Detekcija se provodi sustavom koji koristi laserski čitač, a signali se automatski skupljaju i obrađuju pomoću računala (Ristov i Brozović 2007.).

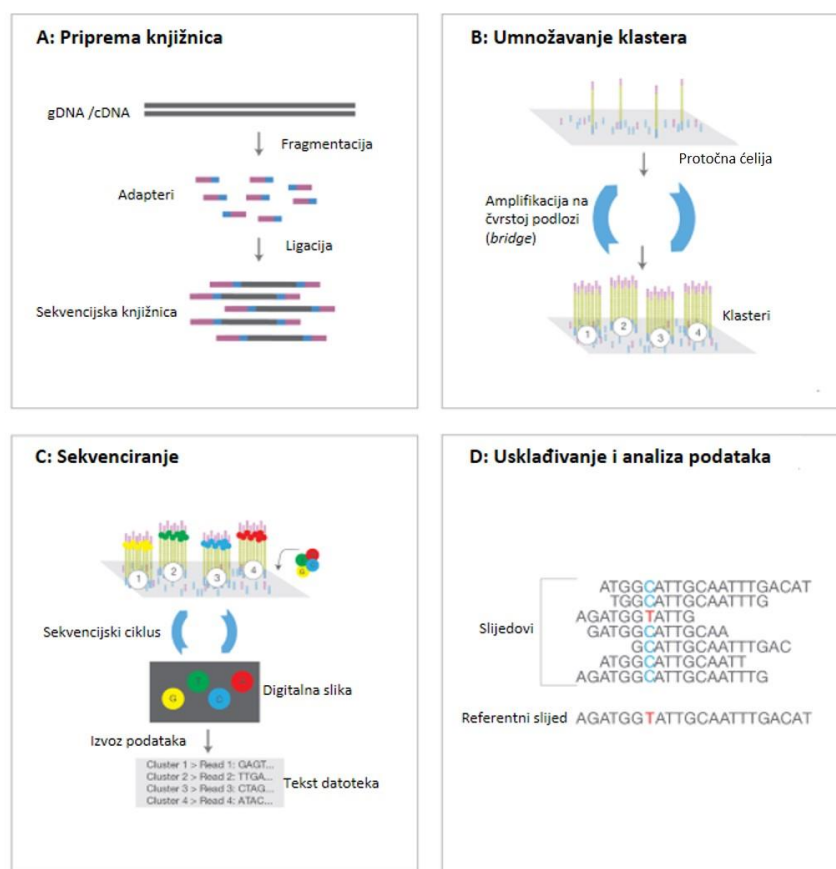


Slika 3. Shematski prikaz Sangerove (dideoksi) metode sekvenciranja metodom lančane reakcije polimerazom (prilagođeno sa <http://www.siumed.edu>).

Okolišni uzorci sadrže mješavinu DNA iz nekoliko stotina tisuća individualnih mikroorganizama, stoga je, s obzirom da se Sangerovom metodom klonovi sekvenciraju pojedinačno, teško identificirati sve organizme u uzorku (Metzker 2010.; Hajibabaei i sur., 2011.). Sekvenciranje metodom po Sangeru stoga se sve više zamjenjuje sekvenciranjem nove generacije (NGS, engl. *Next Generation Sequencing*), koje omogućuje dobivanje nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća nukleotidnih sljedova i istovremeno sekvenciranje nekoliko desetaka uzoraka, uz manje troškove i s istom greškom sekvenciranja kao i kod metode po Sangeru (Glenn 2011.). Iako NGS metode koriste različitu „kemiju“ i načine na koje se baze ugrađuju i detektiraju, sve metode imaju dva zajednička koraka, a to su: (1) priprema (fragmentacija) knjižnica i (2) detekcija ugrađenih nukleotida (Glenn 2011.; Zhang i sur., 2011.). Trenutno dostupne NGS metode možemo podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine metode bazirane na PCR reakciji, a uključuju četiri komercijalne platforme: Roche 454 Genome Sequencer (Roche Diagnostics Corp., Branford, CT, SAD), Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, SAD), AB SOLiD™ System (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, SAD) i Ion Personal Genome Machine (Life Technologies, South San Francisco, CA, SAD). Drugu skupinu čine „*single-molecule*“ sekvenciranje, koje ne uključuje PCR reakciju, a trenutno su dostupna dva takva sustava: HeliScope (Helicos Bio-Sciences Corp., Cambridge, MA, SAD) i PacBio RS SMRT sustav (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, SAD) (Shokralla i sur., 2012.). U mikrobnjoj ekologiji različitih okoliša, uključujući i morske, uz 454 pirosekvenciranje (Roche, Švicarska), najčešće se koristi Illumina sekvenciranje visoke propusnosti (Sogin i sur., 2006.; Kožich i sur., 2013.; Li i sur., 2017.). Illumina platforma koristi pristup sekvenciranja sintezom i umnožavanje DNA fragmenta na protočnoj ćeliji (Shokralla i sur., 2012.). Ova metoda uključuje četiri osnovna koraka: (1) priprema knjižnica (Slika 4A) – sastoji se od fragmentacije DNA ili cDNA u uzorku i ligaciji adaptera na 5' i 3' kraju svakog fragmenta, koji se potom umnožavaju PCR reakcijom i pročišćavaju; (2) umnožavanje klastera (Slika 4B) – započinje punjenjem pripremljene knjižnice na protočnu ćeliju u kojoj se nalaze oligonukleotidne početnice komplementarne adapterima na krajevima DNA odsječaka. Aktivnim zagrijavanjem i hlađenjem dolazi do hibridizacije adaptera na početnice pri čemu odsječci, budući da su adapteri na oba njihova kraja, formiraju „most“ (engl. *bridge*). Ti odsječci se potom umnožavaju u tzv. *bridge* PCR reakciji, pri čemu nastaju milijuni klonalnih klastera od koji svaki sadrži ~ 1000 kopija početne molekule DNA (Muzzey i sur., 2015.). (3) sekvenciranje (Slika 4C) – u kojem se svakom klasteru dodaje polimeraza i četiri različito fluorescentno obilježena nukleotida s kemijski inaktiviranom 3'-OH skupinom. Ova modifikacija omogućava ugradnju samo jedne baze po svakom ciklusu čime se znatno smanjuje greška u usporedbi s drugim tehnologijama

(Bentley i sur., 2008.; Ross i sur., 2013.). Uređaj bilježi slijed ugradnje svake baze po pojedinom ciklusu. (4) Obrada podataka (Slika 4D) – tijekom koje se sekvence svakog klastera provjeravaju i eliminiraju one loše kvalitete (Shendure i Ji 2008.). S obzirom na veliku količinu generiranih nukleotidnih sljedova, pri obradi podataka koriste se tzv. *pipeline* računalni programi. Najpoznatiji su mothur, QIIME, i SILVAngs, koji pri taksonomskoj klasifikaciji koriste različite baze podataka (Schloss i sur., 2009.; Caporaso i sur., 2010.; Quast i sur., 2013.). Nedavno predstavljena Illumina MiSeq platforma, može proizvesti sekvence do 150 pb s ukupnom propusnošću od 1,5 – 2 Gb (Shokralla i sur., 2012.).

S obzirom da sekvenciranjem nove generacije, za razliku od sekvenciranja po Sangeru, nije moguće dobiti cijeli nukleotidni slijed 16S rRNA gena, pri taksonomskoj klasifikaciji koriste se njegove hipervarijabilne regije. Bakterijski 16S rRNA gen sadrži devet hipervarijabilnih regija (V1-V9), od kojih se najčešće koriste V3, V4 i V6 regije (Huber i sur., 2007.; Caporaso i sur., 2011.; Finkel i sur., 2011.; Mizrahi-Man i sur., 2013.). Regija V4 pokazala se najboljom za filogenetske studije, posebno na taksonomskom nivou koljena, te je pogodna za istraživanje ekstremnih okoliša i detekciju novih bakterijskih svojti (Yang i sur., 2016.).



Slika 4. Pregled koraka sekvenciranja nove generacije (Illumina NGS): A-priprema knjižnica; B-umnožavanje klastera; C-sekvenciranje; D-usklađivanje i analiza podataka (prilagođeno sa www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html).

Osim za identifikaciju, 16S rRNA gen se pokazao kao pogodan genski marker i za kvantifikaciju pojedinih bakterijskih vrsta kao i ukupnih bakterijskih zajednica (Corless i sur., 2000.; Guiver i sur., 2000.). Lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (*RT-PCR*, engl. *real-time PCR*) ili kvantitativnim PCR-om (*qPCR*, engl. *quantitative PCR*), korištenjem taksonomskih i funkcionalnih genskih markera, moguće je uz visoku osjetljivost odrediti brojnost ili ekspresiju gena, odnosno pojedinih ili ukupnih mikroorganizama prisutnih u uzorku u rasponu od 10 do preko 10^8 stanica (Heid i sur., 1996.; Smith i Osborn 2009.). Metoda qPCR zasniva se na fluorescentnom obilježavanju produkata reakcije. Kvantitativni PCR u osnovi je isti kao i klasična PCR reakcija u kojoj se matrica DNA denaturira, nakon čega dolazi do sparivanja oligonukleotidnih početnica sa komplementarnom sekvencom na lancu DNA te njegovom produljivanju pomoću termostabilne DNA polimeraze, što rezultira eksponencijalnim povećanjem broja amplikona tijekom svakog ciklusa reakcije. U qPCR reakciji ovo povećanje broja amplikona bilježi se u stvarnom vremenu putem fluorescencijskih boja koje se vežu za novonastalu dvolančanu DNA, pri čemu se emitira fluorescencija koja je razmjerna količini nastalog PCR produkta (Smith i Osborn 2009.). Najčešće se koriste SYBR green I fluorescencijska boja i TaqMan[®] fluorescencijski oligonukleotidi (Holland i sur., 1992.; Livak i sur., 1995.; Wittwer i sur., 2013.). SYBR green I boja se vezuje na dvolančanu DNA interkalacijom među susjednim nukleotidnim bazama pri čemu se emitira svjetlost. S obzirom da se SYBR green I veže za dvolančanu DNA, nužno je u reakciji koristiti visokospecifične parove početnica kako bi se izbjeglo stvaranje nespecifičnih produkata, što može dovesti do precjenjivanja ciljanog gena. Također, treba izbjegavati početnice koje su međusobno komplementarne kako bi se spriječilo međusobno sparivanje početnica (tzv. *primer-dimer*). Specifičnost nastalog produkta provjerava se pomoću krivulje taljenja (engl. *melting curve*) koja mjeri fluorescenciju u odnosu na temperaturu pri disocijacijskoj fazi, odnosno u trenutku u kojem se dva lanca DNA odvoje i fluorescencija prestaje. Svi produkti za specifičan par početnica moraju imati istu krivulju taljenja (Giglio i sur., 2003.). Prisutnost ciljnog gena, kao i nespecifičnih produkata i *primer-dimera* može se utvrditi pri temperaturi na kojoj se 50% novonastale dvolančane DNA denaturiralo (engl. *melting temperature*) (Smith i Osborn 2009.). Metoda u kojoj se koriste TaqMan[®] fluorescencijski oligonukleotidi zasniva se na korištenju fluorescentno obilježenih sonde uz neobilježene specifične početnice. Sonda je fluorescentno obilježena na 5' kraju (fluorofora) i sadrži prigušivač (engl. *quencher*) na 3' kraju, te je komplementarna dijelu nukleotidnog slijeda unutar ciljane sekvence na kojeg hibridizira (Livak i sur., 1995.). Tijekom sparivanja početnica u svakom PCR ciklusu početnice i sonde vežu se

za ciljanu sekvencu. Tijekom faze produljivanja lanca DNA 5' egzonukleaza iz *Taq* polimeraze cijepa vezu između fluorofore i prigušivača pri čemu dolazi do fluorescencije. Umnožavanje matrice se, dakle, mjeri putem otpuštanja i akumulacije fluorofora u fazi produljenja lanca tijekom svakog PCR ciklusa. Dodatna specifičnost koju pruža prisustvo TaqMan[®] sonde osigurava stvaranje fluorescentnog signala samo prilikom umnožavanja ciljane sekvence (Smith i sur., 2006.). Ova metoda je, međutim, skuplja od SYBR green metode te zahtjeva dodatnu konzerviranu regiju unutar ciljane sekvence, stoga njeno korištenje pri detekciji kratkih nukleotidnih sljedova (<100 pb) nije uvijek moguće (Smith i Osborn 2009.).

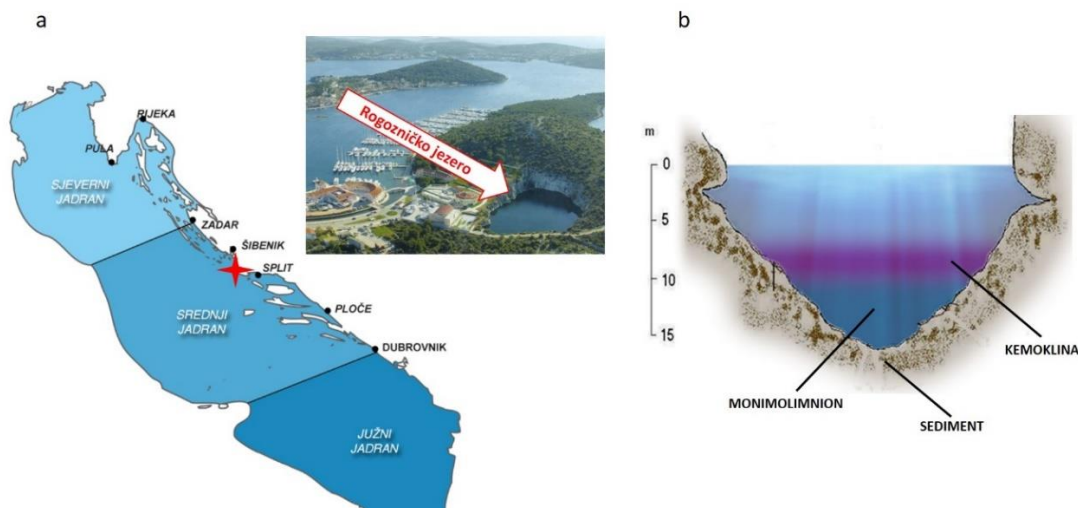
Ciljni gen kvantificira se pomoću C_t vrijednosti (C_t , engl. *threshold cycle*), odnosno broja ciklusa u kojem fluorescencija prijeđe graničnu vrijednost (iznad nespecifičnog signala), te se može koristiti za relativnu i apsolutnu kvantifikaciju (Pfaffl 2012.). Pri apsolutnoj kvantifikaciji, broj ciljnih gena ili transkripata određuje se na osnovi standardne krivulje koja predstavlja seriju razrjeđenja plazmida u kojega je prethodno ukloniran ciljni gen. Za apsolutnu kvantifikaciju potrebno je imati plazmidnu DNA poznatog sastava baza da bi mogli izračunati molekulsku masu. Standardna krivulja dobije se mjerenjem ciklusa u kojem je uzorak prešao prag (vrijednost C_t) s obzirom na logaritamsku vrijednost koncentracije uzorka. Nagib standardne krivulje govori o djelotvornosti (E) same qPCR reakcije (100% djelotvornost odgovara nagibu od -3,32), a koeficijent R^2 (korelacijski koeficijent za standardnu krivulju) govori o linearnosti standardne krivulje (idealno iznosi što bliže 1). Usporedbom dobivenog amplikona u uzorku i poznatih standarda utvrđuje se u kojem je broju kopija prisutan traženi gen zastupljen u uzorku (Ristov i Brozović 2007.). S obzirom da apsolutna kvantifikacija ovisi o standardnoj krivulji, brojni čimbenici, kao što su inicijalna kvantifikacija standarda, serijsko razrjeđenje i algoritamsko određivanje C_t vrijednosti utječu na konačnu kvantifikaciju gena u okolišnim uzorcima (Love i sur., 2006.). Stoga se preporuča da se za svaku qPCR reakciju prikažu efikasnost (E), korelacijski koeficijent (R^2), te nagib pravca (y) koji opisuje standardnu krivulju i ukazuje na osjetljivost reakcije (Smith i sur., 2006.). Ova metoda kvantifikacije se pokazala vrlo uspješnom pri detekciji važnih bakterijskih skupina kao što su amonij-oksidirajuće, metan-oksidirajuće i sulfat-reducirajuće bakterije putem *amoA*, *pmoA* i *dsrA* funkcionalnih gena (Foti i sur., 2007.). Također, qPCR se pokazao pouzdanijom kvantitativnom metodom od analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA (engl. *Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis*, SSCP), gel elektroforeze s temperaturnim gradijentom i fluorescentne *in situ* hibridizacije (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*) (Fang i sur., 2002.; Nadkarni i sur., 2002.).

Međutim, sve metode bazirane na PCR reakciji podložne su stvaranju artefakata koji su rezultat grešaka u sekvenci (PCR greške) i/ili nejednolikog umnožavanja matrice (PCR pristranost) i učinkovitosti kloniranja. Do pojave artefakata sekvenci može doći zbog stvaranja himerskih i heterodupleksnih molekula, te grešaka u *Taq* DNA polimerazi (Cline i sur., 1996.; Qiu i sur., 2001.; Speksnijder i sur., 2001.). Do PCR pristranosti dolazi zbog razlika u efikasnosti umnožavanja matrice ili zbog inhibicije umnožavanja uzrokovane međusobnim sparivanjem najbrojnijih produkata reakcije nastalih u kasnim fazama umnožavanja (Suzuki i Giovannoni 1996.). Mnoge studije su pokazale da se pristranost može značajno smanjiti korištenjem visokih koncentracija DNA matrice, dobrim odabirom početnica, manjim brojem ciklusa, nižom temperaturom sparivanja početnica, te korištenjem replika (Polz i Cavanaugh 1998.; Lim i sur., 2010.). Do pojave artefakata može doći i prilikom umnožavanja klonskih knjižnica sekvenciranjem nove generacije tijekom emulzijskog ili *bridge* PCR-a. Iako se umnožavanje *bridge* PCR-om obavlja pomoću univerzalnih početnica i smatra se da stoga nema pristranosti, on može dodatno povećati artefakte nastale prilikom izrade klonskih knjižnica iz izvornog uzorka (Schuster 2008.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorkovanje

S ciljem uvida u prostorno-vremenske promjene prokariotskih zajednica, uzorci su prikupljeni tijekom različitih sezona iz kemokline, monimolimniona i sedimenta Rogozničkog jezera (Slika 5).



Slika 5. Lokacija i panoramski pogled (a) te vertikalni profil Rogozničkog jezera s označenim slojevima iz kojih su prikupljeni uzorci (b).

Za analizu sulfat-reducirajućih bakterija uzorci su prikupljeni u dvije kontrastne sezone, zimskoj i ljetnoj 2014. godine, a detaljna analiza ukupnih prokariotskih zajednica obavljena je na uzorcima prikupljenima u sve četiri sezone tijekom 2015. godine i na uzorcima holomiksije (Tablica 2). Sloj kemokline (dubine 8-9 m) i monimolimniona (dubine 12 m) uzorkovan je Niskinovim crpcem, volumena 5 l. Uzorci morske vode filtrirani su na MCE (engl. *Mixed Cellulose Ester*) membranskim filterima promjera pora 0,22 μm (Filters Fioroni, Francuska), pohranjeni u kriotube i smrznuti u tekućem dušiku, unutar nekoliko sati od uzorkovanja. Ovisno o sezoni i uzorkovanom sloju filtrirani volumen kretao se od 60 ml (uzorci monimolimniona u proljetnoj sezoni) do 150 ml (uzorci kemokline u zimskoj sezoni). Površinski sediment (0-10 cm) prikupljen je gravitacijskim jezgrilima. Za potrebe analiza sulfat-reducirajućih bakterija (SRB), sediment je nakon uzorkovanja izrezan na gornji (0-5 cm) i donji sloj (5-10 cm), dok je za analize ukupnih prokariotskih zajednica gornjih 10 cm sedimenta uzeto kao jedan uzorak. Prije daljnjih analiza sediment je također smrznut u tekućem dušiku te naknadno pohranjen na -80°C . Tijekom holomiksije uzorci su prikupljeni iz različitih dubina (0, 2, 5, 9, 11 i 13 m) vodenog stupca.

Tablica 2. Raspored i vrijeme uzorkovanja fizičko-kemijskih čimbenika temperature (T), saliniteta (S), pH, otopljenog kisika (O₂), oksidacijsko-redukcijskog potencijala (ORP), nitrita (NO₂⁻), nitrata (NO₃⁻), amonijaka (NH₄⁺) i otrofosfata (PO₄³⁻), sumporovodika (H₂S), partikulatnog (POC) i otopljenog (DOC) organskog ugljika te za molekularne analize sulfat-reducirajućih bakterija (SRB) i ukupnih prokariota (UP) tijekom različitih sezona u miksolimnionu, kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera.

			SONDA (T, S, pH, O ₂ , ORP)	NUTRIJENTI (NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻)	H ₂ S	POC/DOC	MOLEKULARNE ANALIZE
2014.	ZIMA (18. veljače)	MIKSOLIMNION	●	●	●	●	○
		KEMOKLINA	●	●	●	●	SRB
		MONIMOLIMNION	●	●	●	●	SRB
		SEDIMENT	○	○	○	○	SRB
	LJETO (19. kolovoza)	MIKSOLIMNION	●	●	●	●	○
		KEMOKLINA	●	●	●	●	SRB
		MONIMOLIMNION	●	●	●	●	SRB
		SEDIMENT	○	○	○	○	SRB
2015.	ZIMA (13. siječnja)	MIKSOLIMNION	●	●	●	●	○
		KEMOKLINA	●	●	●	●	UP
		MONIMOLIMNION	●	●	●	●	UP
		SEDIMENT	○	○	○	○	UP
	PROLJEĆE (8. travnja)	MIKSOLIMNION	●	●	●	●	○
		KEMOKLINA	●	●	●	●	UP
		MONIMOLIMNION	●	●	●	●	UP
		SEDIMENT	○	○	○	○	UP
	LJETO (15. srpnja)	MIKSOLIMNION	●	●	●	●	○
		KEMOKLINA	●	●	●	●	UP
		MONIMOLIMNION	●	●	●	●	UP
		SEDIMENT	○	○	○	○	UP
	JESEN (23. rujna)	MIKSOLIMNION	●	●	●	●	○
		KEMOKLINA	●	●	●	●	UP
		MONIMOLIMNION	●	●	●	●	UP
		SEDIMENT	○	○	○	○	UP
2016.	HOLOMIKSIJA (24. listopada)	VODENI STUPAC	●	●	●	●	UP
		SEDIMENT	○	○	○	○	○

„●“ – uzorkovano; „○“ – nije uzorkovano

3.2. Određivanje fizičko-kemijskih čimbenika

Fizičko-kemijski čimbenici temperatura (T), salinitet (S), otopljeni kisik (O₂), pH i oksidacijsko-redukcijski potencijal (ORP) mjereni su *in situ*, HQ40D sondom (Hach-Lange, Njemačka), duž vertikalnog profila jezera na svakih 0,5 m dubine.

Koncentracije reduciranih sumpornih specija (H₂S) određene su elektrokemijski, voltametrijom s linearnom promjenom potencijala (LSV, engl. *Linear Sweep Voltametry*) korištenjem automatske živine elektrode 663 VA Stand Multimode Electrode (Metrohm, Švicarska) povezane s μAUTOLAB type III potenciostat/galvanostat (Ecochemie, Nizozemska) i s IME 663 jedinicom (Ciglencečki i Ćosović 1997; Bura-Nakić i sur., 2009). Nitrati (NO₃⁻), nitriti (NO₂⁻), ortofosfati (PO₄³⁻) bez predobrade uzoraka, te amonijak (NH₄⁺), prethodno fiksiran otopinom fenola u etanolu (4 g/l), određeni su spektrofotometrijski prema Stricklandu i Parsons (1972.).

Uzorci za određivanje koncentracije partikulatnog organskog ugljika (POC, engl. *Particulate Organic Carbon*), prethodno su filtrirani kroz GF/F filtere (Whatman, UK), veličine pora 0,7 μm. Za određivanje otopljenog organskog ugljika (DOC, engl. *Dissolved Organic Carbon*) izuzeto je 20 ml filtrata koji je fiksiran sa 100 μl HgCl₂ (2 g/l). Koncentracije DOC-a i POC-a su određene metodom katalitičke oksidacije ugljika pri visokoj temperaturi (HTCO, engl. *High-Temperature Catalytic Oxidation*) (143) koristeći analizator ukupnog organskog ugljika (TOC, engl. *Total Organic Carbon*) TOC-VCPH-5000 (Shimadzu, Japan) koji je povezan s jedinicom za izgaranje krutih uzoraka SSM-5000A (Shimadzu, Japan) (Dautović i sur., 2012.). Uzorci za određivanje navedenih kemijskih čimbenika prikupljeni su s 0, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 i 13 m dubine jezera, kako je naznačeno na grafičkim prikazima rezultata.

3.3. Izolacija nukleinskih kiselina i reverzna transkripcija

Ukupna genomska DNA je iz uzoraka vodenog stupca izolirana je prema Massani i sur., (1997.). Ukratko, u tubice s filterima dodano je 1,5 ml saharoznog pufera (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0,75 M saharoza) i 20 μl lizozima (1 mg/l). Stanice su lizirane na 37°C tijekom 1 sata uz miješanje (800 rpm) na termobloku (Eppendorf, Njemačka). Nakon toga u tubice je dodano 37,5 μl proteinaze K (0,5 mg/ml) i 75 μl 1% natrij dodecil sulfata (SDS, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*) a smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji na 55°C tijekom 1 sata. Potom je iz tubica izvučen lizat u koji je dodan jednak volumen fenol:kloroform:izoamil alkohola 25:24:1 (v/v), zasićen s 10 mM Tris i 1mM EDTA (pH=8). Nakon miješanja i centrifugiranja (10

min./12000 g/4°C) iz tubica je izdvojen gornji sloj, te je ponovljen postupak dodavanja fenol:kloroform:izoamil alkohola 25:24:1 (v/v), miješanja i centrifugiranja. U izdvojeni gornji sloj je, potom, dodan kloroform:izoamil alkohol 24:1 (v/v). Sadržaj tubica je centrifugiran (10 min./12000 g/4°C), a u izdvojeni gornji sloj dodan je 3M natrijev acetat (1/10 V; pH=5). Tubice su ostavljene na ledu 10 min., potom centrifugirane (5 min./14000 g/4°C). U supernatant je dodan jednak volumen rashlađenog (-20°C) apsolutnog izopropanola. DNA je precipitirana tijekom noći na -20°C. Nakon centrifugiranja (45 min./20000 g/4°C), pažljivo je odliven supernatant, a talog DNA je dva puta ispran sa 70% etanolom (ohlađenim na -20°C) i centrifugiran (15 min./13000 g/4°C). Istaložena DNA je osušena na zraku pri sobnoj temperaturi i otopljena u puferu (10 mM Tris-HCl, pH=8,5).

Prije postupka izolacije genomske DNA sediment je ispran s tri različite otopine kako bi se uklonila ekstracelularna DNA te potencijalni inhibitori PCR reakcije (Fortin i sur., 2004.). U plastične epruvete (15 ml) je odvagano 3 g sedimenta i dodano 6 ml otopine I (50 mM Tris-HCl, pH=8,3; 200 mM Na₂EDTA, 0,05% Triton X-100). Smjesa je snažno promiješana na vibracijskoj miješalici tijekom 2 min., potom centrifugirana (2 min./6000 g). Supernatant je odliven, a postupak je ponovljen s otopinom II (50 mM Tris-HCl, pH=8,3; 200 mM NaCl; 5 mM Na₂EDTA) i otopinom III (10 mM Tris-HCl, pH=8,3; 0,1 mM Na₂EDTA). Nakon ispiranja, genomska DNA iz sedimenta je izolirana prema Aurora High Capacity protokolu (<http://www.borealgenomics.com>). Ukratko, 5 g sedimenta je pomiješano s 13,5 ml ekstrakcijskog pufera (1 M Tris-HCl, 0,5 M Na₂EDTA, 1 M natrijev fosfat, sve pH=8, 1.5 M NaCl i 1% CTAB) i 250 µl prozeinaze K (20 mg/l). Smjesa je inkubirana pri 65°C tijekom 2 sata te centrifugirana (10 min./6000 g). U izdvojeni supernatant je dodan jednak volumen kloroform:izoamil alkohola 24:1 (v/v), a sadržaj je potom nježno promiješan i centrifugiran (10 min./1500 g). U izdvojeni gornji sloj dodano je 0,6 volumena apsolutnog izopropanola, a smjesa je potom inkubirana pri sobnoj temperaturi tijekom 1 sata. Nakon centrifugiranja (30 min./6000 g) supernatant je odliven, a istaložena DNA je dva puta isprana s hladnim 70% etanolom kako je prethodno navedeno i resuspendirana u puferu (10 mM Tris-Cl, pH=8.5). Izolirana DNA dodatno je pročišćena PowerClean[®] DNA Clean-Up setom za čišćenje DNA (MoBio Laboratories, SAD), prema uputama proizvođača. Koncentracija izolirane DNA određena je spektrofotometrijski (mjerenjem absorbancije na $\lambda=260$ nm). Kvaliteta izolirane DNA provjerena je elektroforezom (80 V/cm; 1 sat) na 1% agaroznom gelu (wt/v) obojenog etidijevim bromidom (0,5 µg/l) i vizualizirana pod UV svjetlom.

Za analizu ukupnih prokariotskih zajednica DNA i RNA su koekstrahirane metodom opisanom u Griffiths i sur., (2000.). Prije izolacije, zbog nestabilnosti RNA, odnosno uklanjanja RNaze,

sve radne površine su temeljito oprane s RNase Away[®] otopinom (Sigma-Aldrich, SAD), a laboratorijski pribor dodatno steriliziran pri 180°C tijekom 12 sati. Sve otopine za izolaciju su pripravljene s vodom MQ čistoće tretirane DEPC-om (engl. *Diethyl pyrocarbonate*). Tijekom cijelog postupka izolacije tubice s uzorcima držane su na ledu. Za izolaciju DNA iz filtera, u tubice je odvagano 0,5 g staklenih kuglica promjera 0,1 mm i 0,5 g kuglica promjera 1 mm, dok je za izolaciju iz sedimenta korišteno po 0,25 g obiju vrsta kuglica. U tubice s filterima i sedimentom (0,2 g) dodan je 2% CTAB pufer (1 M Tris-HCl; pH=8, 5 M NaCl, 0,5 M EDTA, 20g/l CTAB; engl. *Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*) i 500 µl fenol:kloroform:izoamil alkohola 25:24:1 (v/v). Stanice su lizirane na vibracijskoj miješalici u trajanju od 4 min. (tubice s filterima) i 1 min. (tubice sa sedimentom). Nakon centrifugiranja (10 min./13300 g/4°C) u supernatant je dodan jednaki volumen kloroform:izoamil alkohola 24:1 (v/v), promiješan i ponovo centrifugiran (10 min./13300 g/4°C). Nukleinske kiseline u izdvojenom gornjem sloju precipitirane su dodatkom 1/10 volumena 3M natrijevog acetata (pH=5) i 1 volumena hladnog (-20°C) apsolutnog izopropanola, te centrifugiranjem (30 min./12500 g/4°C). Talog je dva puta ispran dodatkom 1 ml 70% hladnog (-20°C) etanola i centrifugiranjem (5 min./12500 g/4°C), osušen pri sobnoj temperaturi i resuspendiran u 50 µl DEPC vode. Koncentracija i kvaliteta izoliranih DNA i RNA provjerene su fluorimetrijski (Qubit, Invitrogen, SAD), spektrofotometrijski (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA), te na 1% (wt/v) agaroznom gelu obojenim s 3 µl SYBR[™] Safe (Invitrogen, SAD).

Odmah nakon izolacije, iz RNA je postupkom reverzne transkripcije sintetizirana cDNA (engl. *Complementary DNA*). Ukupna RNA je tretirana s 2 U/µl Turbo DNaze (Ambion, SAD) pri 37°C tijekom 30 min., te inaktivirana 5 min. na sobnoj temperaturi. U uzorke je potom dodano 1,5 µl deoksiribonukleozid trifosfata (dNTP; 10 mM) (New England Biolabs, SAD), 0,75 µl MgCl₂ (50 mM) (Sigma Aldrich, SAD), te 2,25 µl nasumičnih početnica (60 µM) (New England Biolabs, SAD). Denaturacija je provedena zagrijavanjem na 75°C (4 min.) i naglim hlađenjem na ledu. U reakcijsku smjesu je zatim dodano 3 µl 10 × pufera za sintezu prvog lanca cDNA [500 mM Tris-HCl (pH=8.3), 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 50 mM DTT], 1 µl inhibitora RNaze (SUPERase-In Rnase Inhibitor, 10 U/µl) (New England Biolabs, SAD) i 1,5 µl reverzne transkriptaze (200 U/µl) iz virusa mišje leukemije (M-MuLV, engl. *Moloney Murine Leukemia Virus*) (New England Biolabs, SAD) u konačnom volumenu od 25 µl. Inaktivacija reverzne transkriptaze provedena je inkubacijom pri 25°C, 10 min., pri 42°C, 50 min., te pri 90°C, 10 min. (Juusola i Ballantyne 2003.). Moguća kontaminacija RNA matrica s DNA provjerena je umnožavanjem bakterijskog 16S rRNA gena u PCR reakciji nakon tretiranja uzoraka DNazom. Reakcijska smjesa, konačnog volumena 50 µl sadržavala je: 5 ×

MyTaq™ Reaction Buffer Colorless (Bioline, SAD) PCR pufera, 0,4 μM svake početnice (BAC338F/BAC805R), 1,25 U Taq polimeraze (MyTaq™ DNA Polymerase, Bioline, SAD), te 1 μl matrice. Uvjeti reakcije bili su: preddenaturacija na 94°C, 2 min., zatim 30 ciklusa denaturacije na 94°C tijekom 1 min., sparivanja početnica pri 57°C, 30 s, te produljenja lanca na 72 °C, 2 min., a reakcija je završavala konačnim produljenjem lanca tijekom 2 min. pri 72°C. Na isti način provjerena je i uspješnost sinteze cDNA. Koncentracija i kvaliteta sintetizirane cDNA određena je spektrofotometrijski (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) i na 1% (wt/v) agaroznom gelu obojenom s 3 μl SYBR™ Safe (Invitrogen, SAD).

3.4. Umnožavanje ciljnih gena SRB i izrada klonskih knjižnica

3.4.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR) pri detekciji SRB

Za umnožavanje 16S rRNA gena SRB, korišteno je šest parova početnica, specifičnih za šest filogenetskih podskupina koje uključuju rodove *Desulfotomaculum* (DFM140/824), *Desulfobulbus* (DBB121/1237), *Desulfobacterium* (DBM169/1006), *Desulfobacter* (DSB127/1273), *Desulfonema/Desulfococcus/Desulfosarcina* (DCC305/1165) i *Desulfovibrio/Desulfomicrobium* (DSV230/838) (Tablica 3). Umnožavanje ciljnih gena provedeno je na PCR uređaju (T-personal Thermal Cycler, Biometra, Njemačka). Reakcijska smjesa, konačnog volumena 25 μl sadržavala je 2,5 μl 10 × PCR pufera (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂) (Sigma-Aldrich, SAD), 0,2 mM dNTP-a (Sigma-Aldrich, SAD), 0,75 μM svake početnice, 0,625 U Taq polimeraze (Sigma-Aldrich, SAD), te 5 μl DNA matrice (10 ng/μl). Uvjeti PCR reakcije bili su: preddenaturacija 5 min. na 95°C, 40 ciklusa sastavljenih od denaturacije na 95°C tijekom 1 min., sparivanja početnica na odgovarajućoj temperaturi (Tablica 3), 1 min., te produljenja lanca 1 min. na 72°C. Reakcija je završavala konačnim produljenjem lanca tijekom 7 min. pri 72°C.

Tablica 3: Oligonukleotidne početnice korištene u ovom radu.

POČETNICA	CILJNI GEN	CILJNI ORGANIZAM	SEKVENCA 5' – 3'	T _a * [°C]	VELIČINA [pb]	REFERENCA
DFM140	16S	<i>Desulfotomaculum</i>	TAGMCYGGGATAACRSYKG	58	700	Daly i sur., (2000.)
DFM842	rRNA		ATACCCSCWWCCTAGCAC			
DBB121	16S	<i>Desulfobulbus</i>	CGCGTAGATAACCTGTCTCATG	66	1120	Daly i sur., (2000.)
DBB1237	rRNA		GTAGKACGTGTGTAGCCCTGG TC			
DBM169	16S	<i>Desulfobacterium</i>	CTAATRCCGGATRAAGTCAG	64	840	Daly i sur., (2000.)
DBM1006	rRNA		ATTCTCARGATGTCAAGTCTG			

Tablica 3 - nastavak

POČETNICA	CILJNI GEN	CILJNI ORGANIZAM	SEKVENCA 5' – 3'	T _a * [°C]	VELIČINA [pb]	REFERENCA
DSB127	16S rRNA	<i>Desulfobacter</i>	GATAATCTGCCTTCAAGCCTGG	60	1150	Daly i sur., (2000.)
DSB1273			CYYYYYGCRRAAGTCGSTGCC T			
DCC305	16S rRNA	<i>Desulfococcus- Desulfonema- Desulfosarcina</i>	GATCAGCCACACTGGRACTGA CA	65	860	Daly i sur., (2000.)
DCC1165		GGGGCAGTATCTTYAGAGTYC				
DSV230	16S rRNA	<i>Desulfovibrio- Desulfomicrobium</i>	GRGYCYGCGTYCATTAGC SYCCGRCACTAGYRTYC ATC	61	610	Daly i sur., (2000.)
DSV838						
1492R	16S rRNA	<i>Bacteria</i>	TACGGYTACCTTGTTACGACTT AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	55	1465	Lane (1991.)
27F						
Kvantitativni PCR (qPCR)						
341f	16S rRNA	<i>Bacteria</i>	CCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGGCA	60	193	Watanabe i sur., (2001.)
534r						
BAC338F	16S rRNA	<i>Bacteria</i>	ACTCCTACGGGAGGCAG GACTACCAGGTATCTAATCC TGCCAGCAGCCGCGTAATAC	56	468	Yu i sur., (2005.)
BAC805R						
BAC516F**						
ARC787F	16S rRNA	<i>Archaea</i>	ATTAG ATACCCSBGTAGTCC GCCATGCACCWCCTCT AGGAATTGGCGGGGAGCAC	60	273	Yu i sur., (2005)
ARC1059R						
ARC915F**						
DSR-1F+	<i>dsrA</i>	Sulfat-reducirajući prokarioti	ACSCACTGGAAGCACGCCGG GTGGMRCCTGCAKRTTGG	55	221	Kondo i sur., (2004.)
DSR-R						
Sekvenciranje						
Sp6	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i> JM109	ATTTAGGTGACACTATAG AATACGACTCACTATAG	55	182	Univerzalna
T7						
515F	16S rRNA	<i>Bacteria i Archaea</i>	GTGCCAGCMGCCGCGTAA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	50	390	Caporaso i sur., (2011.)
806R						

*-Temperatura sparivanja početnica; **-TaqMan[®] sonda

Iako dodatno pročišćena, pokazalo se da DNA matrica izolirana iz sedimenata inhibira PCR reakcije provedene sa SRB specifičnim početnicama (inhibicija potvrđena provedenim inhibicijskim testom na qPCR uređaju; opisano u poglavlju 3.5.) te je na ovim uzorcima proveden tzv. umreženi PCR (engl. *nested* PCR). Za umreženi PCR kao matrica je korišten PCR produkt 16S rRNA gena prethodno umnožen pomoću univerzalnih parova početnica 27F/1492R (Tablica 2). Umnožavanje 16S rRNA gena provedeno je u reakciji konačnog volumena 25 µl, koja je sadržavala 2,5 µl 10 × PCR pufera (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂) (Sigma-Aldrich, SAD), 0,2 mM dNTP-a (Sigma-Aldrich, SAD), 0,5 µM svake početnice, 0,625 U Taq polimeraze (Sigma-Aldrich, SAD), te 2 µl DNA matrice (10

ng/μl). Reakcija se sastojala od preddenaturacije 5 min. na 95°C, te 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije 1 min., na 95°C, sparivanja početnica na 55°C tijekom 1 min. i produljenja lanca tijekom 90 s na 72°C. Reakcija je završavala konačnim produljenjem lanca tijekom 7 min., pri 72°C. PCR produkt (2,5 μl) korišten je dalje kao matrica za detekciju SRB-a u uzorcima sedimenta upotrebom gore navedenih šest parova početnica. PCR reakcije provedene su pod istim uvjetima kako je gore navedeno. Uspješnost umnožavanja 16S rRNA gena specifičnih za SRB i veličina odsječaka gena provjerena je na 1% agaroznom gelu (wt/v) s etidijevim bromidom.

3.4.2. Kloniranje i izrada klonskih knjižnica SRB

Za potrebe kloniranja i izrade klonskih knjižnica odsječci odgovarajuće veličine izrezani su iz gela i pročišćeni s GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, USA). Tubice s gelom, u koje su dodana 3 V otopine za otapanje gela, inkubirane su 10 min. pri 55°C. Nakon toga u tubice je dodan 1 V apsolutnog izopropanola. Sadržaj tubica propušten je kroz kolonu centrifugiranjem (1 min./14000 g), na koju je zatim dodano 700 μl otopine za ispiranje, te potom ponovo centrifugiran (1 min./14000 g). Zaostala DNA na kolonama je otopljena dodatkom 50 μl pufera za otapanje i centrifugiranjem (1 min./14000 g). Koncentracije dobivenih produkata određene su spektrofotometrijski (Biospec Nano, Shimadzu, Japan). Količina PCR produkta potrebnog za ligaciju u vektor (pGEM®-T Easy Vector System I, Promega, SAD) određena je prema jednadžbi:

$$\frac{\text{masa vektora [ng]} \times \text{veličina inserta [kb]}}{\text{veličina vektora [kb]}} \times \text{omjer vektor: insert (1:3)} = \text{masa inserta [ng]}$$

Ligacijska smjesa (konačnog volumena 10 μl) sadržavala je 1 μl pGEM®-T vektora (50 ng), 5 μl ligacijskog pufera (2x Rapid Ligation Buffer, Promega, Francuska), 1 μl enzima T4 DNA ligaze i prethodno određenu količinu PCR produkta. Smjesa je inkubirana preko noći na 4°C. Produktom ligacije provedena je transformacija kompetentnih stanica *E. coli* JM109 (Promega, SAD) na način da je 3 μl ligacijskog produkta pomiješano s 50 μl stanica. Nakon hladno-vrućeg šoka (20 min. u ledu, 1 min. u vodenoj kupelji na 42°C, 2 min. u ledu) u tubice je dodano 950 μl podloge LB (Luria-Bertani broth). Stanice su potom uzgajane na 37°C uz miješanje (200 rpm), tijekom 2 sata. Dobiveni transformanti naciepljeni su na čvrstu LB hranjivu podlogu s dodatkom ampicilina (50 mg/ml), X-Gal (50 mg/ml) (supstrat β-galaktozidaze, 5-brom-4-klor-3-indolil-β-D-galaktopirandozid) i IPTG-a (100 mM) (izopropil-β-D-tiogalaktozid), te

inkubirani 24 sata na 37°C. Kompetentne stanice sadrže višestruka mjesta za kloniranje koja se nalaze u *lacZ* genu (kodira prvih 146 aminokiselina β-galaktozidaze). Stanice *E. coli* koje nisu uspješno transformirane proizvode enzim β-galaktozidazu, koji hidrolizira X-Gal iz podloge u 5-bromo-4-kloro-indoksil što negativnim kolonijama daje plavu boju. U uspješno transformiranim stanicama ne dolazi do ekspresije *lacZ* gena, stoga su one bijele. Na ovaj način moguće je, u postupku plavo-bijele selekcije, razlikovati pozitivne klonove koje sadrže gen od interesa od negativnih klonova. Pozitivni klonovi selektirani su s ploča te su izrađene klonske knjižnice za svaki ciljni gen. Prisutnost ciljnog DNA odsječka u pozitivnim klonovima provjerena je u PCR reakciji upotrebom univerzalnog Sp6/T7 para početnica (Tablica 3) specifičnog za pGEM[®]-T Easy vektor. Reakcijska smjesa (konačnog volumena 25 μl) sadržavala je 2,5 μl 10 × PCR pufera (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂) (Sigma-Aldrich, SAD), 0,4 mM dNTP-a (Sigma-Aldrich, SAD), 0,2 μM svake početnice, 0,5 U *Taq* polimeraze (Sigma-Aldrich, SAD), te 1 μl DNA matrice. Uvjeti PCR reakcije bili su: preddenaturacija 4 min. na 95°C, 35 ciklusa sastavljenih od denaturacije na 95°C tijekom 45 s, sparivanja početnica na 55°C tijekom 45 s, te produljenja lanca 45 s na 72°C. Reakcija je završavala konačnim produljenjem lanca tijekom 7 min. pri 72°C. PCR produkti su vizualizirani na 1% agaroznom gelu (wt/v) s etidijevim bromidom te je provjerena veličina ciljanog fragmenta. Ovako dobiveni PCR produkti poslani su u servis za sekvenciranje MacroGen Inc. (Nizozemska).

3.5. Sekvenciranje i obrada podataka

3.5.1. Sekvenciranje Sangerovom metodom pri identifikaciji SRB

Za potrebe filogenetskih analiza SRB, ukupno 192 pozitivna klona sekvencirana su Sangerovom (dideoksi) metodom na ABI3730XL (Applied Biosystems, SAD) uređaju, korištenjem univerzalne Sp6 početnice. Kvaliteta i smjer čitanja dobivenih sekvenci provjereni su ručno u Chromas Lite (v. 2.0) softveru. Najbliži srodnici identificirani su u BLASTn (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information, SAD, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). OTU su definirane na temelju sličnosti od 97%. Višestruka sravnjivanja nukleotidnih sljedova i izrada filogenetskih stabla *Neighbor-Joining* metodom obavljani su u ClustalX (v. 1.8) softveru (Thompson i sur., 1997.) s isključenim nesravnjenim dijelovima. Pouzdanost pojedinih grana utvrđena je tzv. *bootstrap* metodom (novo slučajno višestruko sravnjivanje jednake dužine iz originalnog višestrukog sravnjivanja) na temelju 1000 ponavljanja. Kako bi se utvrdilo da li je uzorkovanjem u potpunosti

obuhvaćena bakterijska raznolikost, provedena je rarefakcijska analiza pomoću Analytic Rarefaction softvera (<http://www.uga.edu/strata/software/>).

Nukleotidni sljedovi 16S rRNA gena SRB pohranjeni su u NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*, SAD) bazi podataka pod pristupnim brojevima KT424312-KT424494.

3.5.2. Sekvenciranje visoke propusnosti pri analizi prokariotskih zajednica

Uzorci DNA i cDNA za analize ukupnih prokariotskih zajednica sekvencirani su u FISABIO (Valencia, Španjolska) servisu, metodom visoke propusnosti na Illumina MiSeq platformi. Sekvencirana je V4 hipervarijabilna regija 16S rRNA gena, korištenjem 515F/806R para oligonukleotidnih početnica (Caporaso i sur., 2011.). Provjera kvalitete dobivenih sekvenci, grupiranje i uklanjanje himernih sekvenci provedeno je u Mothur (v1.39.3) *pipeline* programu (Schloss i sur., 2009.). Dobivene FASTA datoteke koje su sadržavale sve sekvencirane nukleotidne sljedove sravnjene su sa SILVA bazom podataka (SILVA small-subunit SSU rRNA SEED) koristeći softver SINA (engl. *SILVA Incremental Aligner*) (Pruesse i sur., 2012.). Sekvence sa sličnošću od 97% grupirane su u OTU-e na temelju Phylip matrica udaljenosti (Schloss i Handelsman 2005.). Reprezentativni nukleotidni sljed za svaki OTU identificiran je u SILVA 16S rRNA bazi podataka pomoću BLASTn (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information, SAD, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Camacho i sur., 2009.). Iz analiza su uklonjeni svi nukleotidni sljedovi kraći od 250 i duži od 315 nukleotida te sve sekvence s neodređenim bazama (engl. *ambigs*).

3.5.3. Statistička obrada podataka

Razlike u abundanciji bakterijskih i arhejskih 16S rRNA gena, odnosno vrsta njihove razdiobe i homogenost varijance testirana je Kruskal-Wallisovim i Shapiro-Wilkovim testom koristeći Statistica12 računalni program. Broj OTU-a, Chao1 i ACE procjenitelji (engl. *Abundance-Based Coverage Estimator*), Shannonov indeks raznolikosti i pokrivenost sekvenciranjem (engl. *Coverage*) izračunati su nakon što je postupkom normalizacije utvrđena vrsta raspodjele u uzorcima. Analiza NMDS (engl. *Non-Metric Multidimensional Scaling*) provedena je u PRIMER 6 v.6.1.11. i PERMANOVA +v.1.0.1. računalnim programima (Clarke i Gorley, 2006.). Sličnost među uzorcima određena je na temelju matrica udaljenosti izračunatih iz relativnih udjela pojedinog taksonomskog nivoa, koristeći Bray-Curtisov indeks sličnosti (Clarke i Warwick, 1994.).

Da bi se utvrdila veza između strukture zajednice u jezeru i okolišnih čimbenika korištena je kanonska analiza korespondencije (CCA, engl. *Canonical Correspondence Analysis*) u Canoco v5 računalnom programu, pri čemu je korišten Mantelov test (1000 permutacija) s Bonferronijevom korekcijom. Spearmanovim testom korelacije određen je stupanj ovisnosti među varijablama. Analize su provedene samo za dominantne taksonomske razine, odnosno one čiji je udio u barem jednom uzorku bio >1%, koristeći relativne abundancije i okolišne podatke za svaki pojedini uzorak. Rijetke taksonomske skupine izuzete su iz analiza kako bi se smanjio broj regresija i izbjegao utjecaj lažnih pozitivnih svojstava koji mogu nastati automatskim anotacijama.

3.6. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)

Brojnost ukupnih bakterijskih i arhejskih 16S rRNA gena kao i brojnost sulfat-reducirajućih prokariota (SRP) određena je qPCR esejima provedenim na uređaju ABI 7900 HT Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) koristeći Syber green kemiju. Reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 15 µl sadržavala je 7,5 µl SYBR[®] Green PCR Master Mix-a (Applied Biosystems, SAD), 1 mM svake početnice te 2 ng (za uzorke vodenog stupca) ili 0,2 ng DNA matrice (za uzorke sedimenta). Uvjeti reakcije bili su: 15 min. preddenaturacije na 95°C; 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije 15 s na 95°C, sparivanja početnica na odgovarajućim temperatuama (Tablica 3) tijekom 30 s i produljenja lanca na 72°C, 30 s; te ciklus disocijacijske reakcije u svrhu dobivanja krivulje taljenja. Da bi se izbjegla detekcija nespecifičnih produkata reakcije, podaci su, ovisno o genu, sakupljeni na temperaturi koja je iznad točke tališta nespecifičnih produkata. U svaku reakciju su bile uključene i po dvije negativne kontrole, a svi uzorci su analizirani u triplikatima. Rezultati su normalizirani prema prinosima DNA iz izolacijskih postupaka.

Za određivanje brojnosti ukupnih bakterija u uzorcima korišten je univerzalni 341f i 534r par početnica koji ciljano umnožava bakterijski 16S rRNA gen, dok su SRP određivani koristeći početnice DSV230/DSV838 te DCC 305/DCC165 (16S rRNA ciljani gen) i DSR1F/DSR-R (*dsrA* gen).

qPCR je korišten za apsolutnu kvantifikaciju navedenih gena stoga je za svaki ciljani gen izrađena standardna krivulja na temelju serije razrjeđenja ($0,5 \times 10^2$ do $0,5 \times 10^8$ kopija gena/µl) rekombinantnih plazmida u koje je prethodno bio ukloniran gen od interesa po postupku navedenom u poglavlju 3.4.2. Rekombinantni plazmid je izoliran iz kompetentnih stanica *E. coli* pomoću QIAprep[®] Miniprep (Qiagen, Njemačka) seta za izolaciju na način da je uzorak s

plazmidom centrifugiran (5 min./13000 g), a pelet potom resuspendiran u 250 μ l P2 pufera. Nakon toga je u uzorak dodano 350 μ l N3 pufera te centrifugirano (10 min./13000 g). Supernatant je zatim prebačen u kolonicu (QIAprep Spin Column) i centrifugiran (60 s/13000 g), nakon čega je kolonica isprana s 500 μ l PB pufera i 750 μ l PE pufera, te ponovo centrifugirana (60 s/13000 g). Plazmid je s kolonice ispran dodatkom 30 μ l EB pufera i centrifugiranjem (1 min./13000 g). Nakon izolacije provedena je restrikcija plazmida, u svrhu njegove linearaizacije, na način da je u 24 μ l izoliranog plazmida dodano 30 U restrikcijske endonukleaze *SalI* (Thermo Fisher Scientific, SAD) i 3 μ l pripadajućeg 10 \times O pufera. Smjesa je inkubirana tijekom noći na 37°C. Koncentracija izoliranog plazmida određena je spektrofotometrijski (Biospec Nano, Shimadzu, Japan), temeljem koje je potom napravljena serija razrjeđenja za standardnu krivulju. Broj kopija ciljnog gena izračunat je prema formuli:

$$N = N_A / M_r \times C \times 10^6$$

gdje je N – broj kopija gena (broj molekula/ μ l); N_A – Avogadrova konstanta ($6,023 \times 10^{23}$ mol⁻¹); M_r – molekulska masa plazmida (g/mol); C – koncentracija plazmida (μ g/ μ l).

Efikasnost svake reakcije izračunata je prema formuli:

$$E = 10^{(-1/y)} - 1$$

gdje je E – efikasnost reakcije; y – nagib pravca standardne krivulje

Analize brojnosti bakterija i arheja na uzorcima prikupljenima tijekom 2015. godine, provedene su qPCR esejima koristeći TaqMan[®] sonde na LightCycler[®] 480 (Roche Applied Science, Švicarska) uređaju. Standardne krivulje izrađene su na temelju plazmida, prethodno ukloniranog u pCR 4-TOPO Vector (Invitrogen, USA). Koncentracija plazmidne DNA određena je fluorimetrijski (Invitrogen, USA), a broj kopija 16S rRNA gena određen je prema gore navedenoj formuli. Standardne točke dobivene su serijom razrjeđenja u rasponu od 10 do 10¹⁰ kopija gena/ μ l. Za umnožavanje bakterijskih 16S rRNA gena korišten je Bac338F i Bac805R par specifičnih početnica te Bac516F TaqMan[®] sonda. Za brojnost arhejskih 16S rRNA gena korišten je Arc787F i Arc1059R par početnica s pripadajućom Arc915F TaqMan[®] sondom. Reakcijska smjesa (konačnog volumena 15 μ l) sadržavala je 10 μ l TaqMan[®] Mastermix (Roche Applied Science, Switzerland), 0,2 μ M svake početnice i odgovarajuće TaqMan[®] sonde, te 5 μ l DNA matrice (razrijeđene 10 \times). Uvjeti reakcije bili su: preddenaturacija na 94°C, 10 min., potom 45 ciklusa denaturacije na 94°C kroz 10 s i sparivanja početnica na 60°C tijekom 30 s. Dvije negativne kontrole bez DNA matrice bile su uključene u svaki eksperiment. Dodatno su na uzorcima iz 2015. provedene i analize brojnosti sulfat-reducirajućih prokariota (SRP), putem α podjedinice *dsrAB* gena koristeći DSR1F+/DSR-R

početnice na ABI 7900 HT Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) uređaju, kako je navedeno gore u tekstu.

Prije provedbe qPCR analiza na uzorcima je proveden inhibicijski test kako bi utvrdilo da u uzorcima nema inhibicijskih supstanci koje bi umanjile fluorescenciju (C_t). Test je proveden tako da je u konačni volumen od 15 μ l dodana poznata količina plazmidnog vektora (pGEM-T Easy Vector, Promega, France), 2 μ l uzorka DNA (razrijeđenog na 1ng/ μ l), 10 μ l SYBR[®] Green PCR Master Mixa (Applied Biosystems, SAD) i 0,4 μ M svake univerzalne početnice (Sp6/T7, Tablica 2). Reakcija je započeta preddenaturacijom na 95°C tijekom 15 min., nakon čega je uslijedilo 30 ciklusa denaturacije na 95°C, 30 s, sparivanja početnica na 55°C, 30 s i produljenja lanca pri 72°C, 30 s. Izmjerene C_t vrijednosti koje su značajno odstupale od uzoraka bez dodane DNA ukazivalo je da su u njima prisutni inhibitor. Inhibicija je zabilježena u svim uzorcima DNA izoliranim iz sedimenta, stoga su oni razrijeđeni na 0,1 ng/ μ l, što je odgovaralo koncentraciji na kojoj inhibicije u PCR reakcije više nije bilo.

4. REZULTATI

4.1. Okolišni uvjeti u Rogozničkom jezeru

4.1.1. Fizičko-kemijskih čimbenici tijekom stratifikacije

Vertikalni profili fizičko-kemijskih čimbenika u zimskoj (veljača) i ljetnoj (kolovoz) sezoni 2014. godine (Slika 6), ukazuju na izraženu termohalinu stratifikaciju vodenog stupca, usko povezanu s kemijskom stratifikacijom i stabilnom kemoklinom formiranom između 8 i 9 m dubine, ispod koje su uspostavljeni euksinski uvjeti. Detaljne vrijednosti fizičko-kemijskih čimbenika prikazane su u prilogu (Tablica I).

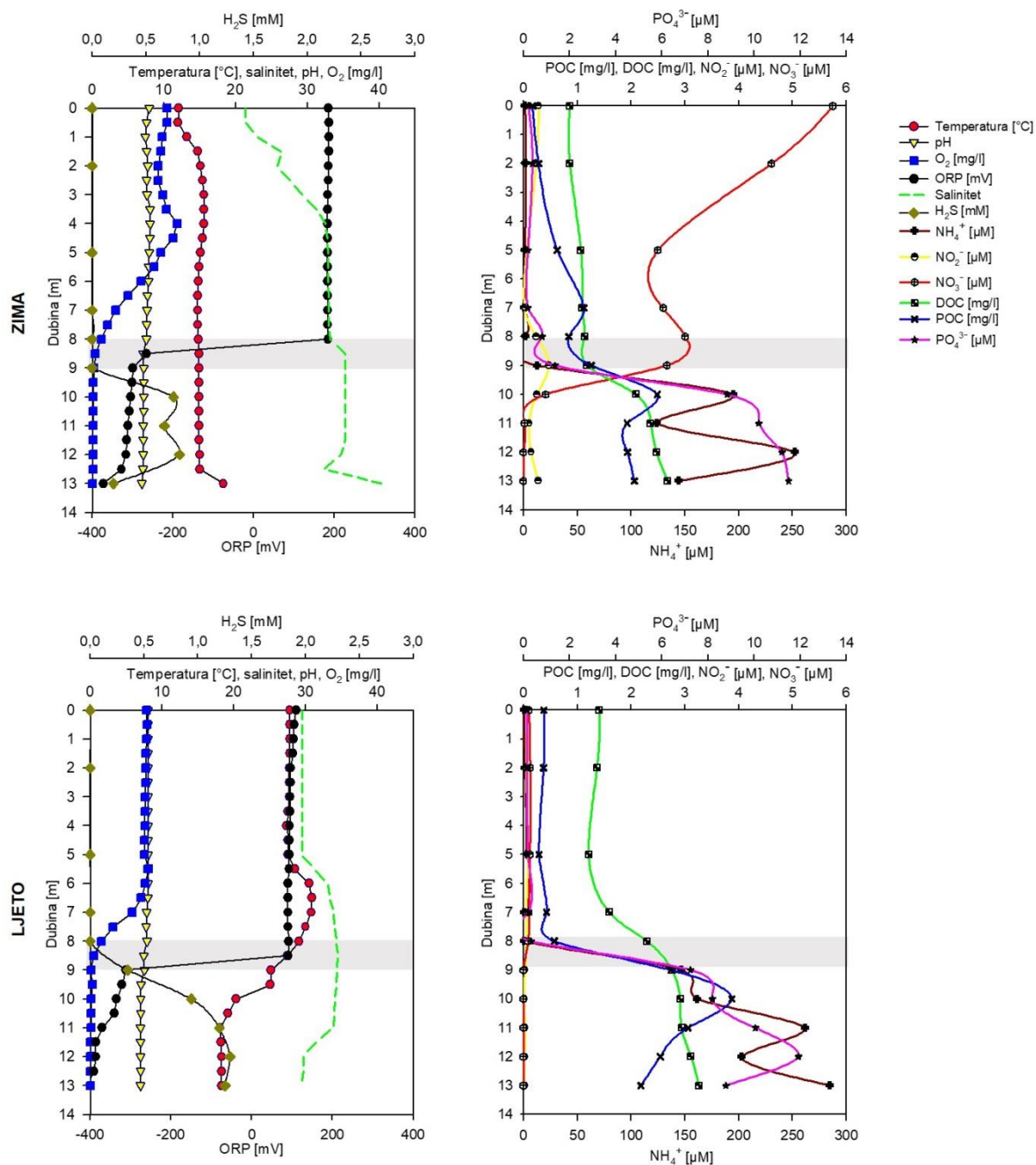
Miksolimnion je bio dobro oksigeniran u obje sezone. Maksimalna koncentracija O₂ (11,89 mg/l) u zimskoj sezoni zabilježena je na 4 m, dok je maksimum u ljetnoj sezoni (7,95 mg/l) zabilježen na 0,5 m dubine. U sloju kemokline dolazi do naglog pada koncentracije O₂, što rezultira i naglim padom ORP-a koji u monimolimnionu poprima negativne vrijednosti od -390 mV u ljetnoj i -326,8 mV u zimskoj sezoni u pridnenom sloju (13 m). Redukcijski uvjeti, koji počinju prevladavati od kemokline prema monimolimnionu rezultirali su pojavom H₂S. U ljetnoj sezoni koncentracije H₂S kretale su se od 0,35 mM u kemoklini do 1,35 mM u monimolimnionu, dok su u zimskoj sezoni koncentracije iznosile 0,07 mM (kemoklina) i 0,8 mM (monimolimnion).

Temperatura površinskog sloja tijekom zime iznosila je minimalnih 12,1°C, dok je maksimum ljeti iznosio 27,8°C. Sezonske varijacije temperature u monimolimnionu nisu bile izražene, a na uzorkovanoj dubini (12 m) kretala se od 15°C u zimskoj do 18,3°C u ljetnoj sezoni. Za razliku od pH koji je konstantan duž vertikalnog profila (prosječno $7,42 \pm 0,33$), salinitet ima tendenciju rasta s dubinom, a u miksolimnionu se kretao od prosječnih $29,3 \pm 4,4$ u zimi do 29,5 u ljeto. U kemoklini je salinitet iznosio 35,3 (zima) i 34,5 (ljeto), a u uzorcima monimolimniona 29,7 u zimskoj, te 34,7 u ljetnoj sezoni.

Koncentracije NO₂⁻ općenito su bile niske i opadale su s dubinom. Zimi u monimolimnionu koncentracija NO₂⁻ iznosila je 0,14 μM, a ljeti svega 0,02 μM. Isti trend pokazuju i NO₃⁻, koji su maksimum imali tijekom zime u površinskom sloju (5,75 μM), dok su u monimolimnionu u obje sezone koncentracije bile ispod granica detekcije. Za razliku od NO₂⁻ i NO₃⁻, koncentracije NH₄⁺, značajno su rasle s dubinom, te su u monimolimnionu dosegnule maksimum od 252,3 μM u zimi i 284,4 μM u ljeto. Isti trend slijede i PO₄³⁻ za koje su najviše vrijednosti zabilježene u monimolimnionu (11,5 μM u zimi i 11,9 μM u ljeto).

Vertikalni profili POC-a i DOC-a pokazuju nagli porast koncentracije u kemoklini (POC od 1,26 mg/l u zimskoj do 2,74 mg/l u ljetnoj sezoni; DOC od 1,18 mg/l u zimskoj do 2,76 mg/l u

ljetnoj sezoni), a maksimum su dosegle u monimolimnionu (POC od 2,06 mg/l u zimskoj do 2,54 mg/l u ljetnoj sezoni; DOC od 2,68 mg/l u zimskoj do 3,26 mg/l u ljetnoj sezoni).



Slika 6. Vertikalni profili fizičko-kemijskih čimbenika, temperature (T), saliniteta (S), pH, otopljenog kisika (O₂), sumporovodika (H₂S) (lijevo), te nitrita (NO₂⁻), nitrata (NO₃⁻), ortofosfata (PO₄³⁻), amonijaka (NH₄⁺), partikularnog (POC) i otopljenog (DOC) organskog ugljika (desno) tijekom zime (veljača) i ljeta (kolovoz) 2014. godine. Zasjejnjena područja označavaju sloj kemokline.

Termohalina stratifikacija vodenog stupca bila je izražena i tijekom svih uzorkovanih sezona 2015. godine (Slika 7; Prilog, Tablica I). Koncentracije otopljenog O₂ u površinskom sloju kretale su se od 12,3 mg/l tijekom zime do 6,7 mg/l u jesen (prosječno $9,57 \pm 2,34$ mg/l). Sloj

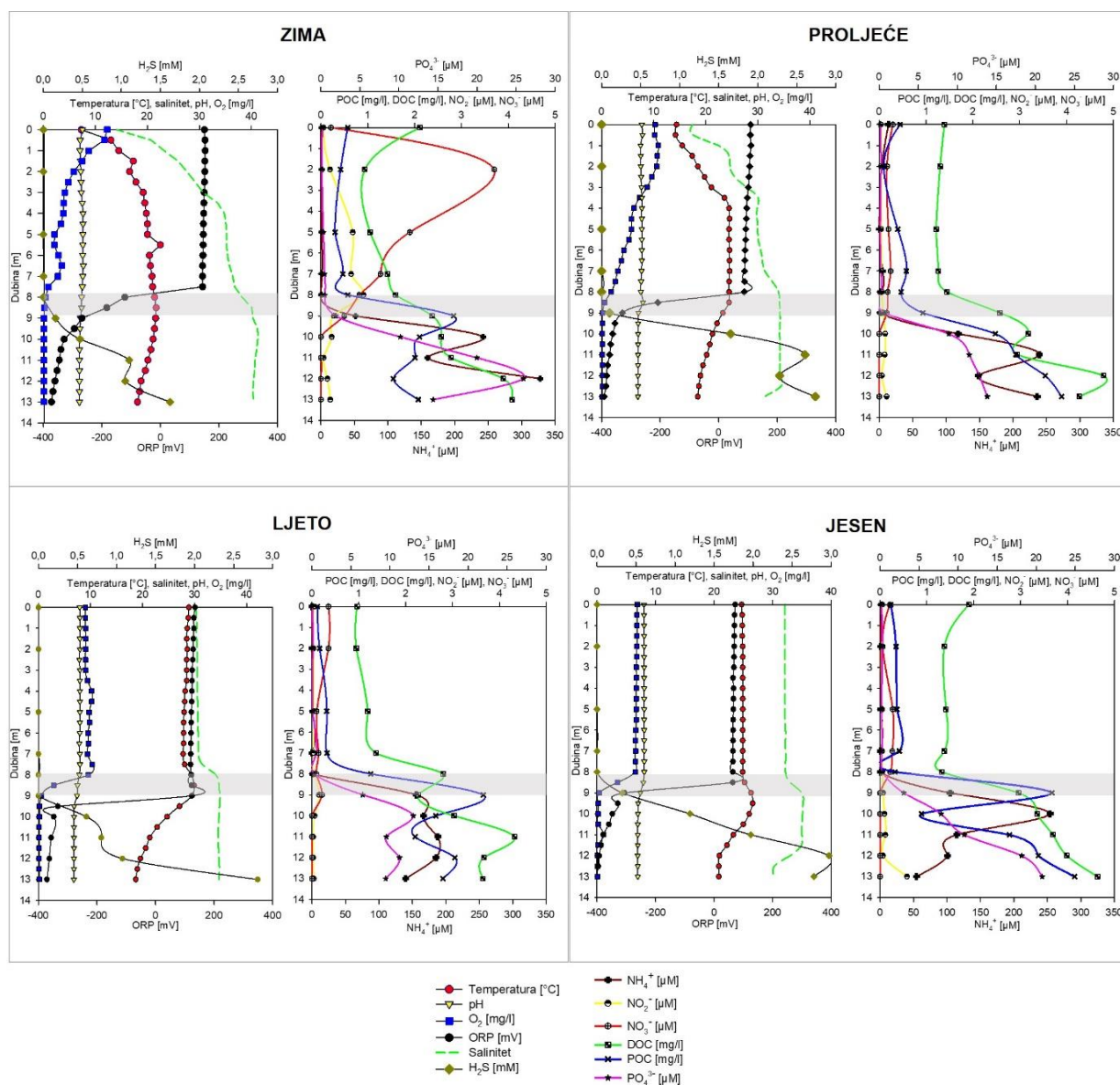
kemokline karakteriziran je naglim padom koncentracije O₂ koje su u tom sloju iznosile 0,4 mg/l u zimskoj do maksimalnih 3,5 mg/l u jesenskoj sezoni (prosječno $1,85 \pm 1,5$ mg/l) i ORP-a koji u ovom sloju poprima negativne vrijednosti s prosjekom od $-189,38 \pm 87,3$ mV. U kemoklini je također zabilježen porast slobodnog H₂S, čije su se koncentracije kretale od 0,32 mM u jesen do 0,63 mM tijekom zime (prosječno $0,37 \pm 0,2$ mM). Redukcijski uvjeti bili su izraženiji u monimolimnionu gdje je prosječna vrijednost ORP-a tijekom sezona iznosila $-374,5 \pm 15,8$ mV, a koncentracije H₂S su se kretale od 1,05 mM do 2,97 mM (prosječno $1,84 \pm 0,9$ mM).

Temperatura površinskog sloja u zimskoj sezoni iznosila je 7,3°C do maksimalnih 28,9 u ljetnoj sezoni (prosječno $18,8 \pm 9,8$ °C), a kemokline od 21,7°C zimi do 29,9°C ljeti (prosječno $25,3 \pm 3,4$ °C). Sezonske varijacije temperature najmanje su bile izražene u monimolimnionu. U zimskoj sezoni temperatura tog sloja iznosila je 18,8°C, a maksimum od 20,9°C je zabilježen u jesen (prosječno $19,6 \pm 0,9$ °C). Salinitet pokazuje jasan gradijent rasta s dubinom (Slika 7), tako da su najniže vrijednosti zabilježene u površinskom sloju (od 14,15 u zimskoj do 32,1 u jesenskoj sezoni; prosječno $23,51 \pm 9,0$). Salinitet se u sloju kemokline kretao od 33 u jesen do 40,1 u zimi (prosječno $35,5 \pm 3,15$), a u monimolimnionu od 33 u jesen do 40,3 u zimi (prosječno $35,7 \pm 3,3$). Za razliku od saliniteta pH vrijednosti su bile prilično konstantne duž vertikalnog profila i sezonski. U miksolimnionu prosječno su iznosile $7,8 \pm 0,2$, u kemoklini $7,7 \pm 0,3$, a u monimolimnionu $6,93 \pm 0,08$. Koncentracije NO₂⁻ i NO₃⁻ u površinskom sloju su općenito bile niske i prosječno su iznosile $0,16 \pm 0,23$ μM (NO₂⁻) i $0,55 \pm 0,69$ μM (NO₃⁻), s najvišim vrijednostima u zimskoj sezoni.

U sloju kemokline i monimolimnionu NO₃⁻ su bili ispod granica detekcije, a NO₂⁻ su prosječno iznosili $0,12 \pm 0,08$ μM (kemoklina) i $0,074 \pm 0,04$ μM (monimolimnion). Suprotan trend zabilježen je za koncentracije NH₄⁺, koje su u miksolimnionu bile najniže (prosječno $2,16 \pm 2,07$ μM). U sloju kemokline je došlo do naglog rasta koncentracije (prosječno $107,8 \pm 42,9$ μM), a najviše vrijednosti zabilježene su u monimolimnionu (prosječno $146,45 \pm 98,5$ μM) s maksimalnom vrijednošću od 328,16 μM u zimskoj sezoni. Koncentracije PO₄³⁻ su slijedile isti trend. Najniže vrijednosti zabilježene su u miksolimnionu (prosječno $2,6 \pm 0,06$ μM), porast na prosječnih $7,9 \pm 4,6$ μM zabilježen je u kemoklini, a najviše vrijednosti u monimolimnionu od prosječnih $14,9 \pm 4,4$ μM, s maksimumom u zimskoj sezoni.

Najviše vrijednosti POC-a bile su u kemoklini (prosječno $2,78 \pm 1,29$ mg/l) s maksimumom od 3,67 mg/l u jesen. U miksolimnionu je prosječna koncentracija POC-a iznosila $0,39 \pm 0,08$ mg/l, a u monimolimnionu $2,65 \pm 0,53$ mg/l. Vertikalni profili koncentracije DOC-a također pokazuju nagli rast u sloju kemokline (prosječno $2,55 \pm 0,3$ mg/l) s maksimumom od 2,96 mg/l u jesen.

Prosječna koncentracija u miksolimnionu iznosila je $1,42 \pm 0,07$, a u monimolimnionu $3,68 \pm 0,25$ mg/l s maksimumom od 4,79 mg/l u ljetnoj sezoni.



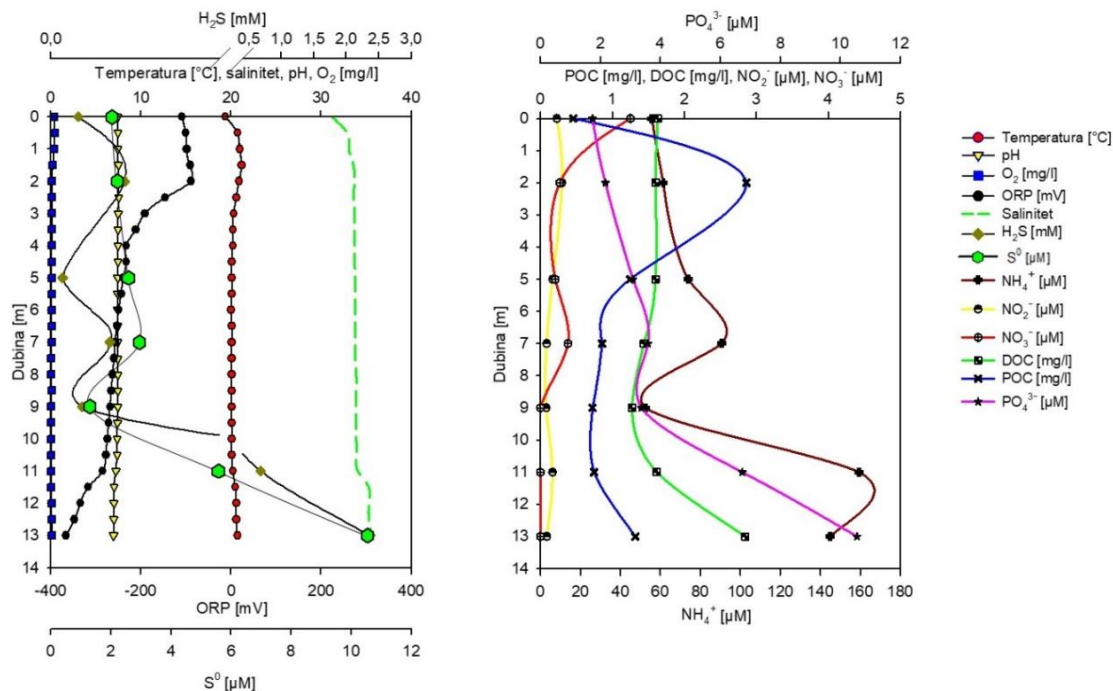
Slika 7. Vertikalni profili fizičko-kemijskih čimbenika, temperature (T), saliniteta (S), pH, topljenog kisika (O₂), sumporovodika (H₂S) (lijevo), te nitrita (NO₃⁻), nitrata (NO₂⁻), ortofosfata (PO₄³⁻), amonijaka (NH₄⁺), partikularnog (POC) i topljenog (DOC) organskog ugljika (desno) tijekom zime (siječanj), proljeća (travanj), ljeta (srpanj) i jeseni (rujan) 2015. godine. Zasjenjena područja označavaju sloj kemokline.

4.1.2. Fizičko-kemijskih čimbenici tijekom holomiksije

Na grafičkim prikazima fizičko-kemijskih čimbenika izmjerenih neposredno nakon miješavanja slojeva vodenog stupca jezera (24. listopada 2016. godine) (Slika 8), jasno je vidljiv nestanak vertikalne stabilnosti i pojava holomiktičnih uvjeta, prilikom koje je cijeli vodeni stupac postao euksiničan. Vrijednosti H₂S kretale su se od 0,03 mM na površini do 2,4

mM na 13 m dubine (prosječno $0,5 \pm 0,9$ mM), a zabilježena je i pojava koloidnog (elementarnog) sumpora, s najvišom koncentracijom u pridnenom sloju ($10,55 \mu\text{M}$), a najnižom na 9 m dubine ($1,3 \mu\text{M}$) s prosjekom kroz vodeni stupac od $3,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$. Tijekom holomiksije, reduktivni uvjeti bili su u cijelom vodenom stupcu, koji je u smislu temperature (prosječno $20,3 \pm 0,4^\circ\text{C}$), pH (prosječno $7,4 \pm 0,2$) i saliniteta (prosječno $33,9 \pm 0,8$) bio homogen.

Vertikalni profili nutrijenata PO_4^{3-} i NH_4^+ pokazuju da njihove vrijednosti rastu s dubinom. U površinskom sloju koncentracija PO_4^{3-} iznosila je $1,7 \mu\text{M}$, dok je u pridnenom sloju iznosila $3,4 \mu\text{M}$ (prosječno $4,5 \pm 3,1 \mu\text{M}$). Koncentracija NH_4^+ na površini (0 m dubine) iznosila je $55,8 \mu\text{M}$ do najviših $159,5 \mu\text{M}$ izmjerenih na 11 m dubine (prosječno $91,3 \pm 43,7 \mu\text{M}$). Tijekom holomiksije NO_3^- su detektirani samo od površine ($1,25 \mu\text{M}$) do 7 m dubine ($0,4 \mu\text{M}$) s prosječnom koncentracijom od $0,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$, dok su NO_2^- detektirani u cijelom vodenom stupcu s najnižom vrijednošću od $0,08 \mu\text{M}$ izmjerenom na 9 m do najviših $0,3 \mu\text{M}$ na površini (prosječno $0,2 \pm 0,08 \mu\text{M}$). Najviša vrijednost POC-a bila je na 2 m dubine ($2,9 \text{ mg/l}$), a najniža na površini ($0,5 \text{ mg/l}$) s prosjekom od $1,8 \pm 0,8 \text{ mg/l}$ duž vodenog stupca. Vertikalni profil DOC-a pokazuje rast koncentracije s dubinom koja se kretala od $1,6 \text{ mg/l}$ na 0, 2 i 5 m dubine do $2,8 \text{ mg/l}$ na dubini od 13 m (prosječno $1,7 \pm 0,5 \text{ mg/l}$).



Slika 8. Vertikalni profili fizičko-kemijskih čimbenika, temperature (T), saliniteta (S), pH, otopljenog kisika (O₂), sumporovodika (H₂S) i elementarnog sumpora (S⁰) (lijevo), te nitrita (NO₂⁻), nitrata (NO₃⁻), ortofosfata (PO₄³⁻), amonijaka (NH₄⁺), partikularnog (POC) i otopljenog (DOC) organskog ugljika (desno) tijekom holomiksije (listopad 2016.)

4.2. Taksonomska struktura i prostorno-vremenska dinamika SRB

Korištenjem 6 parova specifičnih početnica u PCR reakcijama uspješno su u vodenom stupcu i sedimentu detektirane 2 podskupine SRB, usko povezane s rodovima *Desulfococcus/Desulfonema/Desulfosarcina* (DCC) te *Desulfovibrio/Desulfomicrobium* (DSV), kao što je prikazano u Tablici 4. Preostale 4 filogenetske podskupine *Desulfotomaculum* (DFM), *Desulfobulbus* (DBB), *Desulfobacterium* (DBM) i *Desulfobacter* (DSB) nisu detektirane u uzorcima prikupljenima tijekom uzorkovanih sezona.

Tablica 4. Detekcija filogenetskih podskupina SRB putem PCR reakcije u uzorcima vodenog stupca i sedimenta Rogozničkog jezera.

GEN	Naziv	Ciljna podskupina	ZIMA			LJETO			
			M	S (0-5 cm)	S (5-10 cm)	M	K	S (0-5 cm)	S (5-10 cm)
16S rRNA	DFM	<i>Desulfotomaculum</i>	-	-	-	-	-	-	-
16S rRNA	DBB	<i>Desulfobulbus</i>	-	-	-	-	-	-	-
16S rRNA	DBM	<i>Desulfobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-
16S rRNA	DSB	<i>Desulfobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-
16S rRNA	DCC	<i>Desulfonema / Desulfococcus / Desulfosarcina</i>	+	+	+	-	-	+	+
16S rRNA	DSV	<i>Desulfovibrio / Desulfomicrobium</i>	+	-	-	+	+	-	-

M-monimolimnion; K-kemoklina; S-sediment; „-“ nije detektirano; „+“ detektirano.

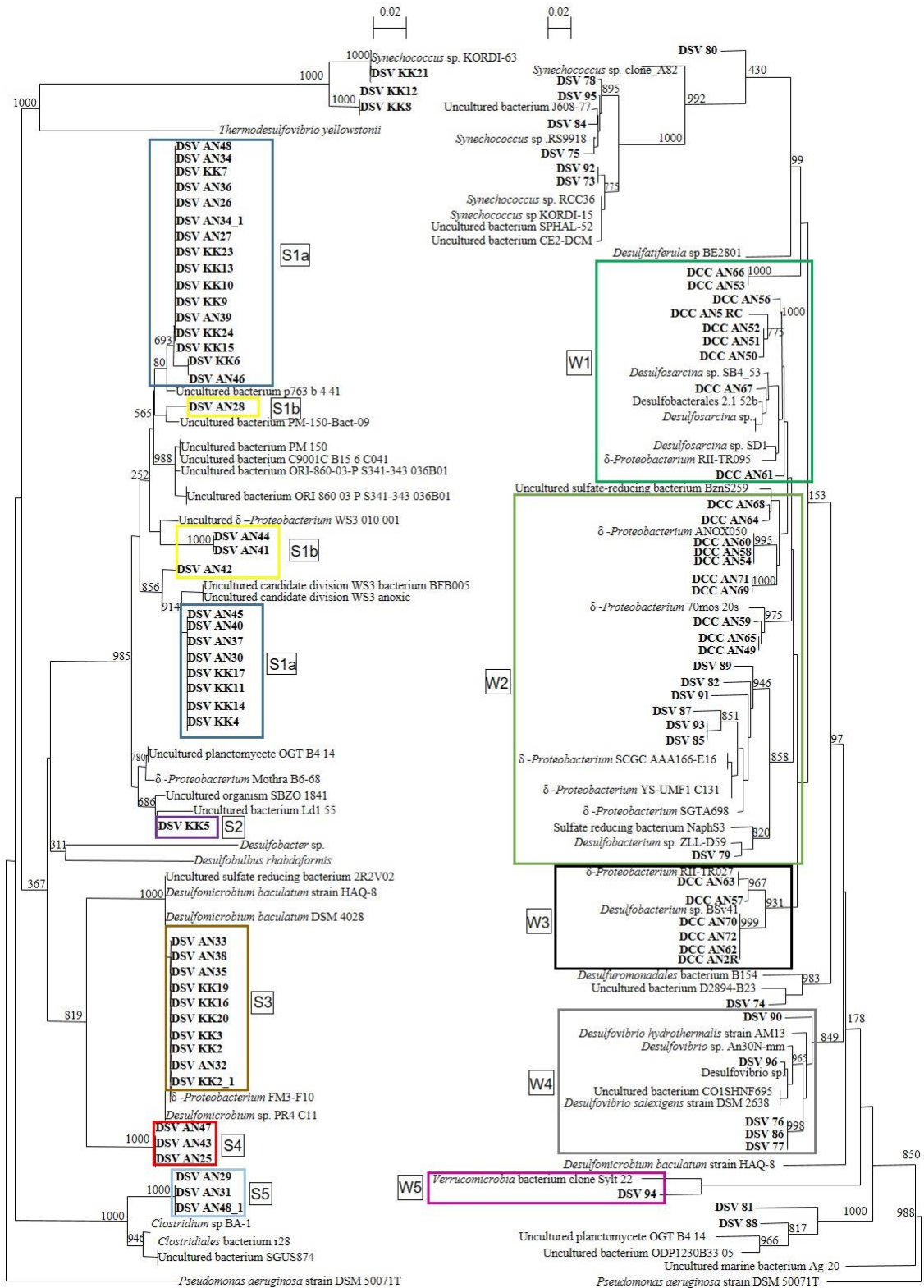
Tijekom zime DCC podskupina detektirana je u monimolimnionu, kao i u oba sloja sedimenta, dok je DSV podskupina detektirana isključivo u monimolimnionu. Tijekom ljeta, DCC podskupina bila je prisutna samo u sedimentu, a DSV podskupina samo u uzorcima vodenog stupca. Filogenetska pripadnost detektiranih podskupina SRB u kemoklini i monimolimnionu te u sedimentu tijekom zime i ljeta 2014. godine prikazana je na Slikama 9 i 10. SRB su identificirane sekvenciranjem 16S rRNA gena Sangerovom dideoksi metodom. Nakon pregleda kvalitete sekvenci i njihove obrade, prosječna duljina dobivenih sekvenci za DCC filogenetsku

podskupinu iznosila je 857 ± 39 nukleotida, a za DSV podskupinu 591 ± 47 nukleotida, na osnovi kojih su izrađena filogenetska stabla.

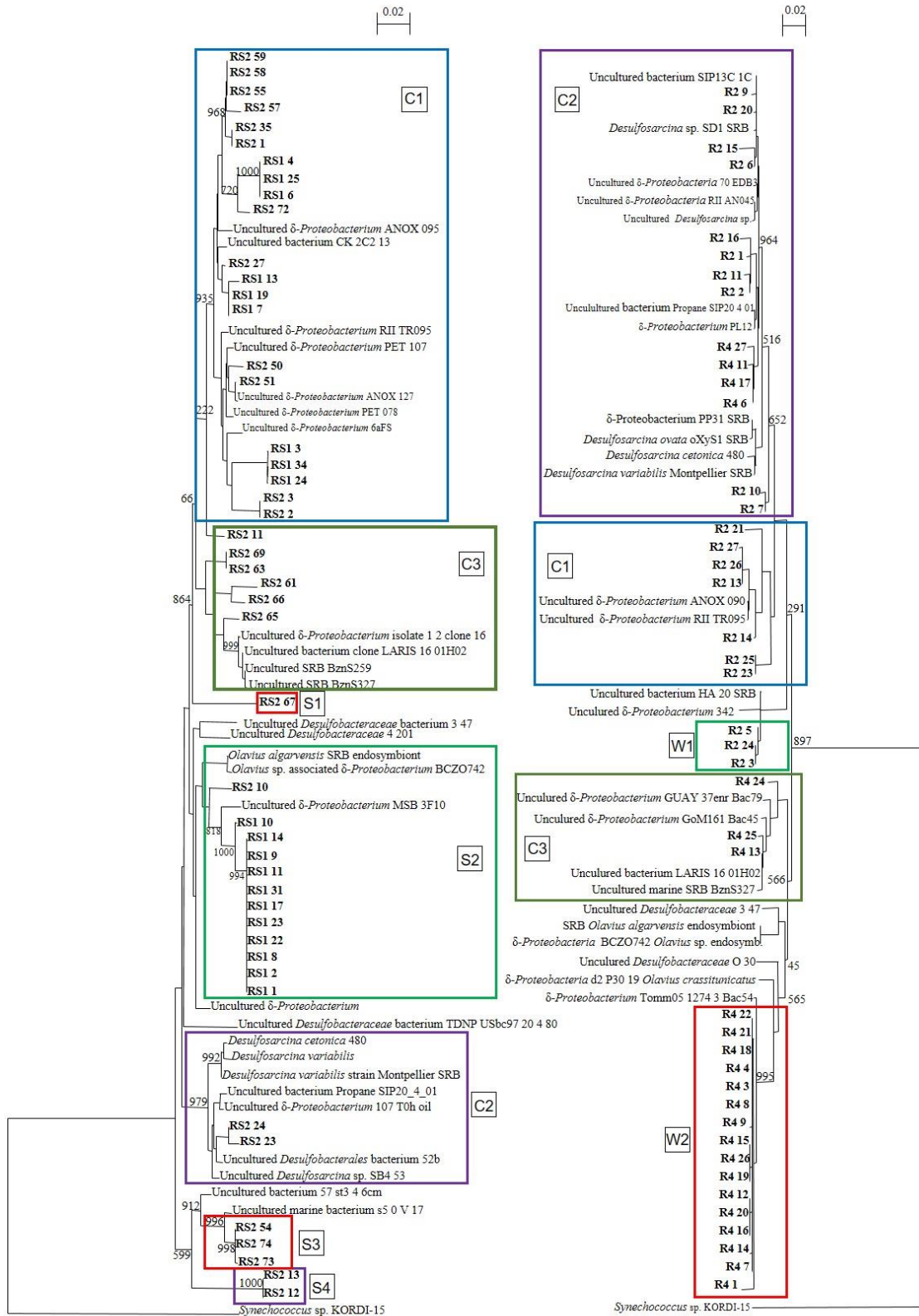
Filogenetska pripadnost SRB detektiranih u vodenom stupcu prikazana je na Slici 9. Sekvence klonova označene kao skupina S1a predstavljaju najbrojniju populaciju koja je bila prisutna isključivo u vodenom stupcu (kemoklini i monimolimnionu) tijekom ljetne sezone, a pripada do sada nekultiviranim članovima razreda *Deltaproteobacteria*. Populacija S1b, koja je filogenetski također najbližnja nekultiviranim članovima razreda *Deltaproteobacteria*, manje je brojna te je ograničena samo na monimolimnion, kao i populacija S5, koja se filogenetski grupirala s bakterijama iz roda *Clostridium* (koljeno *Firmicutes*). Sekvence označene kao skupina S3, pronađeni su u oba sloja vodenog stupca u ljetnoj sezoni, a pokazale su srodnost s SRB *Desulfomicrobium baculatum*. Sekvence grupirane u populaciju S4, karakteristične za monimolimnion, filogenetski su vrlo specifične, sa sličnošću od svega 85% s bakterijama iz roda *Desulfomicrobium*.

Filogenetska pripadnost SRB detektiranih u sedimentu prikazana je na Slici 10. Rezultati su ukazali da tijekom zimske sezone najveći broj sekvenci, označenih kao populacija W2, pokazuje sličnost s nekultiviranim bakterijama iz razreda *Deltaproteobacteria*, no ove sekvence su se filogenetski pokazale različitim od onih pronađenih u ljetnoj sezoni. U zimskoj sezoni također su pronađene karakteristične populacije filogenetski najbližnje SRB iz roda *Desulfobacterales/Desulfosarcina* (W1), te rodovima *Desulfobacterium* (W3) i *Desulfovibrio* (W4). Svega jedna sekvenca iz zimske sezone pokazala je sličnost s bakterijama iz koljena *Verrucomicrobia* (W5).

Populacija C1, koja je pokazala najveću sličnost s nekultiviranim bakterijama iz razreda *Deltaproteobacteria* bila je brojnija u ljetnoj nego u zimskoj sezoni, za razliku od populacije označene kao C2, s većim brojem sekvenci pronađenim tijekom zime koje su pokazale filogenetsku sličnost s rodom *Desulfosarcina*. Obje populacije bile su prisutne u oba sloja sedimenta. Populacija označena kao C3, čiji su predstavnici također identificirani kao nekultivirane bakterije iz razreda *Deltaproteobacteria*, bila je najslabije zastupljena populacija u obje sezone i ograničena na samo donji sloj sedimenta. Za razliku od toga, S2 i W1 populacija su se pokazale karakterističnim isključivo za gornji sloj sedimenta i obje su bile brojnije tijekom ljetne sezone. Sekvence grupirane u populacije označene s S3 i S4 pronađene su isključivo u donjem sloju sedimenta i to tijekom ljetne sezone, a u NCBI bazi podataka identificirane su samo kao nekultivirane morske bakterije koje nisu imale predstavnika roda. Najveći broj sekvenci u zimskoj sezoni pridružen je nekultiviranim pripadnicima razreda *Deltaproteobacteria* (populacija W2).



Slika 9. Filogenetska stabla SRB dobivena na temelju identificiranih sekvenci 16S rRNA gena iz uzoraka kemokline i monimolimniona ljeti (lijevo) i zimi (desno) 2014. godine. Horizontalne linije predstavljaju genetsku udaljenost. Sekvence iz ovog rada označene su podebljanim znakovima. Različito obojani pravokutnici označavaju različite populacije. S-populacije koje odgovaraju ljetnoj sezoni; W-populacije koje odgovaraju zimskoj sezoni; C-populacije prisutne u obje sezone.



Slika 10. Filogenetska stabla SRB dobivena na temelju identificiranih sekvenci 16S rRNA gena iz uzoraka sedimenta ljeti (lijevo) i zimi (desno) 2014. godine. Horizontalne linije predstavljaju genetsku udaljenost. Sekvence iz ovog rada označene su podebljanim znakovima. Različito obojani pravokutnici označavaju različite populacije. S-populacije koje odgovaraju ljetnoj sezoni; W-populacije koje odgovaraju zimskoj sezoni; C-populacije prisutne u obje sezone.

4.3. Raznolikost sulfat-reducirajućih bakterija

Sekvence dobivene iz uzoraka vodenog stupca (kemokline i monimolimniona) mogu se svrstati u tri glavne filogenetske skupine, *Deltaproteobacteria*, *Verrucomicrobia* i *Firmicutes*. Najveća raznolikost unutar zajednice zabilježena je tijekom zimske sezone u monimolimnionu jezera kada su sekvence s obzirom na sličnost od 97% grupirane u 12 OTU-a, od kojih je većina pripadala razredu *Deltaproteobacteria* (s homologijom od 90 – 91%), nakon kojih slijede skupine *Desulfovibrionales* (homologija 91 – 96%), *Desufosarcina* (homologija 91%), *Desulfobacterium* (s homologijom od 93 – 94%) i *Verrucomicrobia* (homologija 91%). Manja raznolikost unutar klonskih knjižnica zabilježena je u ljetnoj sezoni sa 6 definiranih OTU-a u kemoklini i 7 OTU-a u monimolimnionu.

Sekvence dobivene iz uzoraka sedimenta filogenetski su se razlikovale od onih iz vodenog stupca te su općenito pokazale veću homologiju sa sekvencama u NCBI bazi podataka. U zimskoj sezoni sekvence su grupirane u 3 OTU u oba sloja sedimenta, dok su tijekom ljeta SRB u gornjem sloju formirale 4, a u donjem sloju 7 OTU-a. Kao i u uzorcima vodenog stupca, većina sekvenci iz uzoraka sedimenta pripadala je nekultiviranim bakterijama iz razreda *Deltaproteobacteria* (Tablica 5).

Tablica 5. Filogenetska pripadnost, broj OTU-a i homologija sekvenci 16S rRNA gena SRB u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera.

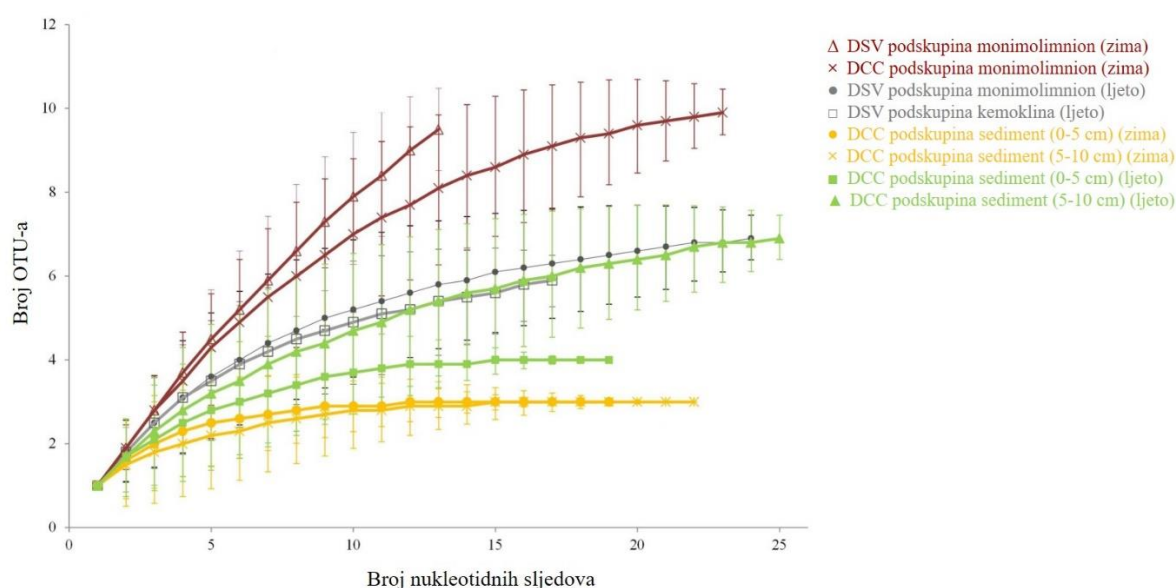
UZORAK	FILOGENETSKA PRIPADNOST ^a	Broj OTU ^b	Broj klonova	Homologija (%) ^c
Kemoklina (ljetno)	Nekultivirane <i>δ-Proteobacteria</i>	5	13	93-97
	<i>δ-Proteobacteria</i> / <i>Desulfovibrionales</i> <i>Desulfomicrobium baculatum</i>	1	6	99
	<i>δ-Proteobacteria</i> / <i>Desulfovibrionales</i> <i>Desulfomicrobium baculatum</i>	1	4	99
Monimolimnion (ljetno)	<i>δ-Proteobacteria</i> / <i>Desulfovibrionales</i> <i>Desulfomicrobium</i>	1	3	85
	Nekultivirane <i>δ-Proteobacteria</i>	4	16	94-95
	<i>Firmicutes</i> / <i>Clostridium</i>	1	3	96
Monimolimnion (zima)	<i>δ-Proteobacteria</i> <i>Desulfovibrionales</i> / <i>Desulfovibrio</i>	3	5	91-96
	<i>δ-Proteobacteria</i> / <i>Desulfosarcina</i>	1	9	91
	<i>δ-Proteobacteria</i> / <i>Desulfobacterium</i>	2	6	93-94
	<i>Verrucomicrobia</i>	1	1	91
	Nekultivirane <i>δ-Proteobacteria</i>	5	17	90-98

Tablica 5 - nastavak

UZORAK	FILOGENETSKA PRIPADNOST ^a	Broj OTU ^b	Broj klonova	Homologija (%) ^c
Sediment (0-5 cm) (ljetno)	Nekultivirane δ - <i>Proteobacteria</i>	4	20	98-99
Sediment (5-10 cm) (ljetno)	<i>Desulfosarcina</i> / <i>Desulfobacterales</i>	1	2	98
	<i>Desulfobacteraceae</i>	1	13	98-99
	Nekultivirane δ - <i>Proteobacteria</i>	3	7	98-99
Sediment (0-5 cm) (zima)	Nekultivirane morske bakterije	2	5	93-99
	Nekultivirane δ - <i>Proteobacteria</i>	2	10	97-98
Sediment (5-10 cm) (zima)	<i>Desulfosarcina</i> / <i>Desulfobacterales</i>	1	10	97-99
	Nekultivirane δ - <i>Proteobacteria</i>	2	19	98-99
Sediment (5-10 cm) (zima)	<i>Desulfosarcina</i> / <i>Desulfobacterales</i>	1	4	99

^a – pripadnost sekvenci 16S rRNA gena prema filogenetskim stablima (Slike 9 i 10); ^b – OTU formirane na temelju sličnosti od 97%; ^c – Homologija određena prema NCBI bazi podataka

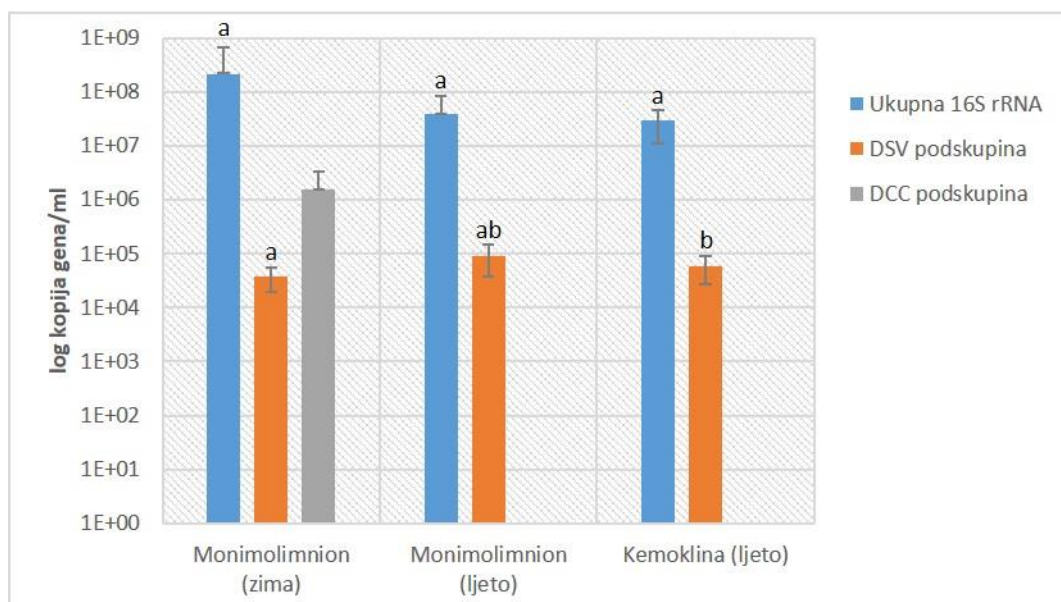
Na temelju definiranog broja OTUs izrađene su rarefakcijske krivulje. Iz Slike 11 je vidljivo da rarefakcijske krivulje za vodeni stupac nisu dosegle zasićenje, stoga broj dobivenih nukleotidnih sljedova nije bio dovoljan kako bi se opisala cjelokupna raznolikost unutar zajednice vodenog stupca. Krivulje su ukazale da je uzorkovanjem pokrivena raznolikost samo u uzorcima sedimenta u ljetnoj sezoni te u gornjem sloju sedimenta u zimskoj sezoni (Slika 11), što upućuje na sezonske razlike u raznolikosti unutar zajednice, kao i na razlike između različitih slojeva u jezeru.



Slika 11. Rarefakcijske krivulje SRB dobivene na temelju nukleotidnih sljedova 16S rRNA gena iz kemokline, monimolimniona i sedimenta Rogozničkog jezera. Vertikalne linije predstavljaju standardnu devijaciju.

4.4. Brojnost ukupnih i sulfat-reducirajućih bakterija

Korištenjem 16S rRNA gena kao genskog markera, upotrebom metode kvantitativnog PCR-a (qPCR), određena je i brojnost ukupnih bakterija te detektiranih DCC i DSV filogenetskih podskupina SRB (Slika 12), izraženih kao broj kopija gena po ml ili gramu sedimenta. Efikasnost provedenih qPCR eseja za ukupne bakterijske 16S rRNA gene iznosila je 101,78% ($R^2=0,99$; $y= -3,29$), za DCC 89,91% ($R^2=0,99$; $y=-3,59$) te za DSV 81,35% ($R^2=0,99$; $y=-3,86$). Brojnost ukupnih bakterija u vodenom stupcu tijekom zimske sezone prosječno je iznosila $2,18 \times 10^8 \pm 4,6 \times 10^8$ kopija gena/ml, dok se brojnost u ljetnoj sezoni kretala od $2,9 \times 10^7 \pm 1,77 \times 10^7$ kopija gena/ml u sloju kemokline do $3,89 \times 10^7 \pm 4,26 \times 10^7$ kopija gena/ml u monimolimnionu jezera. Kruskal-Wallisov test nije pokazao statistički značajne ($p > 0,05$) razlike u bakterijskoj brojnosti između različitih uzoraka i sezona (Slika 12)..

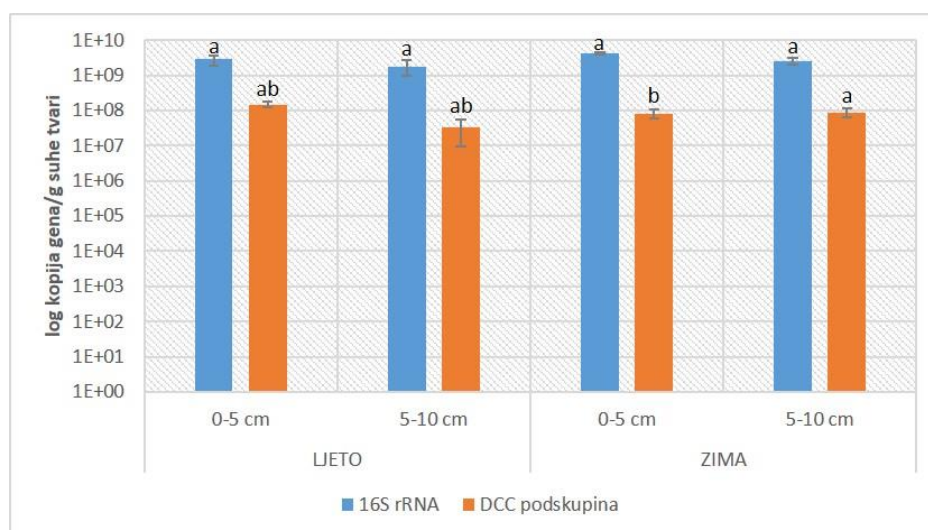


Slika 12. Broj kopija 16S rRNA gena ukupnih bakterija i SRB (DSV i DCC filogenetskih podskupina) u uzorcima vodenog stupca Rogozničkog jezera tijekom zime i ljeta 2014. godine. Ista slova označavaju uzorke među kojima nema značajne statističke razlike ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallisovom testu. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju.

qPCR analiza je nadalje pokazala da DSV i DCC podskupine SRB čine mali dio ukupne bakterijske zajednice u vodenom stupcu jezera. Brojnost DSV podskupine u zimskoj sezoni iznosila je $3,68 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^4$ kopija gena/ml, odnosno 0,02% ukupnih bakterijskih 16S rRNA gena, dok je DCC podskupina, koja se u vodenom stupcu bila zastupljena samo u zimskoj sezoni, bila brojnija s $1,56 \times 10^6 \pm 1,69 \times 10^6$ kopija gena/ml i sačinjavala je 0,7% ukupne bakterijske zajednice (Slika 12). Tijekom ljeta broj gena specifičnih za DSV podskupinu bio je podjednako zastupljen u kemoklini ($5,83 \times 10^4 \pm 3,16 \times 10^4$ kopija gena/ml) i monimolimnionu

($9,18 \times 10^4 \pm 5,36 \times 10^4$ kopija gena/ml), čineći 0,2%, odnosno 0,23% ukupnih bakterijskih 16S rRNA gena. Statistički su se značajno ($p < 0,05$) razlikovali samo uzorci kemokline u ljetnoj i uzorci monimolimniona u zimskoj sezoni.

U uzorcima sedimenta broj ukupnog bakterijskog 16S rRNA gena nije se značajno ($p > 0,05$) razlikovao po sezonama niti kroz vertikalni profil (Slika 13). U gornjem sloju (0 – 5 cm) sedimenta detektirano je nešto više bakterija, s brojem kopija gena/g suhe tvari u ljetnoj sezoni od $2,87 \times 10^9 \pm 2,65 \times 10^8$ do $4,21 \times 10^9 \pm 7,99 \times 10^8$ kopija gena/g suhe tvari u zimskoj sezoni. U donjem sloju (5 – 10 cm) sedimenta tijekom ljeta zabilježeno je $1,79 \times 10^9 \pm 5,68 \times 10^8$ kopija gena/g suhe tvari, a tijekom zime $2,54 \times 10^9 \pm 9,85 \times 10^8$ kopija gena/g suhe tvari. Kruskal-Wallisov test pokazao je da brojnost DCC podskupine u sedimentu također značajno ($p > 0,05$) ne varira među sezonama, međutim statističke razlike ($p < 0,05$) su nađene tijekom ljeta između gornjeg (0 – 5 cm) i donjeg (5 – 10 cm) sloja sedimenta. U gornjem sloju sedimenta u ljetnoj sezoni detektirano je $1,5 \times 10^8 \pm 2,11 \times 10^6$ kopija gena/g suhe tvari (5,22% od ukupne bakterijske zajednice), a u donjem sloju $3,32 \times 10^7 \pm 7,82 \times 10^6$ kopija gena/g suhe tvari (1,86%). Tijekom zime DCC podskupina činila je 1,95% zajednice u gornjem sloju sedimenta ($8,2 \times 10^7 \pm 5,67 \times 10^6$ kopija gena/g suhe tvari), te 3,52% u donjem sloju ($8,95 \times 10^7 \pm 7,88 \times 10^6$ kopija gena/g suhe tvari).

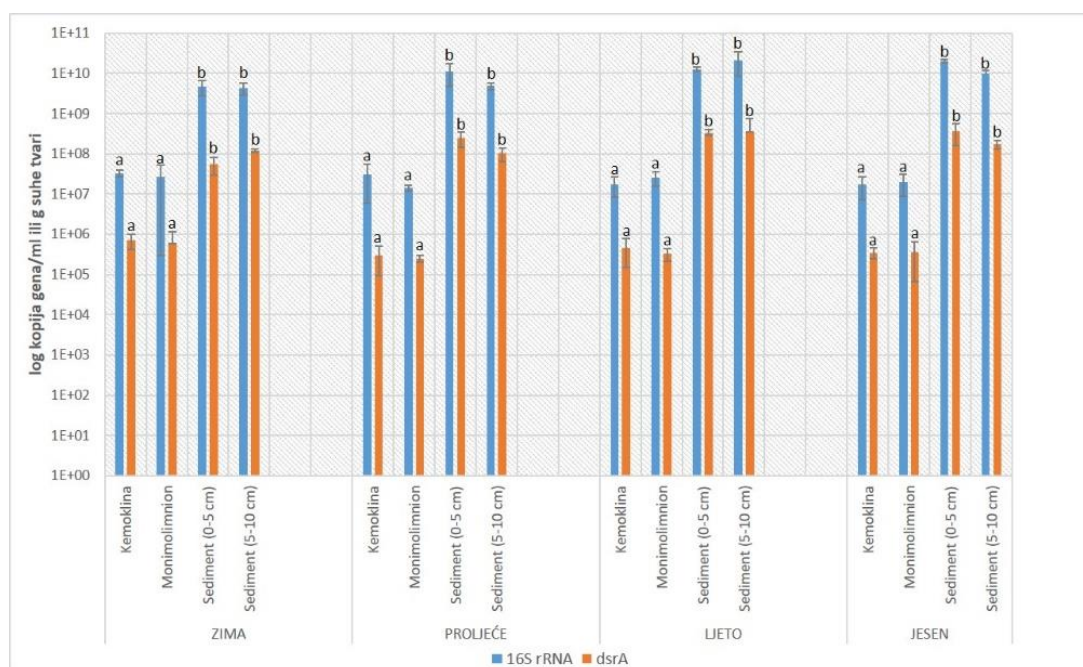


Slika 13. Broj kopija 16S rRNA gena ukupnih bakterija i DCC filogenetske podskupine SRB u uzorcima gornjeg (0 – 5 cm) i donjeg (5 – 10 cm) sloja sedimenta Rogozničkog jezera tijekom zime i ljeta 2014. godine. Ista slova označavaju uzorke među kojima nema značajne statističke razlike ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallisovom testu. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju.

U uzorcima iz 2015. godine, brojnost SRB utvrđena je na temelju funkcionalnog *dsrA* gena, a brojnost ukupnih bakterija na temelju 16S rRNA kao genskog markera. Efikasnost qPCR eseja iznosila je 107,23% ($R^2=0,99$; $y=-3,16$) za gen *dsr* te $E=94,54\%$ ($R^2=0,99$; $y=-3,46$) za 16S rRNA gen.

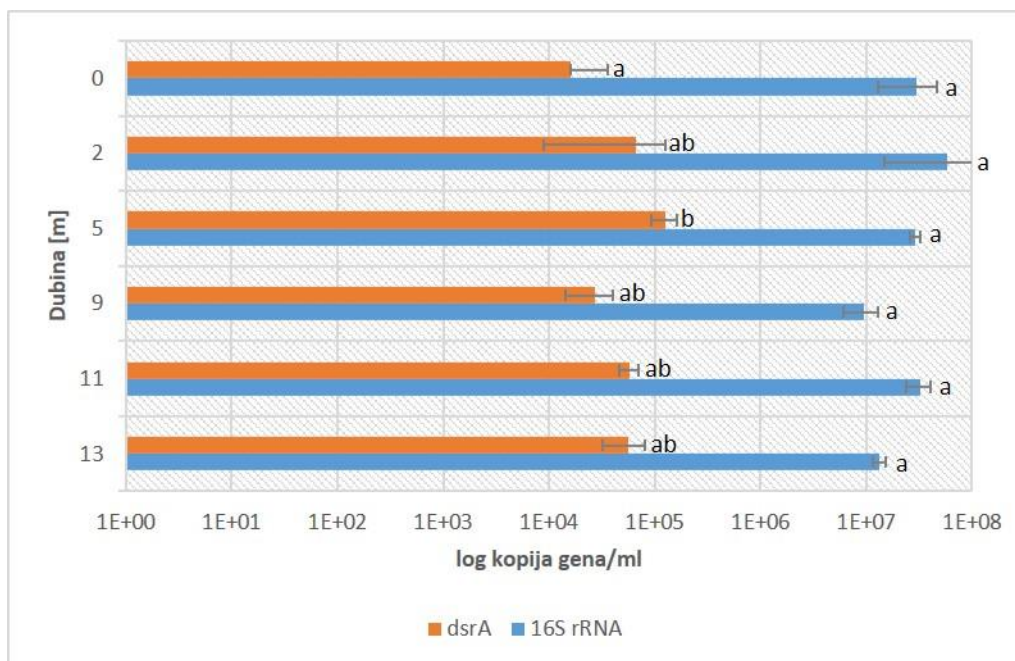
Rezultati prikazani na Slici 14 pokazuju da tijekom godine brojnost ukupnih bakterija nije statistički značajno ($p>0,05$) varirala, ali je značajno veći broj bakterija ($p<0,05$) a utvrđen u sedimentu nego u uzorcima vodenog stupca. U sloju kemokline brojnost ukupnih bakterija kretala se od $1,73 \times 10^7 \pm 9,93 \times 10^6$ kopija gena/ml u jesenskoj do $3,3 \times 10^7 \pm 6,55 \times 10^6$ kopija gena/ml u zimskoj sezoni. U monimolimnionu je najmanja brojnost utvrđena u proljeće ($1,44 \times 10^7 \pm 2,48 \times 10^6$ kopija gena/ml), a najveća u zimi ($2,66 \times 10^7 \pm 12,63 \times 10^6$ kopija gena/ml). Brojnost ukupnih bakterija u sedimentu je bila najveća tijekom jeseni ($2,01 \times 10^{10} \pm 1,85 \times 10^9$ kopija gena/g suhe tvari u gornjem i $9,73 \times 10^9 \pm 2,33 \times 10^9$ kopija gena/g suhe tvari u donjem sloju), a najniža tijekom zime ($4,65 \times 10^9 \pm 1,91 \times 10^9$ kopija gena/g suhe tvari u gornjem i $4,33 \times 10^9 \pm 1,38 \times 10^9$ kopija gena/g suhe tvari u donjem sloju).

Brojnost SRB, temeljna na broju kopija funkcionalnog *dsrA* gena, nije se značajno mijenjala tijekom godine, a vrijednosti su bile statistički značajno veće ($p<0,05$) u sedimentu nego u vodenom stupcu (Slika 14). U kemoklini su se ove vrijednosti kretale od $3,04 \times 10^5 \pm 2,13 \times 10^5$ kopija gena/ml u proljeće, do $7,12 \times 10^5 \pm 2,98 \times 10^5$ kopija gena/ml u zimu, čineći 0,99% odnosno 2,16% ukupnih bakterijskih zajednica. U monimolimnionu je udio SRB iznosio 1,27% tijekom ljeta ($3,26 \times 10^5 \pm 1,13 \times 10^5$ kopija gena/ml), a najveći udio od 2,17% zabilježen je tijekom zime ($5,77 \times 10^5 \pm 6,0 \times 10^5$ kopija gena/ml). U gornjem sloju sedimenta SRB su najbrojnije bile u jesen ($3,58 \times 10^8 \pm 2,0 \times 10^8$ kopija gena/g suhe tvari) kada su sačinjavale 2,66% zajednice, a najmanja brojnost zabilježena je zimi ($5,54 \times 10^7 \pm 2,6 \times 10^7$ kopija gena/g suhe tvari) kada su sačinjavale 1,19% zajednice. Suprotno tome, u donjem sloju sedimenta najveći udio od 2,8% SRB bio je tijekom zime ($1,21 \times 10^8 \pm 1,32 \times 10^7$ kopija gena/g suhe tvari), a najmanji u ljeto kad su sačinjavale 1,61% zajednice ($3,40 \times 10^8 \pm 3,99 \times 10^8$ kopija gena/g suhe tvari).



Slika 14. Broj kopija 16S rRNA gena i *dsrA* gena u uzorcima kemokline, monimolimniona, te gornjeg (0 – 5 cm) i donjeg (5 – 10 cm) sloja sedimenta Rogozničkog jezera tijekom 2015. godine. Ista slova označavaju uzorke među kojima nema značajne statističke razlike ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallisovom testu. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju.

Analiza zajednica qPCR-om tijekom holomiksije ($E=94,54\%$; $R^2=0,99$; $y = -3,46$) ukazala je da brojnost ukupnih bakterija značajno ne odstupa (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) na uzorkovanim dubinama te se bitno ne razlikuje od one zabilježene u vodenom stupcu tijekom stratifikacije. Kretala se od $9,55 \times 10^6 \pm 3,52 \times 10^6$ kopija gena/ml na dubini od 9 m do maksimalnih $5,82 \times 10^7 \pm 5,77 \times 10^4$ kopija gena/ml na 2 m dubine (prosječno $2,87 \times 10^7 \pm 1,72 \times 10^7$ kopija gena/ml) (Slika 15). Brojnost SRB određena na temelju *dsrA* gena u qPCR reakciji ($E=104,44\%$; $R^2=0,99$; $y = -3,22$) kretala se od $1,62 \times 10^4 \pm 1,95 \times 10^4$ kopija gena/ml na površini (0 m) do najviših $1,26 \times 10^5 \pm 3,41 \times 10^4$ kopija gena/ml (prosječno $5,85 \times 10^4 \pm 3,84 \times 10^4$ kopija gena/ml). Statistički su se znatno razlikovali (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) samo uzorci površine od onih na 5 m dubine. Iako je tijekom holomiksije cijeli vodeni stupac bio anoksičan, SRB su činile manji udio nego u kemoklini i monimolimnionu tijekom stratifikacije, koji se kretao od 0,05% (0 m) do 0,43% (5 m) u ukupnim bakterijskim zajednicama (prosječno $0,25 \pm 0,15\%$).



Slika 15. Brojnost ukupnih bakterijskih 16S rRNA gena i *dsrA* gena u uzorcima Rogozničkog jezera tijekom holomiksije. Ista slova označavaju uzorke među kojima nema značajne statističke razlike ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallisovom testu. Horizontalne linije označavaju standardnu devijaciju.

4.5. Taksonomska struktura i raspodjela prokariotskih zajednica tijekom stratifikacije

Filogenetskim pridruživanjem nukleotidnih sljedova 16S rRNA gena sekvenciranih metodom nove generacije, dobivena je taksonomsku strukturu bakterijskih i arhejskih zajednica (Slika 16). Među sekvencama transkriptoma (cDNA) domeni *Bacteria* pridruženo je >97% sekvenci iz uzoraka vodenog stupca (kemokline i monimolimniona), te >91% sekvenci iz uzoraka sedimenta. Arheje su sačinjavale <1% zajednice u kemoklini tijekom svih sezona, a njihov udio u monimolimnionu kretao se od 0,5% u jesen do 2,3% u proljeće (prosječno $1,2 \pm 0,8\%$). U sedimentu arhejama je pripadalo 8% sekvenci u ljetnoj sezoni, dok je maksimum od 17,2% zabilježen tijekom zime (prosječno $13,3 \pm 3,8\%$). Udio neklasificiranih bakterija rastao je s dubinom i kretao se od 3,8% (zima) do 6% (jesen) (prosječno $4,75 \pm 0,9\%$) u sloju kemokline, od 8,3% (ljetno) do 16,5% (proljeće) (prosječno $13,4 \pm 3,7\%$) u monimolimnionu, dok je najveći udio neklasificiranih bakterija pronađen u sedimentu, a kretao se od 47,5% tijekom proljeća do 57,4% tijekom jeseni (prosječno $52,1 \pm 4,1\%$). Neklasificirane arheje činile su 5,8% zajednice sedimenta u zimskoj sezoni do 10,5% u ljetnoj sezoni (prosječno $8,5 \pm 2,2\%$).

Sve taksonomski pridružene sekvence arheja iz uzoraka vodenog stupca pripadale su koljenu *Euryarchaeota*. Ovo koljeno u sedimentu je sačinjavalo 96,8% arhejske zajednice u jesen,

odnosno 98,4% zajednice tijekom ljeta (prosječno $97,9 \pm 0,75\%$). Ostatak je pripadao razredu *Thermoprotei*, čiji se udio kretao od 1,5% tijekom zime do 3,2% u jesen (prosječno $2,1 \pm 0,75$). Među bakterijskim sekvencama koljeno *Proteobacteria* dominiralo je kemoklinom, monimolimnionom i sedimentom jezera tijekom svih sezona, nakon kojeg slijedi koljeno *Bacteroidetes* i *Chloroflexi*. Ostala koljena bila su zastupljena s <1% efektivnih sekvenci. U sloju kemokline koljenu *Proteobacteria* pripadalo je 80,7% sekvenci u jesen do 90,3% sekvenci u zimskim uzorcima (prosječno $87,4 \pm 5,1\%$). U monimolimnionu, tijekom zime 49,3% zajednice pripadalo je koljenu *Proteobacteria*, dok se u ljetnoj sezoni taj udio povećao na 74,4% (prosječno $60,8 \pm 10,7\%$). U uzorcima sedimenta udio *Proteobacteria* kretao se od 24,8% tijekom jeseni, do 28,6% tijekom proljeća, s prosjekom od $26,9 \pm 1,7\%$. Relativna brojnost koljena *Bacteroidetes* u kemoklini je iznosila 1,6% u zimskoj do 8,3% u jesenskoj sezoni (prosječno $4,35 \pm 2,8\%$), a najviše vrijednosti zabilježene su u monimolimnionu gdje su se kretale od 10,8% tijekom ljeta do 22,2% tijekom zime (prosječno $16,5 \pm 5\%$). U sedimentu, koljeno *Bacteroidetes* je činilo malu frakciju aktivne zajednice od 1,6% tijekom jeseni do 3,2% u zimskoj sezoni (prosječno $2,5 \pm 0,8\%$). Članovi koljena *Chloroflexi* nisu detektirani u kemoklini, a u monimolimnionu su sačinjavali 3,2% zajednice u ljeto, te 6,1% u zimi (prosječno $5,0 \pm 1,3\%$). Manja zastupljenost koljena *Chloroflexi* zabilježena je u sedimentu, a kretala se od 0,7% u jesen do 5,3% tijekom zime (prosječno $2,5 \pm 2,0\%$).

Kako bi se dobio detaljniji uvid u strukturu zajednica, nukleotidni sljedovi grupirani su na taksonomski nivo razreda. Najbrojnije sekvence uzoraka cDNA iz sloja kemokline pripadale su razredu *Gammaproteobacteria* gdje su sačinjavale od 70,4% zajednice tijekom jeseni do 83,1% u ljetnoj sezoni (prosječno $77,0 \pm 5,5\%$). U monimolimnionu, 8,4% sekvenci u zimskoj, te 54,3% u ljetnoj sezoni bilo je pridruženo razredu *Gammaproteobacteria*, dok su dio dominantnih (>1%) skupina u sedimentu bile samo tijekom proljeća s relativnom brojnošću od 1,14%. Zanimljivo, razred *Gammaproteobacteria* sačinjavala je isključivo porodica *Chromatiaceae*.

Razred *Deltaproteobacteria* (većinu kojeg je sačinjavala porodica *Desulfobacteraceae*) druga je najbrojnija taksonomska skupina. U uzorcima kemokline tijekom zime njihov udio u ukupnoj zajednici bio je 0,9%, a u jesen je taj udio porastao na 3,2% (prosječno $2,24 \pm 1,0\%$). Najveća relativna brojnost *Deltaproteobacteria* zabilježena je u monimolimnionu jezera, a kretala se od 7,4% (ljeto) do 24,8% (jesen) s prosjekom od $16,7 \pm 8,7\%$, dok je u sedimentu njihov udio bio 8,2% tijekom jeseni do 15,2% tijekom proljeća (prosječno $12,3 \pm 3,1$). Porodica *Anaerolinaceae* dominantan dio zajednice činila je samo u monimolimnionu i sedimentu jezera. U monimolimnionu je 3,2% sekvenci ljetne sezone i 5,9% jesenske sezone pridruženo ovom

razredu (prosječno $4,9 \pm 1,3\%$), a u sedimentu od $0,5\%$ (ljetno) do $4,5\%$ (zimno) s prosjekom od $2,4 \pm 1,8\%$. Ostali razredi koji su u barem jednom uzorku bili zastupljeni s $>1\%$ bili su *Alphaproteobacteria* ($7,8\%$ u kemoklini tijekom zime, te $1,7\%$ u zimskom uzorcima monimolimniona), te *Planctomycetia* (do 2% u monimolimnionu tijekom zimске sezone).

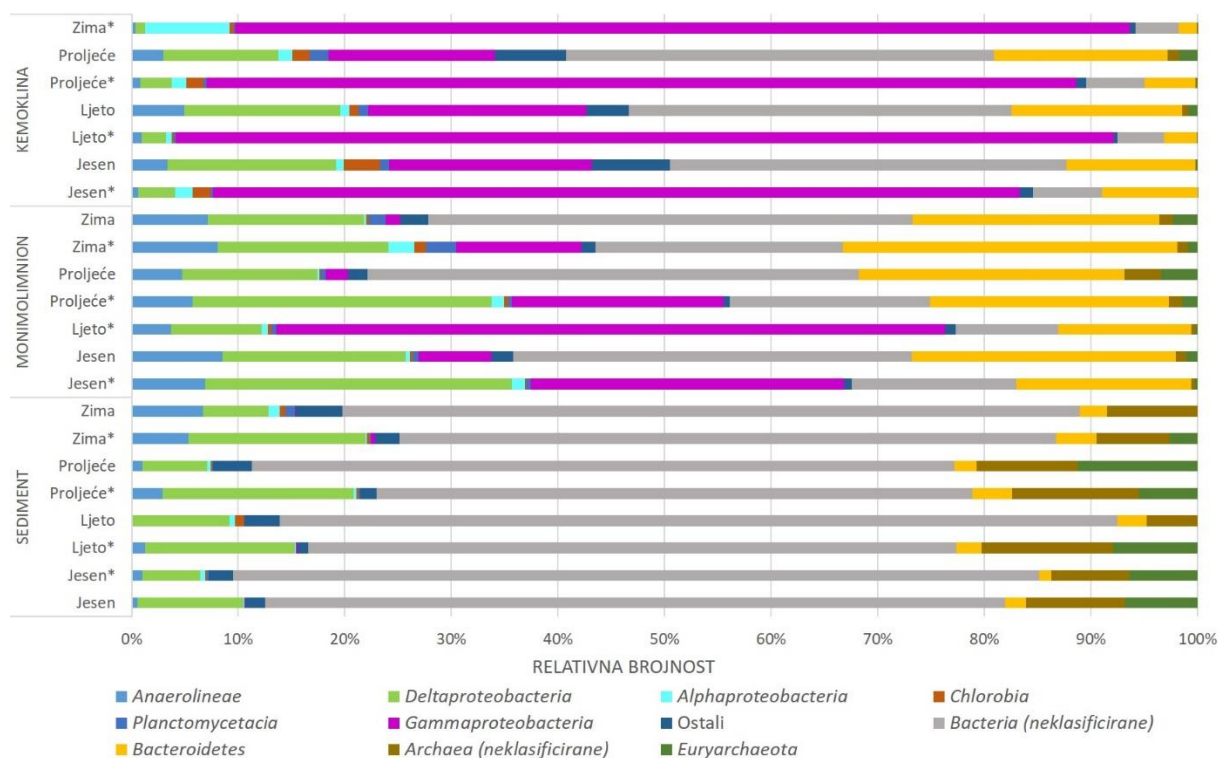
Sveukupno, najbrojnije uspješno klasificirane sekvence transkriptoma u jezeru pripadale su razredu *Gammaproteobacteria* (porodica *Chromatiaceae*) s udjelom od $8,3 - 83,1\%$ (prosječno $51,6 \pm 30,4$), nakon kojeg slijedi razred *Deltaproteobacteria* ($3,2 - 24,8\%$; prosječno $10,4 \pm 7,9\%$).

Struktura prokariotskih zajednica na temelju nukleotidnih sljedova DNA, bila je slična onoj na temelju transkriptoma (Slika 16). Domeni *Bacteria* također je pridruženo najviše sekvenci ($97,6 - 99,8\%$ iz uzoraka vodenog stupca), dok su u sedimentu činile $>90\%$ ukupnih sekvenci. Među bakterijama, razred *Gammaproteobacteria* dominirao je slojem kemokline s udjelom od $16,6\%$ tijekom jeseni do $18,4\%$ u ljetnoj sezoni (prosječno $16,1 \pm 2,5\%$), a u monimolimnionu jezera sačinjavao je od $1,2\%$ (zimno) do $6,5\%$ (jesen) s prosjekom od $3,2 \pm 2,8\%$. U kemoklini, drugi najbrojniji bio je razred *Deltaproteobacteria* kojem je pripadalo $9,2\%$ sekvenci u proljeće do $13,8\%$ u jesen (prosječno $12,1 \pm 2,5\%$). Relativna brojnost razreda *Deltaproteobacteria* u monimolimnionu iznosila je $12,0\%$ u proljetnoj i $16,2\%$ u jesenskoj sezoni (prosječno $14,0 \pm 2,1\%$). Najmanji udio od $3,3\%$ tijekom zime do $8,1\%$ tijekom ljeta (prosječno $5,3 \pm 2,0\%$) zabilježen je u sedimentu. Najveći broj DNA sekvenci iz uzoraka monimolimniona pridružen je razredu *Bacteroidetes*, koji je činio od $21,9\%$ u zimskoj do $23,5\%$ zajednica u proljetnoj sezoni. Relativna brojnost koljena *Bacteroidetes* u kemoklini iznosila je od $10,5 - 14,4\%$ u jesenskoj, odnosno ljetnoj sezoni (prosječno $12,9 \pm 2,1\%$), a u uzorcima sedimenta od $1,6\%$ tijekom jeseni do $3,2\%$ tijekom zime (prosječno $2,5 \pm 0,8\%$). Najveći udio porodice *Anaerolinaceae* u ukupnim prokariotskim zajednicama također je zabilježen u monimolimnionu jezera, a kretao se od $4,5\%$ tijekom proljeća do $8,0\%$ u jesen (prosječno $6,4 \pm 1,8\%$). U kemoklini je ovoj porodici pridruženo $2,5\%$ sekvenci u proljetnoj te $4,4\%$ u jesenskoj sezoni (prosječno $3,3 \pm 0,9\%$), a u sedimentu $0,5 - 4,5\%$ tijekom jesenske, odnosno zimске sezone (prosječno $2,1 \pm 1,8\%$).

Ostale bakterije koje su imale relativnu brojnost $>1\%$ barem u jednom uzorku, pripadale su razredu *Alphaproteobacteria* ($1,1\%$) i *Planctomycetia* ($1,5\%$) u proljetnoj sezoni. U nukleotidnim sljedovima uzoraka DNA, pronađen je međutim, veći udio neklasificiranih bakterija nego u transkriptomu. Od svih DNA sekvenci iz sloja kemokline $33,0 \pm 1,2\%$ nije bilo moguće taksonomski odrediti. Nemogućnost klasificiranja nukleotidnih sljedova bila je

izraženija u monimolimnionu ($40,5 \pm 4,6\%$), a posebice u uzorcima sedimenta gdje nije bilo moguće detaljno determinirati $>50\%$ sekvenci (prosječno $55,6 \pm 8,6\%$).

Svi nukleotidni sljedovi domene *Archaea*, iz uzoraka vodenog stupca pridruženi su koljenu *Euryarchaeota*, čiji je udio u ukupnoj prokariotskoj zajednici iznosio $0,1\%$ tijekom jeseni do $1,5\%$ tijekom proljeća u uzorcima kemokline (prosječno $0,8 \pm 0,6\%$), a u monimolimnionu od $1,0\%$ (jesen) do $3,2\%$ (proljeće) s prosjekom od $2,1 \pm 1,1\%$. Najveća relativna brojnost *Euryarchaeota* zabilježena je u uzorcima sedimenta i iznosila je $5,7\%$ u jesenskoj sezoni do $9,5\%$ u proljetnoj sezoni (prosječno $7,6 \pm 2,7\%$) uz vrlo mali udio pripadnika razreda *Thermoprotei* (koljeno *Crenarchaeota*) koji je u svim uzorcima iznosio $<1\%$. Prosječno $2,9 \pm 2,4\%$ arhejskih DNA sekvenci nije bilo moguće taksonomski klasificirati.



Slika 16. Taksonomska struktura i vertikalna raspodjela prokariotskih zajednica na taksonomskom nivou razreda (osim koljena *Bacteroidetes* i *Euryarchaeota*) u kemolini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera tijekom stratifikacije (2015. godine) na temelju nukleotidnih sljedova 16S rRNA gena. Uzorci DNA iz kemokline (zima) i monimolimniona (ljetno) izuzeti su iz analize zbog loše kvalitete sekvenci. Zvezdica (*) predstavlja transkriptom (cDNA uzorke). Sve svojste s relativnim udjelima $<1\%$ prikazane su kao „ostali“.

4.6. Taksonomska struktura i raspodjela prokariotskih zajednica tijekom holomiksije

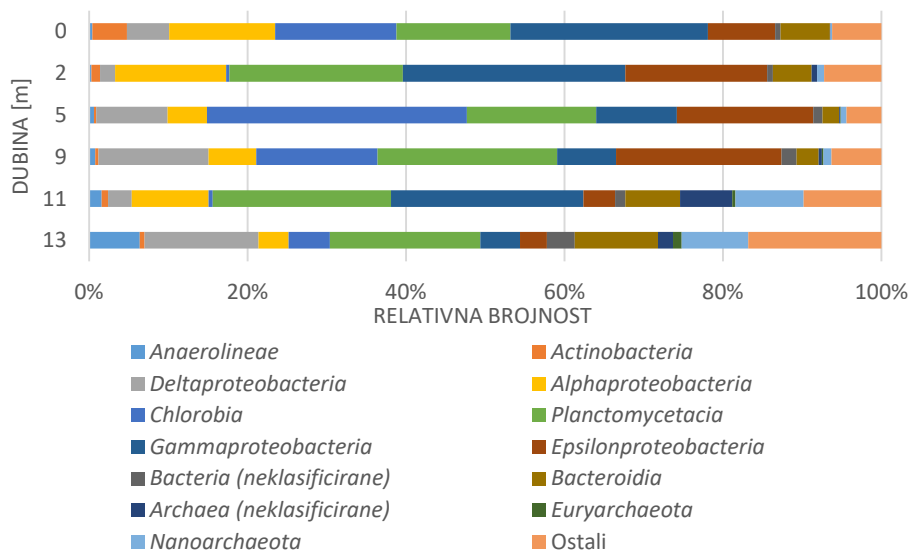
Tijekom holomiksije bakterije su također dominirale u svim uzorcima, čineći od 83,5% (11 m) do 99,4% (0 m) prokariotskih zajednica (prosječno $94,3 \pm 0,7\%$) (Slika 17). Interesantno, udio arheja u dubljim slojevima (11 i 13 m) je bio znatno veći nego u uzorcima sedimenta tijekom stratifikacije. Na dubini od 11 m arheje su činile 15,7%, a na dubini od 13 m 11,3% zajednice. Većina arhejskih nukleotidnih sljedova pridružena je koljenu *Woesearchaeota*, čiji pripadnici nisu bili detektirani tijekom stratifikacije. Ovom koljenu pripadalo je od 52,9% (11 m) do 75% (5 m) arhejskih sekvenci (prosječno $61,2 \pm 10\%$), a ostatak su sačinjavale taksonomski neklasificirane arheje uz manji doprinos *Euryarchaeota* (prosječno $8,94 \pm 5\%$ arhejskih sekvenci).

Među bakterijama tijekom holomiksije, kao i tijekom stratifikacije, dominiralo je koljeno *Proteobacteria* kojem je pridruženo od 23,4% (13 m) do 46,06% (0 m) sekvenci (prosječno $33,8 \pm 10,1\%$). Drugo najbrojnije koljeno bilo je *Planctomycetes*, kojem je pripadalo od 14,32% sekvenci u uzorcima površine (0 m) do 22,6% u uzorku s 9 m dubine (prosječno $19,5 \pm 3,5\%$), a slijedi ga koljeno *Bacteroidetes* s prosječnim udjelom od $17,5 \pm 10,7\%$ (od 7,71% u površinskom uzorku do 34,91% u uzorku s 5 m dubine). Četvrto najdominantnije koljeno bilo je *Epsilonbacteraeota* (prethodno razred *Epsilonproteobacteria*) s relativnom brojnošću od 3,4% na dubini od 13 m do 20,9% na dubini od 9 m (prosječno $11,8 \pm 7,5\%$). Ovo koljeno bilo je zastupljeno isključivo redom *Campylobacteriales*, a zanimljivo je da njihovi predstavnici nisu zabilježeni tijekom stratifikacije. Među koljenom *Proteobacteria*, razred *Gammaproteobacteria* bio je najbrojniji s relativnim udjelom od 5% na 13 m do najvećih 28,14% na dubini od 2 m (prosječno $16,7 \pm 10,2\%$). Nakon njega slijedi razred *Alphaproteobacteria* kojem je pridruženo od 6% (9 m) do 13,4% (0 m) nukleotidnih sljedova (prosječno $8,6 \pm 4,4\%$). Relativna brojnost razreda *Deltaproteobacteria* tijekom holomiksije je bila manja nego tijekom stratifikacije, a kretala se od 1,9% na dubini od 9 m do maksimalnih 14,4% na 13 m (prosječno $7,9 \pm 5,4\%$). Unutar koljena *Planctomycetia*, najviše nukleotidnih sljedova klasificirano je u razred *Planctomycetacia*, od 7,6% (2 m) do 16,3% (9 m), prosječno $11,9 \pm 3\%$ svih sekvenci i razred *Phycisphaerae*, s prosječnim udjelom od $5,2 \pm 2,8\%$ (3,3% na 5 m do 9,5% na 2 m dubine). Koljeno *Bacteroidetes* bilo je zastupljeno s dva razreda, od kojih je većina pripadala razredu *Chlorobia*, odnosno porodici *Chlorobiaceae* (0,4 – 32,8% na 2 i 5 m dubine) s prosječnim udjelom od $11,6 \pm 12,4\%$, a manje razredu *Bacteroidia* (2,1% na 5 m do 10,5% na 13 m dubine) s prosjekom od $5,6 \pm 3,1\%$ svih nukleotidnih sljedova.

Za razliku od stratificiranih uvjeta, kad je razred *Gammaproteobacteria* bio isključivo sačinjen od porodice *Chromatiaceae*, tijekom holomiksije većina predstavnika ovog razreda klasificirana je u porodicu *Thioglobaceae* (SUP05 klaster) (prosječno $7,7 \pm 7,3\%$ svih sekvenci), dok je porodica *Chromatiaceae* s udjelom $>1\%$ detektirana samo na 5 m (2,8%), 9 m (1,9%) i 13 m (1,6%) dubine (prosječno $1,3 \pm 1\%$). Među razredom *Deltaproteobacteria* dominirale su porodice *Desulfobulbaceae*, s prosječnim udjelom od $2,6 \pm 2,4\%$ i *Desulfobacteraceae* s prosječnim udjelom od $2,4 \pm 2,1\%$ u ukupnoj prokariotskoj zajednici.

Porodica *Rhodobacteraceae*, bila je najdominantnija unutar razreda *Alphaproteobacteria* s 11,4% udjela u površinskim uzorcima (0 m) i 2,7% u pridnom sloju (13 m) (prosječno $5,3 \pm 3,2\%$). Među redom *Campylobacterales* (koljeno *Epsilonbacteraeota*) bile su zastupljene tri porodice, *Arcobacteraceae* čija se relativna brojnost kretala od 1,9% u pridnom sloju do 15,6% na 9 m dubine (prosječno $9,9 \pm 6,6\%$), *Sulfurovaceae* s udjelom od 0,5% (2 i 11 m) do 3,9% (9m) (prosječno $1,5 \pm 1,3\%$), dok je najmanje zastupljena bila porodica *Thiovulaceae* koja je udio $>1\%$ imala samo u uzorcima s 5m (1,0%) i 9 m (1,4) dubine (prosječno $0,6 \pm 0,5\%$).

Ostale skupine koje su barem u jednom uzorku imale udio $>1\%$ su koljeno *Actinobacteria* s prosječnom brojnošću od $1,0 \pm 1,6\%$ i koljeno *Chloroflexi*, odnosno razred *Anaerolineae* (prosječno $1,7 \pm 2,4\%$). U uvjetima holomiksije udio neklasificiranih bakterija bio je znatno manji nego tijekom stratifikacije, a kretao se od 0,7% na površini i 2 m dubine do 3,5% na 13 m dubine (prosječno $1,6 \pm 1,0\%$).



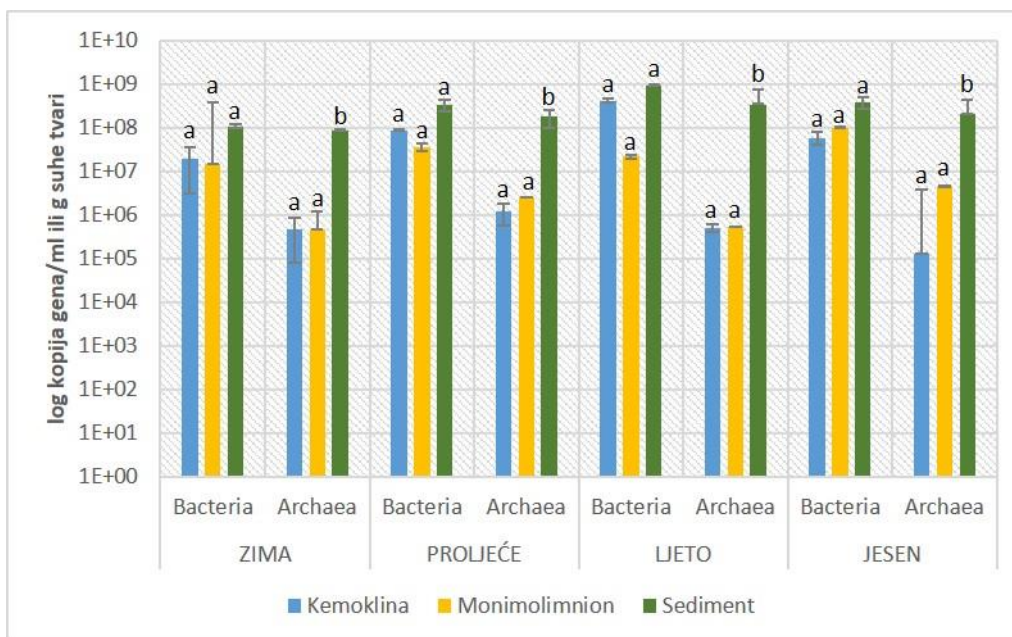
Slika 17. Taksonomska struktura i vertikalna raspodjela prokariotskih zajednica na taksonomskom nivou razreda (osim koljena *Euryarchaeota*) u Rogozničkom jezeru tijekom holomiksije na temelju nukleotidnih sljedova 16S rRNA gena. Sve svojste s relativnim udjelima $<1\%$ prikazane su kao „ostali“.

4.7. Brojnost prokariotskih 16S rRNA gena

Brojnost bakterijskih i arhejskih 16S rRNA gena (Slika 18) tijekom stratifikacije određena je qPCR metodom korištenje TaqMan[®] sonde s efikasnošću od 90,3% ($R^2=0,99$, $y= -3,55$) i 91% ($R^2=0,99$, $y= -3,53$) za bakterijske, odnosno arhejske gene. U sloju kemokline vidljiv je blagi trend porasta brojnosti bakterija od zimske ($1,93 \times 10^7 \pm 1,62 \times 10^7$ kopija gena/ml) prema ljetnoj sezoni ($4,23 \times 10^8 \pm 3,71 \times 10^7$ kopija gena/ml), s blagim padom u jesen ($5,95 \times 10^7 \pm 2,3 \times 10^6$ kopija gena/ml). Tijekom svih sezona brojnost bakterija u monimolimnionu bila je manja nego u kemoklini, a kretala se od $1,46 \times 10^7 \pm 2,88 \times 10^6$ kopija gena/ml zimi, do najviših $1,01 \times 10^8 \pm 4,42 \times 10^6$ kopija gena/ml u jesen. Broj bakterijskih 16S rRNA gena u sedimentu nije značajno ($p > 0,05$) odstupao od vodenog stupca, a pokazao je isti trend porasta od zimske prema ljetnoj sezoni kao i sloj kemokline. Brojnost bakterija u sedimentu tijekom zime iznosila je $8,89 \times 10^8 \pm 2,51 \times 10^7$ kopija gena/g suhe tvari, u ljeto je dosegla maksimum od $9,48 \times 10^8 \pm 4,3 \times 10^8$ kopija gena/g suhe tvari, s blagim padom u jesen ($3,87 \times 10^8 \pm 2,4 \times 10^8$ kopija gena/g suhe tvari).

Najmanji broj arhejskih 16S rRNA gena zabilježen je u kemoklini. Kretao se od $1,29 \times 10^5 \pm 2,95 \times 10^3$ kopija gena/ml tijekom jeseni do najviših $1,21 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^5$ kopija gena/ml u proljeće. U monimolimnionu brojnost arhejskih gena najvišu vrijednost dosegla je u jesen ($4,64 \times 10^6 \pm 1,59 \times 10^5$ kopija gena/ml), a minimum u zimu ($4,65 \times 10^5 \pm 6,58 \times 10^5$ kopija gena/ml). Značajno veći ($p < 0,05$) broj arhejskih gena zabilježen je u sedimentu u kojem je pokazao isti trend kao i broj bakterijskih gena. Najniža brojnost bila je tijekom zime ($8,89 \times 10^7 \pm 4,42 \times 10^6$ kopija gena/g suhe tvari) a najviša tijekom ljetne sezone ($3,45 \times 10^8 \pm 5,33 \times 10^7$ kopija gena/g suhe tvari).

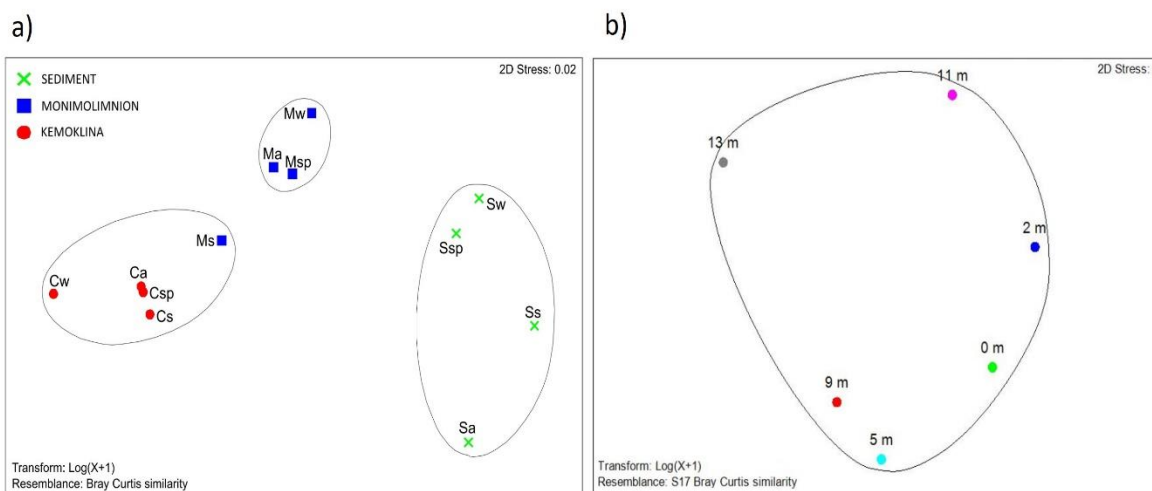
Prema Kruskal-Wallisovom testu, brojnost bakterijskih niti arhejskih 16S rRNA gena nije statistički značajno ($p > 0,05$) odstupala među sezonama. Međutim, statistički značajne ($p < 0,05$) razlike u prosječnom broju arhejskih gena zabilježene su između vodenog stupca (kemokline i monimolimniona) i sedimenta, dok bakterijski 16S rRNA geni nisu značajno ($p > 0,05$) odstupali duž vertikalnog profila.



Slika 18. Brojnost bakterijskih i arhejskih 16S rRNA gena tijekom 2015. godine u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera, određena qPCR metodom. Ista slova označavaju uzorke među kojima nema značajne statističke razlike ($p < 0,05$) prema Kruskal-Wallisovom testu. Vertikalne linije predstavljaju standardnu devijaciju.

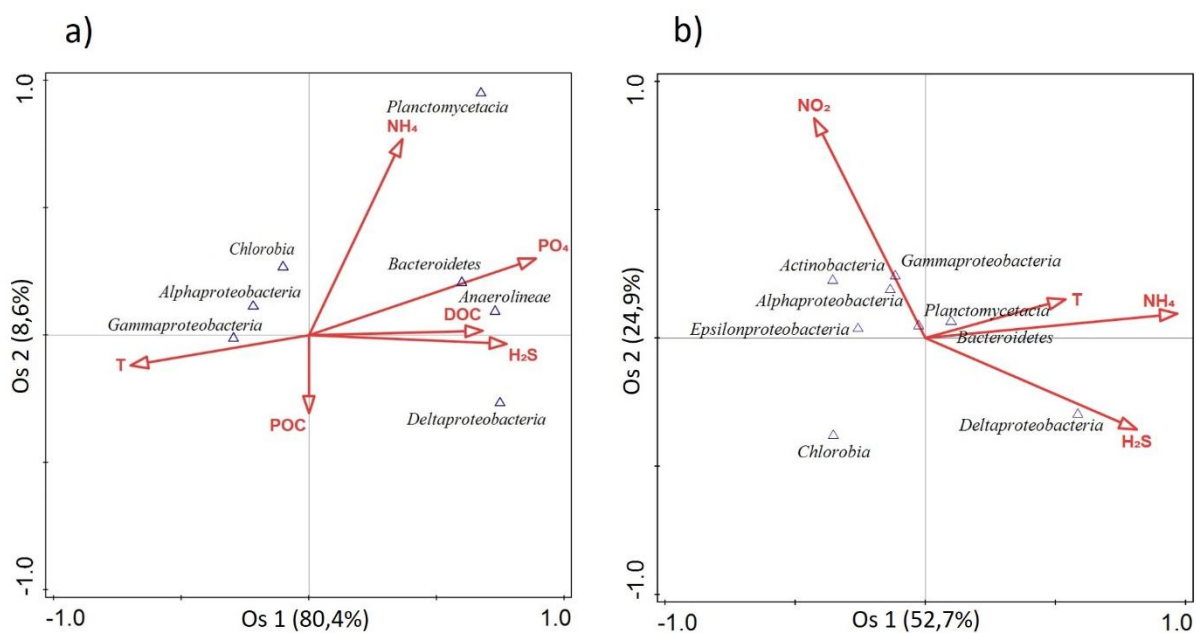
4.8. Utjecaj fizičko-kemijskih čimbenika na strukturu i raspodjelu prokariotskih zajednica

Kako bi se usporedile razlike u sastavu zajednica između tri zone jezera (kemokline, monimolimniona i sedimenta), provedena je nMDS analiza (Slika 19). Relativna brojnost pojedinih bakterijskih razreda iz uzoraka prikupljenih na dvije različite dubine vodenog stupca (kemoklina i monimolimnion) i sedimenta, integrirane su za svaku sezonu uzorkovanja. Analiza prostorno-vremenske sukcesije bakterijskih zajednica na razini razreda (osim koljena *Bacteroidetes*), na temelju Bray-Curtisovog indeksa sličnosti od 70%, pokazala je jasno grupiranje prema određenim uzorkovanim zonama jezera, odnosno izraženu vertikalnu raspodjelu zajednica. Iznimka je bio uzorak monimolimniona iz ljetne sezone (s većim udjelom razreda *Gammaproteobacteria*), koji je pokazao veću sličnost s uzorcima kemokline. Gubitkom fizičko-kemijske stratifikacije vodenog stupca tijekom holomiksije, nestala je i vertikalna razdioba mikrobnih zajednica, tijekom koje su se uzorci iz različitih dubina grupirali u jednu skupinu.



Slika 19. Grafički prikaz nMDS analize na temelju relativnog udjela pojedinih bakterijskih razreda u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera tijekom stratifikacije 2015. godine (a) i na različitim dubinama tijekom holomiksije (b). Na temelju Bray-Curtisovog indeksa sličnosti od 70%, odvojene su tri različite skupine uzoraka tijekom stratifikacije dok su uzorci holomiksije formirali jednu skupinu. C-kemoklina; M-monimolimnion; S-sediment; w-zima; sp-proljeće; s-ljeto; a-jesen.

Kako bi se utvrdila veza između pojedinih fizičko-kemijskih čimbenika i dominantnih bakterijskih zajednica provedena je kanonska analiza korespondencije (CCA, engl. *Canonical Correspondence Analysis*) (Slika 20). Stupanj ovisnosti fizičko-kemijskih čimbenika prethodno je utvrđena Spearmanovim testom. U analizi su korišteni relativni udjeli pojedinih bakterijskih zajednica zajedno s okolišnim čimbenicima temperature, H_2S , POC-a, DOC-a, PO_3^{3-} i NH_4 . Prema Monte Carlo permutacijskom testu (499 permutacija i graničnoj vrijednosti značajnosti od 5%), utvrđeno je da struktura zajednica značajno ($p < 0,05$) povezana s fizičko-kemijskim čimbenicima. Rezultati CCA analize objasnili su 80,4% varijacija u prvoj te 8,6% varijacija u drugoj osi. PO_4^{3-} ($F=10,9$; $p=0,012$), H_2S ($F=5,6$; $p=0,026$), DOC ($F=3,6$; $p=0,049$) i temperatura ($F=4,1$; $p=0,046$) najznačajniji su čimbenici koji utječu na strukturu bakterijskih zajednica, dok NH_4^+ ($F=1,1$; $p=0,338$) i POC ($F < 0,1$; $p=0,978$) nisu bili značajni. Nadalje, na CCA grafičkom prikazu, pojedine bakterijske zajednice pokazale su ovisnost o određenim okolišnim čimbenicima. Dominantni razredi u kemoklini, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* i *Chlorobia* utjecani su temperaturom, dok su razredi *Anaerolineae* i *Deltaproteobacteria*, povezani s DOC-om i H_2S , što upućuje na njihov značaj u ciklusima ugljika i sumpora. Najveći utjecaj na koljeno *Bacteroidetes* imaju PO_4^{3-} , a na razred *Planctomycetacia* NH_4^+ , implicirajući na njihovu ulogu u razgradnji organske tvari, odnosno ciklusu dušika.



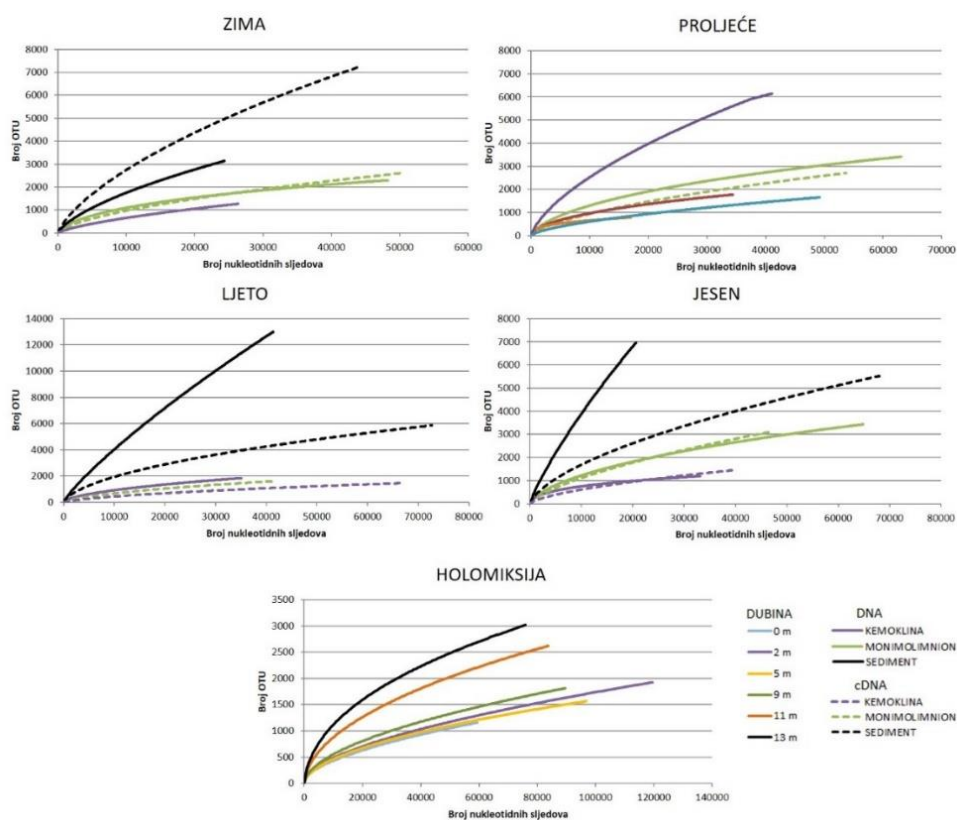
Slika 20. Kanonska analiza korespondencije (CCA) bakterijskih zajednica i fizičko-kemijskih čimbenika temperature (T), partikularnog (POC) i otopljenog (DOC) organskog ugljika, sumporovodika (H_2S), ortofosfata (PO_4^{3-}) i amonijaka (NH_4^+) i nitrita (NO_2^-), tijekom stratifikacije (a) i holomiksije (b). Svojevrsne vrijednosti (a): Os 1, 0,3665; Os 2, 0,0390; Os 3, 0,233; Os 4, 0,0039. Svojevrsne vrijednosti (b): Os 1, 0,0994; Os 2, 0,0470; Os 3, 0,0169; Os 4, 0,0064. Okolišne varijable prikazane su strelicama.

Rezultati CCA analize tijekom holomiksije objasnili su 52,7% varijacija u prvoj te 24,9% varijacija u drugoj osi. Statistički najznačajniji čimbenici bili su NH_4^+ ($F=4,0$; $p=0,03$) i H_2S ($F=2,6$; $p=0,026$), dok NO_2^- ($F=1,6$; $p=0,214$) i temperatura ($F=1,0$; $p=0,442$) nisu bili značajni. Međutim, većina dominantnih bakterijskih zajednica tijekom holomiksije na CCA grafičkom prikazu grupirala se uz NO_2^- , ukazujući da su potencijalno važni u njihovom metabolizmu. Niti jedan od određenih fizičko-kemijskih čimbenika nije imao utjecaj na razred *Chlorobia*.

4.9. Raznolikost prokariota u Rogozničkom jezeru

Sekvenciranjem uzoraka stratifikacije (2015. godina) metodom nove generacije na *Illumina MiSeq* platformi, dobivena su 1 684 033 nukleotidna slijeda (prosječno $45\,005 \pm 15\,565$ nukleotidnih slijedova po uzorku). Nakon provjere kvalitete u daljnje analize uključena su 1 197 022 nukleotidna slijeda. Broj nukleotidnih slijedova kretao se u rasponu od 20 611 do 72 725 s prosječnom duljinom 252 ± 12 pb. Sekvenciranje uzoraka holomiksije rezultiralo je dobivanjem 2 199 078 sekvenci (prosječno $87\,451 \pm 20\,269$ sekvenci po uzorku), a nakon obrade i provjere kvalitete u daljnje analize ih je uključeno 2 173 142 (prosječno $362\,190 \pm 104\,418$ po uzorku). Prosječna duljina nukleotidnih slijedova iznosila je 240 ± 29 pb. Broj dobivenih sekvenci nije

bio dovoljan kako bi se opisala cjelokupna raznolikost, što je vidljivo iz rarefakcijskih krivulja, koje nisu dosegle zasićenje ni kod uzoraka s najviše nukleotidnih sljedova (Slika 21).

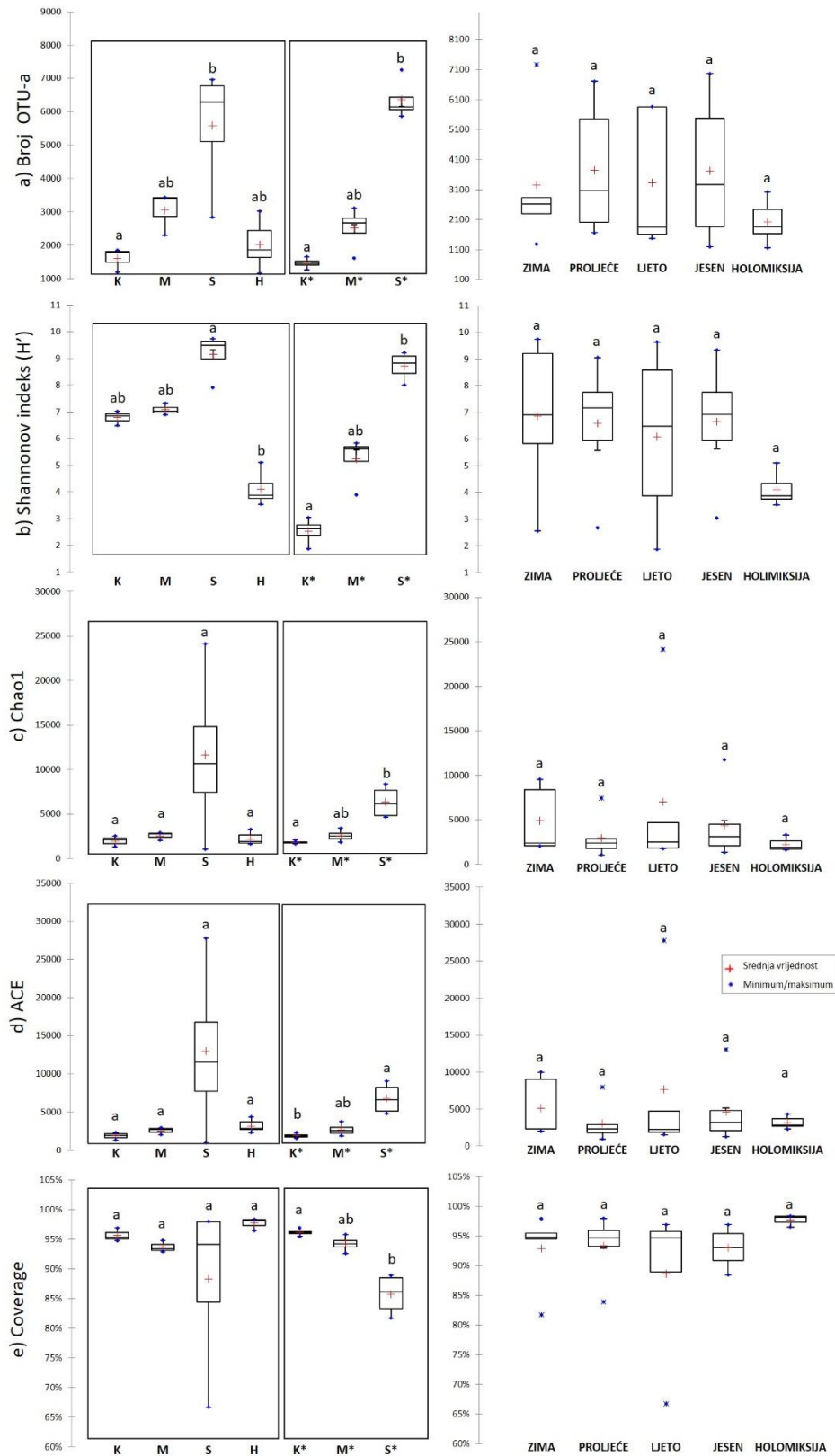


Slika 21. Rarefakcijske krivulje DNA i cDNA uzoraka u tijekom stratifikacije (2015. godine) u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera i tijekom holomiksije na različitim dubinama duž vertikalnog profila vodenog stupca.

Kako bi se utvrdile prostorno-vremenske razlike u raznolikosti OTU, Chao1, ACE (engl. *Abundance-based Coverage Estimator*), pokrivenost uzorkovanjem (engl. *Coverage*), te Shannonov indeks raznolikosti izračunati su nakon normalizacije zbog različitog broja sekvenci u svakom uzorku (Slika 22).

Nakon grupiranja nukleotidnih sljedova u OTU, na temelju sličnosti od 97%, svaki uzorak je prosječno sadržavao $3\,528 \pm 2\,143$ OTU-a. Najmanji broj OTU-a od 1 194 pronađen je u kemoklini (uzorak DNA iz kemokline u ljetnoj sezoni, dok je sediment sadržavao značajno (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$) veći broj OTU-a u DNA i cDNA uzorcima (do 7 257 OTU-a u uzorku transkriptoma sedimenta u zimskoj sezoni). Iz uzoraka vodenog stupca tijekom holomiksije dobiveno je prosječno $2\,015 \pm 686$ OTU-a (od 1 157 iz uzorka s 0 m dubine do 3 016 iz uzorka s 13 m dubine). Sukladno tome, Shannonov indeks raznolikosti rastao je s dubinom i značajno ($p < 0,05$) je bio veći u sedimentu nego u vodenom stupcu. U uzorcima DNA iz kemokline

prosječno je iznosio $6,8 \pm 0,2$, u uzorcima monimolimniona $7,0 \pm 0,2$, a u sedimentu $9,2 \pm 7,3$. Isti obrazac uočen je i u transkriptomu gdje je Shannonov indeks u kemoklini u prosjeku iznosio $2,5 \pm 0,4$, u monimolimnionu $5,2 \pm 0,8$, a u sedimentu je bio značajno ($p < 0,05$) veći te je prosječno iznosio $8,7 \pm 0,5$. Ukoliko bi se iz analize isključile sve neklasificirane bakterije Shannonov indeks bi bio znatno manji. U uzorcima DNA bez neklasificiranih bakterija prosječno iznosi $2,3 \pm 0,06$ u kemoklini ($1,1 \pm 0,2$ u cDNA), $1,9 \pm 0,07$ u monimolimnionu ($1,9 \pm 0,2$ u cDNA), te $1,4 \pm 0,3$ u sedimentu ($1,7 \pm 0,15$ u cDNA). Tijekom holomiksije Shannonov indeks je prosječno iznosio $4,1 \pm 0,6$. Isti trend pokazali su i ostali deskriptori. U DNA uzorcima kemokline Chao1 prosječno je iznosio $1970,0 \pm 607,8$, u uzorcima monimolimniona $2836,0 \pm 82,8$, najveća vrijednost od $12\ 300,3 \pm 11\ 562,5$ zabilježena je u sedimentu. U transkriptomu su vrijednosti općenito bile niže, ali s istim trendom rasta s dubinom. U sloju kemokline Chao1 u transkriptomu prosječno je iznosio $1\ 733,3 \pm 81,1$, u monimolimnionu $2\ 623,2 \pm 792,4$ te u sedimentu $5\ 666,1 \pm 1\ 551,8$. U uzorcima holomiksije Chao1 u prosjeku je bio $2\ 207,3 \pm 696,7$. Na temelju OTU-a iz DNA uzoraka, ACE u kemoklini u prosjeku je bio $1\ 857,2 \pm 502,8$, u monimolimnionu $2\ 825,7 \pm 143,4$ te u sedimentu $13\ 949,0 \pm 13\ 431,3$. U uzorcima transkriptoma najniža ACE vrijednost također je zabilježena u kemoklini (prosječno $1\ 750,8 \pm 175,0$), zatim u monimolimnionu ($2\ 794,5 \pm 928,5$), a značajno (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$) veća u sedimentu ($5\ 984,5 \pm 1\ 757,6$). Na razini sezona niti jedan od deskriptora nije statistički značajno (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$) odstupao. Najviša vrijednost Shannonovog indeksa od prosječnih $6,8 \pm 2,9$ zabilježena je tijekom zime (Chao1= $4\ 882,7 \pm 3\ 741,0$; ACE= $5\ 155,3 \pm 4\ 007,8$), nakon čega slijedi blagi pad u proljeće s prosjekom od $6,5 \pm 2,5$ (Chao1= $3\ 135,1 \pm 2\ 527,1$; ACE= $3\ 296,1 \pm 2\ 745,3$), a najniža vrijednost od $6,0 \pm 3,7$ zabilježena je tijekom ljeta (Chao1= $8\ 090,2 \pm 10\ 786,6$; ACE= $8993,2 \pm 12\ 611,6$) nakon kojeg slijedi blagi porast na $6,6 \pm 2,4$ u jesen (Chao1= $4\ 920,9 \pm 3\ 962,3$; ACE= $5\ 326,9 \pm 4514,7$). Iako rarefakcijske krivulje nisu dosegle zasićenje prosječna sezonska pokrivenost (engl. *Coverage*) sekvenciranjem bila je $>90\%$ u svim uzorcima. Detaljne vrijednosti deskriptora u pojedinim uzorcima prikazane su u Prilogu (Tablica II).



Slika 22. Prostorne (lijevo) i sezonske (desno) promjene broja OTU-a (a), Shannonovog indeksa raznolikosti (b), procjenitelja Chao1 (c), ACE (d) te Coverage (d) u Rogozničkom jezeru tijekom stratifikacije 2015. godine i holomiksije. Različita slova označavaju statistički značajne razlike među uzorcima (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$). K-kemoklina; M-monimolimnion; S-sediment; H-holomiksija. Uzorci transkriptoma označeni su zvjezdicom (*).

5. RASPRAVA

5.1. Prokariotske zajednice u Rogozničkom jezeru

Uz specifične zajednice SRB, u ovom radu istražena je i prostorno-vremenska raspodjela i taksonomska struktura prokariotskih (*Bacteria* i *Archaea*) zajednica u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničnog jezera, kako bi se procijenila njihova raznolikost te u skladu s određenim fizičko-kemijskim čimbenicima predložili potencijalni procesi koje ove zajednice provode u euksinskoj zoni jezera.

Fizičko-kemijski čimbenici pokazali su da je tijekom svih sezona 2015. godine vodeni stupac jezera bio vertikalno stabilan što je rezultat termohaline i kemijske stratifikacije, tipične za meromiktička jezera. Sezonske promjene su bile slabo izražene u euksinskoj zoni jezera, stoga se može kazati da istraživani slojevi, u smislu fizičko-kemijskih čimbenika, predstavljaju relativno stabilnu i konzerviranu regiju jezera. Za razliku od stratifikacije, tijekom holomiksije je vodeni stupac jezera bio homogen duž cijelog vertikalnog profila u smislu temperature, saliniteta i pH. Tijekom 2015. godine, najveće koncentracije POC-a zabilježene su u kemoklini, što upućuje na izraženu akumulaciju i proizvodnju organskog ugljika u ovom sloju. S druge strane, koncentracije PO_4^{3-} , NH_4^+ i DOC-a su najviše vrijednosti dosegle u monimolimnionu, sugerirajući da je remineralizacija važan proces u anoksičnim uvjetima. To je dodatno potvrđeno i CCA analizom, prema kojoj su PO_4^{3-} zajedno s DOC-om, H_2S i temperaturom, najznačajniji čimbenici koji utječu na strukturu i brojnost dominantnih svojiti tijekom stratifikacije, slično kao i u drugim meromiktičkim jezerima (Baatar i sur., 2016.), dok su prokariotske zajednice tijekom holomiksije pod snažnim utjecajem H_2S -a i NH_4^+ . Za vrijeme holomiksije duž vertikalnog profila zabilježen je slobodni H_2S , čijom oksidacijom dolazi do formiranja koloidnog sumpora. Miješanje vodenih slojeva dovelo je i do pada koncentracija NH_4^+ , te porasta NO_2^- i NO_3^- i do deset puta u odnosu na koncentracije u monimolimnionu tijekom stratifikacije.

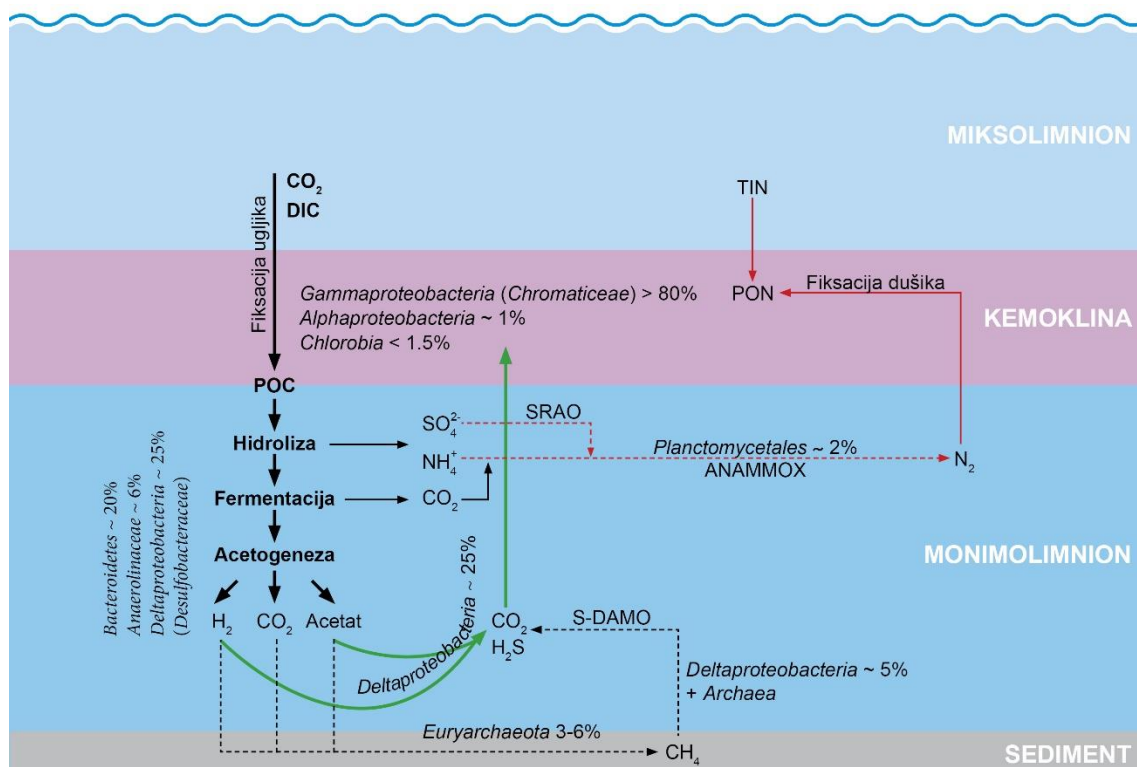
Iako su fluktuacije bakterioplanktonskih zajednica zabilježene i u drugim eutrofnim jezerima i obalnim područjima (Crump i Hobbie, 2005.; Shade i sur., 2007.), prokariotske zajednice u Rogozničkom jezeru bile su stabilne tijekom cijele godine. nMDS analiza je međutim pokazala jasnu vertikalnu raspodjelu dominantnih prokariotskih zajednica tijekom stratifikacije. Nestanak vertikalne stabilnosti vodenog stupca tijekom holomiksije uzrokovao je i nestanak „mikrobiološke stratifikacije“. Tijekom stratifikacije fototrofne *Gammaproteobacteria*, dominirale su slojem kemokline, sulfat-reducirajuće *Deltaproteobacteria* i *Bacteroidetes* monimolimnionom, dok je statistički značajno veći udio arheja zabilježen u sedimentu.

qPCR analize dodatno su potvrdile da brojnost prokariota niti u vodenom stupcu, niti u sedimentu nije značajno ($p > 0,05$) varirala tijekom uzorkovanih sezona, što odražava stabilne

okolišne uvjete. Nadalje, qPCR je pokazao da su bakterije brojčano dominirale u odnosu na arheje u svim uzorcima. Brojnost arheja rasla je s dubinom i značajno je bila veća u sedimentu nego u vodenom stupcu. Ovakva raspodjela arheja u skladu je s prijašnjim istraživanjima u morskim ekosustavima i meromiktičkim jezerima, koja ukazuju na to da su anoksični sedimenti bogati organskom tvari niskoenergetska staništa, budući da arheje mogu rasti i održavati metabolizam koristeći pri respiraciji elektron akceptore, kao što je primjerice CO₂, čijom se redukcijom oslobađa znatno manje energije nego pri redukciji kisika (Tuomi i sur., 1997.; Durbin i Teske, 2012.; Kubo i sur., 2014.; Tiodjio i sur., 2016.).

Analiza sekvenci DNA i cDNA, također je pokazala dominaciju bakterija u odnosu na arheje. Iako rarefakcijske krivulje nisu dosegle zasićenje, dobra pokrivenost (engl. *Coverage*) sekvenciranjem (>90%), ukazuje da je raznolikost gotovo u potpunosti obuhvaćena analizom (Lemos i sur., 2011), osim u uzorcima sedimenta tijekom ljetne sezone kada je, zbog iznimne raznolikosti, ta vrijednost bila niska. Shannonov indeks raznolikosti, baziran na OTU-ima, kretao se od prosječnih 2,5 u kemoklini do najviših 8,7 u sedimentu, ukazujući na općenito veliku mikrobnu raznolikost, koja raste s dubinom. Isti obrazac rasta raznolikosti s dubinom zabilježen je i u drugim sličnim okolišima (Lehours i sur., 2007.; Dirnitriu i sur., 2008.; Casamayor i sur., 2012.; Klepac-Ceraj i sur., 2012.; Andrei i sur., 2015.; Baatar i sur., 2016.), međutim raznolikost u Rogozničkom jezeru se pokazala većom nego u navedenim okolišima, što je bilo posebno naglašeno u sedimentu. Prema dostupnoj literaturi, ovo je jedna od najvećih zabilježenih raznolikosti. Velika prokariotska raznolikost u Rogozničkom jezeru, usprkos ekstremnim uvjetima, može biti posljedica visokih koncentracija organske tvari i dostupnih nutrijenata za čiju su mineralizaciju potrebne kompleksne mikrobne zajednice (Lauro i sur., 2011.; Baatar i sur., 2016.). Kao i na razini SRB, istraživanje je još jednom potvrdilo jedinstvenost ekosustava Rogozničkoj jezera s >50% neklasificiranih prokariotskih sekvenci. Raznolikost u jezeru bitno je manja kada se izuzmu sve taksonomski neklasificirane bakterije. Zanimljivo, tijekom holomiksije neklasificirane bakterije gotovo u potpunosti nestaju, a time i raznolikost značajno pada u odnosu na razdoblje stratifikacije. Ovi rezultati upućuju na to da najveći dio prokariotske raznolikosti u Rogozničkom jezeru leži upravo u neklasificiranim bakterijama. Razlog njihovog razvoja tijekom stratifikacije može se objasniti nedostatkom miješanja vodenih slojeva, koji omogućava razvoj stabilnih zajednica (Rogozin i sur., 2010.; Andrei i sur., 2015.), dok njihov nestanak tijekom holomiksije ukazuje na nemogućnost prilagodbe na nagle promjene okolišnih uvjeta.

Prema taksonomskoj strukturi aktivnih zajednica u Rogozničkom jezeru može se pretpostaviti njihova uloga u ciklusima ugljika, dušika i sumpora u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu jezera, koja je ograničena na relativno mali identificiranih svojti (Slika 23).



Slika 23. Predloženi mikrobní procesi u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu Rogozničkog jezera tijekom stratifikacije na osnovi taksonomske pripadnosti nukleotidnih sljedova transkriptoma. Crnom su označeni procesi povezani s ciklusom ugljika, zelenom procesi u ciklusu sumpora, a crvenom bojom procesi vezani uz ciklus dušika. Isprekidane linije predstavljaju procese za koje postoji slab genetički potencijal. Relativan doprinos pojedine taksonomske skupine izražen je na temelju njihove relativne brojnosti. DIC-otopljeni anorganski ugljik; POC-partikularni organski ugljik; TIN-ukupni anorganski dušik; PON-partikularni organski dušik; SRAO-sulfat-reducirajuća oksidacija amonijaka; S-DAMO-sulfat ovisna anaerobna oksidacija metana; ANAMMOX-anaerobna oksidacija amonijaka.

Prema taksonomskoj strukturi transkriptoma, anoksigena fotosinteza je dominantan proces fiksacije ugljika (Calvinov ciklus) tijekom stratifikacije u kemoklini kojeg provodi razred *Gammaproteobacteria*, odnosno bakterije iz porodice *Chromatiaceae*, što odgovara najvišim koncentracijama POC-a koje su zabilježene u ovom sloju. Za vrijeme holomiksije došlo je do potpune promjene u strukturi zajednice *Gammaproteobacteria*, prilikom koje je porodica *Chromatiaceae* gotovo u potpunosti nestala, a zamijenjena je porodicom *Thioglobaceae* (klaster SUP05), koja je detektirana i tijekom holomiksije 2011. godine (Pjevac i sur., 2015.). Članovi ove porodice su obligatni kemolitoautotrofi koji pri oksidaciji sumpornih spojeva

koriste NO_3^- kao elektron akceptore, a uobičajene su i u drugim anoksičnim vodenim okolišima (Swan i sur., 2011.; Rika E i sur., 2013.). S obzirom da su *RuBisCO* geni pronađeni unutar SUP05 klastera (Walsh i sur., 2009.), fiksacija ugljika se tijekom holomiksije vjerojatno, odvija putem kemolitoautotrofije (Calvin–Benson–Bashamov ciklus). Tijekom holomiksije je također došlo do razvoja bakterija pripadnika razreda *Epsilonproteobacteria* (porodice *Arcobacter* i *Sulfurovaceae*), nedavno klasificiranih kao koljeno *Epsilonbacteraeota* (Waite i sur., 2017.), skupine koja nije pronađena tijekom stratifikacije. Ovi kemolitotrofi fiksiraju ugljik (Arnonov ciklus) pri oksidaciji sumpora i nitrifikaciji (Llorens-Mares i sur., 2015.), a najbrojniji su u dubokomorskim staništima, iako su detektirani i u drugim morskim okolišima s povišenim koncentracijama H_2S gdje značajno doprinose fiksaciji ugljika u tami (Labrenz i sur., 2005.; Yakimov i sur., 2007.; Lavik i sur., 2009.; Noguerola i sur., 2015.a). Očita promjena u procesu fiksacije ugljika u holomiktičnim za razliku od stratificiranih uvjeta, može se objasniti činjenicom da je za vrijeme holomiksije, zbog visoke koncentracije koloidnog sumpora, prozirnost vode uvelike smanjena što onemogućuje razvoj fotosintetskih, a pogoduje kemolitotrofnim organizmima. Nadalje, *Epsilonproteobacteria* i SUP05 klaster usko povezuju cikluse ugljika, sumpora i dušika. Njihov razvoj isključivo tijekom holomiksije, stoga se može objasniti i povišenim koncentracijama elementarnog sumpora i NO_3^- , koji su u anoksičnim uvjetima energetski najpovoljniji elektron akceptori pri respiraciji (Lam i Kuypers, 2011.a). Proizvedena organska tvar razgrađuje se u monimolimnionu djelovanjem gustih populacija bakterija iz koljena *Bacteroidetes*, čija je brojnost tijekom holomiksije bila smanjena. Predstavnici ovog koljena uobičajeni su stanovnici morskih okoliša u kojima mogu činiti i do 30% ukupnih bakterija (Alonso-Saez i Gasol, 2007.). Pokazalo se da *Bacteroidetes* posjeduju brojne glikozil transferaze i velik broj enzima pomoću kojih razgrađuju polimerne molekule, što ukazuje na njihovu ulogu u razgradnji organske tvari, posebno proteina (Fernandez-Gomez i sur., 2013.).

Članovi razreda *Anaerolinaceae* i *Deltaproteobacteria* (većinom zastupljenog porodicom *Desulfobacteraceae*) identificirani su kao potencijalne fermentativne bakterije u jezeru, a njihov udio u ukupnim zajednicama tijekom holomiksije bio je manji nego tijekom stratifikacije. Članovi razreda *Anaerolinaceae* imaju sposobnost razgradnje ugljikohidrata fermentativnim putem (Yi i sur., 2014.), koji se potom dalje razgrađuju djelovanjem bakterija iz razreda *Deltaproteobacteria*, za čija je predstavnike također poznato da fiksiraju CO i CO_2 u anaerobnim uvjetima u reduktivnom acetil-CoA metaboličkom putu (Wood-Ljungdahlov put) (Ragsdale i Pierce, 2008.). Llorens-Marès i sur., (2015) su pokazali da članovi porodice *Desulfobacteraceae* imaju mogućnost dobivanja energije i fiksacije ugljika u monimolimnionu

jezera Cisó. Neke studije upućuju i na to da bi organizmi koji mogu koristiti CO za energiju i kao izvor ugljika mogli biti nositelji ranih metaboličkih procesa (Huber i Wachtershauser, 1997.).

Glavnina metanogeneze u jezeru se vjerojatno odvija u sedimentu, gdje je zabilježeno značajno više arheja, većina kojih je pripadala koljenu *Euryarchaeota*, koje se uobičajeno povezuju s metanogenezom (Borrel i sur., 2016.). Ukoliko među koljenom *Euryarchaeota* i postoje pripadnici koji mogu oksidirati metan, oni su, kao i metanogeni, slabo zastupljeni u ukupnim prokariotskim zajednicama Rogozničkog jezera. To se može objasniti činjenicom da su u prirodnim okolišima s dovoljnom koncentracijom SO_4^{2-} sulfat-reducirajući prokarioti obično uspješniji u kompeticiji za resurse od metanogenih (Raskin i sur., 1996.). S obzirom na nedostatak NO_2^- i NO_3^- i dovoljne koncentracije SO_4^{2-} koje su konstantne duž vertikalnog stupca Rogozničkog jezera (Kamyshny i sur., 2011.), proces oksidacije metana vjerojatno se odvija putem procesa sulfat-ovisne anaerobne oksidacije metana (S-DAMO, engl. *Sulfate-Dependent Anaerobic Methane Oxidation*), koji se uglavnom svojstven morskim okolišima (Reeburgh 2007.). Iako točni metabolički mehanizmi S-DAMO nisu u potpunosti poznati, s ovim procesom se povezuju ANME-1 i ANME-2 klasteri u simbiozi s *Desulfosarcina/Desulfococcus* skupinom unutar razreda *Deltaproteobacteria* (Boetius i sur., 2000.; Orphan i sur., 2002.b), koja je detektirana u jezeru. Među arhejama je tijekom holomiksije najbrojnije bilo koljeno *Nanoarchaeota*. Članovi ovog koljena pronađeni su u različitim ekstremnim okolišima (Hohn i sur., 2002.; Casanueva i sur., 2008.), međutim, prema dostupnoj literaturi, ne i u meromiktičkim jezerima. Ovi organizmi parazitiraju unutar stanice kemolitoautotrofne arheje *Ignicoccus hospitalis*, koja reducira sumpor (Jahn i sur., 2007.). S obzirom da ova vrsta nije detektirana u jezeru, moguće je da pripadnici koljena *Nanoarchaeote* u Rogozničkom jezeru parazitiraju unutar nekog drugog organizma, što je zamijećeno i u kopnenim hidrotermalnim izvorima (Munson-McGee i sur., 2015.), međutim njihova ekologija u jezeru bi trebala biti detaljnije istražena.

Rezultati nadalje ukazuju da je ciklus dušika tijekom stratifikacije ograničen je na fiksaciju u kemoklini i remineralizaciju u monimolimnionu. S obzirom da je *nif* gen, koji je odgovoran za proces fiksacije, prisutan u porodici *Chromatiaceae* (Llorens-Mares i sur., 2015.) vjerojatno je da one provode i fiksaciju dušika u kemoklini Rogozničkog jezera. Iako je sposobnost fiksacije dušika (diazotrofija) zabilježena i u nekoliko metanogenih arheja, odnosno njihovom simbiotskom odnosu sa SRB u morskim okolišima (Lobo i Zinder, 1988.; Dekas i sur., 2009.), koncentracije NH_4^+ u pridnenom sloju jezera tijekom stratifikacije bile su dovoljne da inhibiraju ekspresiju gena za fiksaciju dušika (Lauro i sur., 2011.). Međutim, tijekom holomiksije,

drastično niža koncentracija NH_4^+ u vodenom stupcu, omogućila je diazotrofiju i razvoj zelenih sumpornih bakterija (porodica *Chlorobiaceae*) koje su sposobne asimilirati N_2 u NH_4^+ (Ng i sur., 2010.). Budući da u uzorcima stratifikacije niti u uzorcima holomiksije nisu pronađeni 16S rRNA geni povezani s porodicom *Nitrosomonadales* ili rodom *Nitrosococcus* (amonij-oksidirajuće bakterije) niti s koljenom *Thaumarchaeota* (amonij-oksidirajuće arheje), kao niti 16S rRNA geni povezani s denitrificirajućim bakterijama, oksidacija amonijaka vjerojatno ovisi o koljenu *Planctomycetales*, koje se obično povezuje s anammox procesom u anoksičnim morskim okolišima (Kuypers i sur., 2006.). Stoga se visoke koncentracije NH_4^+ u monimolimnionu jezera tijekom stratifikacije mogu objasniti sporom oksidacijom koju provode relativno malobrojne *Planctomycetales* (do 2% u zimskoj sezoni). Anammox proces intenzivirao se u holomiktičkim uvjetima, kada su nedostatak O_2 i povišene koncentracije NO_2^- omogućili razvoj koljena *Planctomycetales* koje je bilo dominantno duž cijelog vertikalnog profila vodenog stupca. Genetički potencijal za denitrifikaciju također je bio veći tijekom holomiksije, a s tim procesom je povezana porodica *Thioglobaceae* (klaster SUP05) i razred *Epsilonproteobacteria*. Nedostatak NO_2^- , odnosno nitrifikacije, tijekom stratifikacije implicira da se ovaj proces odvija pomoću SO_4^{2-} kao elektron akceptora u procesu sulfat-reducirajuće oksidacije amonijaka (SRAO, engl. *Sulfate-Reducing Ammonium Oxidation*), koji je, čini se, jedini put gubitka dušika u jezeru. Nedavne studije također nisu pronašle značajnu denitrifikacijsku aktivnost u oceanskim zonama s minimumom kisika (OMZ, engl. *Oxygen Minimum Zones*), a anammox se sve češće spominje kao glavni put gubitka dušika u ovim okolišima (Kalvelage i sur., 2013.). Trenutno se procjenjuje da se anammox procesom gubi od 30 do 50% dušika u oceanima ili 80 do 150 Tg N_2 godišnje u OMZ (Arrigo, 2005.). Nadalje, slab potencijal za denitrifikaciju zabilježen je i u meromiktičkim jezerima Cisó i antartičkom jezeru Ace (Lauro i sur., 2011.; Llorens-Mares i sur., 2015.). Pokazalo se da su denitrifikacija i oksidacija amonijaka inhibirane prisutnošću H_2S , budući da je enzim koji katalizira redukciju N_2O u N_2 osjetljiv na H_2S (Porubsky i sur., 2009.). Inhibicija anammox procesa H_2S -om primjećena je i u euksinskom okolišu Golfo Dulce (Costa Rica) i Crnom moru (Dalsgaard i sur., 2003.; Jensen i sur., 2008.).

Glavnina produkcije H_2S -a u jezeru odvija se u monimolimnionu. Iako su koncentracije H_2S tijekom stratifikacije bile visoke, nisu prešle vrijednosti za koje se smatra da inhibiraju redukciju sulfata (~ 16 mM) (Reis i sur., 1992.). Potencijal za disimilatornu redukciju sulfata u jezeru potječe od razreda *Deltaproteobacteria*, većina kojih pripada porodici *Desulfobacterales*, koja obuhvaća sve poznate SRB koje oksidiraju acetate u potpunosti do CO_2 tijekom redukcije sulfata, iako neki članovi ove porodice mogu provoditi i reduktivne i

oksidativne reakcije u ciklusu sumpora (Sorokin i sur., 2014.; Llorens-Mares i sur., 2015.). Aktivne *Deltaproteobacteria* detektirane su i u kemoklini, ali su značajniji dio zajednice činili u monimolimnionu i u sedimentu. Studije su pokazale da su *Deltaproteobacteria* u sedimentu mogu remineralizirati i >50% organske tvari (Jorgensen, 1990.). Visoke koncentracije H₂S pogoduju razvoju razreda *Gammaproteobacteria* (porodica *Chromatiaceae*), tipičnih anoksiogenih fototrofa koji oksidiraju H₂S, koji su zabilježeni na granicama oksičnih i anoksičnih slojeva i drugih stratificiranih vodenih okoliša (Buhring i sur., 2011.; Lay i sur., 2013.; Llorens-Mares i sur., 2015.; Hamilton i sur., 2016.). Ova porodica aktivna je i u monimolimnionu jezera, posebno u ljetnoj sezoni u kojoj je činila 54% nukleotidnih sljedova. S obzirom na njihovu obligatornu fotosintetsku prirodu, razlog tome bi mogla biti intenzivnija insolacija u ljetnim mjesecima koja je vjerojatno potakla njihov rast i u dubljim slojevima jezera. Ulogu u oksidaciji sulfida i tiosulfata tijekom holomiksije preuzimaju zelene sumporne bakterije iz porodica *Chlorobiaceae* i *Thioglobaceae* te koljena *Epsilonproteobacteria* (porodice *Arcobacter* i *Sulfurovaceae*). *Chlorobiaceae* su obligatni anaerobni fotoautotrofi, koji nisu bili dominantni tijekom stratifikacije. Iako je izgledno da je već spomenuta smanjena prozirnost vode ograničila fotosintetske organizme, povećani udjeli porodice *Chlorobiaceae* tijekom holomiksije mogu se objasniti činjenicom da zelene sumporne bakterije zbog velike količine BChl_a u klorosomima, mogu rasti pri znatno nižem intenzitetu svjetla od purpurnih sumpornih bakterija (Parkin i Brock, 1980.). Njihova pojavnost zajedno s razredom *Epsilonprotobacteria*, iako zabilježena (Manske i sur., 2005.), nije uobičajena u anoksičnim morskim sredinama (Lin i sur., 2006.; Grote i sur., 2007.; Noguerola i sur., 2015.b). Tijekom stratifikacije u većini slučajeva kemoklina je u fotičkoj zoni što omogućava razvoj fototrofa, koji su uspješniji u kompeticiji za elektron donore (reducirane sumporne spojeve) (Camacho i sur., 2000.; Camacho i sur., 2005.). Moguće je, stoga, da je tijekom holomiksije intenzitet svjetla bio optimalan da omogući rast samo visokospecijaliziranim fototrofima, kao što su *Chlorobiaceae* i kemolitotrofima. Sposobnost oksidacije reduciranih sumpornih spojeva također se povezuje i sa razredom *Alphaproteobacteria* (Yau i sur., 2013.), koje su u jezeru zastupljene uglavnom porodicama *Rhodobacterales* i *Rhodospirillales* (purpurne ne-sumporne bakterije), ali su ukupno činile mali dio zajednice (općenito oko 1% tijekom stratifikacije i oko 5% tijekom holomiksije). Iako je prethodna studija (Pjevac i sur., 2015.) pokazala da su zelene sumporne bakterije, odnosno koljeno *Chlorobi*, bili najbrojniji anoksiogeni fototrofi u jezeru tijekom stratifikacije 2011. i 2012. godine, tijekom stratifikacije u 2015. godini razred *Chlorobia* činio je malu frakciju (do 1,5% u kemoklini tijekom proljetne i ljetne sezone) među DNA sekvencama kao i u transkriptomu. Stoga je izgledno da ciklus sumpora tijekom

stratifikacije u jezeru ovisi o svega dva razreda (*Gammaproteobacteria* i *Deltaproteobacteria*), dok su razredi *Alphaproteobacteria* i *Chlorobia* manje značajni. Međutim, ne može se isključiti i neznatan doprinos arheja, budući da je disimilatorni put redukcije sulfata konzerviran i u dva arhejska koljena (*Euryarchaeota* i *Crenarchaeota*) (Muller i sur., 2015.). Tijekom holomiksije, s obzirom na dominantne *Thioglobaceae*, *Epsilonproteobacteria* i *Actinobacteria*, te na qPCR rezultate koji su pokazali manji udio *dsrA* gena u ukupnim bakterijskim zajednicama nego tijekom stratifikacije, u ciklusu sumpora dominira kemoautotrofna oksidacija H₂S u odnosu na redukciju SO₄²⁻.

5.2. Sulfat-reducirajuće bakterije u Rogozničkom jezeru

Filogenetske analize, temeljene na 16S rRNA genskom markeru, pokazale su da su SRB prisutne duž cijelog proučavanog vertikalnog profila Rogozničkoj jezera, upućujući na to da je slobodan H₂S u vodenom stupcu rezultat procesa disimilatorne redukcije sulfata koji se odvija u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu jezera. Ciljanom detekcijom do danas poznatih filogenetskih podskupina SRB pokazalo se da, osim nekoliko populacija koje su srodne s SRB iz *Desulfonema/Desulfococcus/Desulfosarcina* (DCC) i *Desulfovibrio/Desulfomicrobium* (DSV) podskupina, većina pronađenih bakterija iz uzoraka vodenog stupca ne može biti direktno povezana s do sada poznatim SRB, već da pripadaju specifičnim populacijama koje mogu biti definirane tek na višim taksonomskim nivoima, odnosno razredu *Deltaproteobacteria*, te u manjoj mjeri kao bakterije iz koljena *Firmicutes* i *Verrucomicrobia*, pronađenima u različitim morskim, ali i zagađenim okolišima. To je posebno bilo izraženo u sedimentu, gdje je gotovo sve bakterije bilo moguće identificirati samo na nivou razreda *Deltaproteobacteria*, a koje pokazuju sličnost s onima detektiranim u različitim hadopelagičkim područjima i zagađenim obalnim sedimentima (Acosta-Gonzalez i sur., 2013.; Nunoura i sur., 2013.).

Detaljne analize klonskih knjižnica, otkrile su da se struktura i raznolikost zajednica SRB jasno razlikuju između vodenog stupca i sedimenta, što je potvrđeno i rarefakcijskom analizom. Za razliku od sličnih jezera (Koizumi i sur., 2004.; Kondo i Butani, 2007.), zajednice SRB u kemoklini i monimolimnionu Rogozničkog jezera raznolikije su od onih u sedimentu, što vjerojatno odražava varijabilnije okolišne uvjete u vodenom stupcu. Nekoliko populacija SRB pokazalo je jedinstvenu vertikalnu raspodjelu, pojavljujući se isključivo u određenom sloju vodenog stupca ili sedimenta. Nadalje, pojava jedinstvenih populacija SRB isključivo u zimskoj

ili ljetnoj sezoni, ukazuje i na njihovu sezonsku ovisnost. U vodenom stupcu tijekom ljeta, u uvjetima povišenog saliniteta, koncentracije H₂S i ukupnog organskog ugljika, raznolikost SRB je bila manja nego tijekom zime, što ukazuje na razvoj manjeg broja bolje adaptiranih subpopulacija SRB. Međutim, promjene uočene u sedimentu jezera, gdje je veća raznolikost unutar zajednica bila u ljetnoj sezoni, ne može se objasniti na isti način, što ukazuje na to da su biološki procesi u sedimentu sporiji i odražavaju stabilnije okolišne uvjete. Gotovo potpune prostorno-vremenske promjene u strukturi zajednica SRB zabilježene su također i u meromiktičkim jezerima Kaiike i Suigetsu, a povezuju se sa sastavom i koncentracijom organske tvari (Koizumi i sur., 2004.; Kondo i Butani, 2007.).

Rarefakcijska analiza, ukazala je da je vodeni stupac zona jezera koja predstavlja znatno veći izvor genetičke raznolikosti SRB od očekivanog. Bez obzira na ovu iznimnu raznolikost, rezultati su dali dobar uvid u strukturu ciljane zajednice. S obzirom na broj sekvenciranih klonova, može se zaključiti da najzastupljenije i najraznolikije SRB u kemoklini i monimolimnionu jezera čine do sada nekultivirani članovi razreda *Deltaproteobacteria* (populacije S1 i W1), nakon kojih slijede rodovi *Desulfomicrobium*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* i *Desulfovibrio*. Iako definirane samo na razini razreda *Deltaproteobacteria*, različite populacije unutar ovog razreda, pokazale su izraženu vremensku dinamiku s jasnom razlikom između populacija koje se pojavljuju isključivo u zimskoj i onih u ljetnoj sezoni. Nadalje, sezonsku ovisnost pokazali su i srodnici rodova *Desulfomicrobium* i *Clostridium*, koji su detektirani isključivo u vodenom stupcu u ljetnoj sezoni, dok su se jedinstvene populacije rodova *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfovibrio* i *Verrucomicrobium* pojavile u hladnijoj, zimskoj sezoni. Od navedenih populacija, rod *Desulfovibrio* činio je najraznolikiju skupinu s tri subpopulacije. Navedene SRB uobičajeno se nalaze i u vodenim stupcima drugih slatkovodnih, morskih i boćatih okoliša, kao što su jezero Pavin, jezero Suigetsu, Guayamas Basin, sediment u estuariju rijeke Clone, te slane močvare u Novoj Engleskoj (Kondo i sur., 2004.; Lehours i sur., 2005.; Kondo i Butani, 2007.). Zanimljivo je da su parovima početnicama specifičnima za SRB detektirani i pripadnici koljena *Verrucomicrobia* i roda *Clostridium*, za koje je poznato da, iako obično čine vrlo mali dio ukupne bakterijske zajednice, značajno doprinose razgradnji organske tvari putem fermentativnih procesa kojima razgrađuju polisaharide, proteine i lipide na formijate, acetate, laktate i druge spojeve niske molekulske mase, koji su specifični supstrati za rast SRB (Martinez-Garcia i sur., 2012.). S obzirom da u ovom istraživanju nisu detektirani pripadnici porodice *Syntrophobacteraceae*, niti njihovi srodnici, oksidacija kompleksnih organskih spojeva u jezeru se vjerojatno odvija aktivnošću *Clostridia* i *Verrucomicrobia*, čime se stvaraju pogodni uvjeti za razvoj SRB. Također, u ljetnoj

sezoni u monimolimnionu jezera detektirana i jedna jedinstvena populacija (S4), s niskom sličnošću (<90%) s bakterijama dostupnim u bazi podataka, što ukazuje na to da ova populacija predstavlja novu skupinu na taksonomskom nivou reda.

SRB su, osim u anoksičnim slojevima, detektirane i u kemoklini jezera u kojima vladaju mikroaerofilni uvjeti. Struktura ove zajednice pokazala se sličnom onoj u monimolimnionu. SRB su pronađene i u kemoklini Crnog i Baltičkog mora (Bryukhanov i sur., 2015.), u kojima, kao i u kemoklini Rogozničkog jezera, dominira rod *Desulfomicrobium*. Njihova prisutnost objašnjava se činjenicom da mnoge SRB posjeduju enzimske sustave koji im omogućavaju zaštitu od stresa uzrokovanog kisikom. U takvim uvjetima SRB često stvaraju agregate s aerobnim mikroorganizmima formirajući na taj način anaerobne mikrozone, odnosno optimalne niše za svoj rast. To bi mogao biti i slučaj u kemoklini Rogozničkog jezera, budući da su najviše koncentracije organskih čestica (POC-a) zabilježene upravo u tom sloju.

Analiza sedimenta pokazala je da su ovdje prisutne zajednice SRB manje kompleksne od onih u vodenom stupcu no isto tako i vrlo karakteristične za ovu zonu jezera. Većina bakterija također je definirana isključivo kao nekultivirani predstavnici razreda *Deltaproteobacteria*, dok je samo jedna populacija (C2) pokazala srodnost s kultiviranim predstavnicima roda *Desulfosarcina*. Zanimljivo, niti jedna od populacija pronađena u vodenom stupcu, nije detektirana i u sedimentu. U usporedbi s vodenim stupcem, populacija bakterija najbližnja pripadnicima roda *Desulfosarcina*, bila je prisutna i u zimskoj i u ljetnoj sezoni u oba sloja sedimenta, ipak pokazujući preferenciju prema zimskim uvjetima kad je pronađeno više njihovih predstavnika. Istraživanja su pokazala da su članovi porodice *Desulfosarcinales* također dominantni u arktičkom površinskom sedimentu te u sedimentu rijeke Eel u kojima čine do 73% ukupnih SRB (Ravenschlag i sur., 2000.; Orphan i sur., 2002.a). Sezonske promjene u strukturi zajednica SRB u sedimentu zamijećene su i na razini populacija *Deltaproteobacteria* koje su općenito bile brojnije u ljetnoj sezoni, a uočene su i razlike u vertikalnoj razdiobi ovih populacija. Četiri populacije (nekultivirane *Deltaproteobacteria* i morske bakterije) detektirane su isključivo u ljetnoj sezoni, te su bile karakteristične za gornji (populacija S2) ili donji (populacije S1, S3, S4) sloj sedimenta. Dvije populacije (W1 i W2) pronađene su isključivo tijekom zime. Zanimljivo, tijekom zimskog razdoblja filogenetske razlike u strukturi SRB zajednica između gornjeg i donjeg sloja sedimenta bile su vrlo jasno izražene.

Brojne studije pokazale su da fizičko-kemijski čimbenici imaju značajnu ulogu pri definiranju strukture fitoplanktonskih i bakterijskih i zajednica (Fuhrman i sur., 2006.; Gilbert i sur., 2012.; Ciglonečki i sur., 2015.; Pjevac i sur., 2015.). Za aktivnost i strukturu SRB, kao važni čimbenici

ističu se koncentracija DOC-a, vrsta organske tvari, salinitet i koncentracija SO_4^{2-} (Massana i sur., 1997.; Eiler i Bertilsson 2004.; Fortin i sur., 2004.; Kan i sur., 2007.; Fujii i sur., 2012.). Tijekom zimske i ljetne sezone 2014. godine, fizičko-kemijski čimbenici u Rogozničkom jezeru pokazali su izraženu stratificiranost vodenog stupca. Temperatura i pH bili su prilično konstanti, stoga ovi čimbenici vjerojatno nisu imali značajan utjecaj na strukturu zajednica SRB. Varijacije u koncentraciji H_2S bile su izraženije, odnosno veće u ljetnom razdoblju, što ukazuje na povećanu aktivnost SRB. Koncentracije POC-a i DOC-a također su bile veće u ljetnoj sezoni s maksimumom u sloju kemokline. Autohtoni DOC nastao procesima primarne produkcije, sadrži visoko biodostupne supstrate, kao što su ugljikohidrati, aminokiseline, peptidi i organske kiseline (Sundh, 1992.). Najvjerojatnije je stoga da upravo fitoplanktonski cvat ima značajan utjecaj na biomasu i promjene u strukturi heterotrofnog bakterioplanktona (Van Der Gucht i sur., 2001.; Eiler i Bertilsson, 2004.; Fujii i sur., 2012.). Sezonske razlike fitoplanktonskih populacija već su zabilježene u miksolimnionu Rogozničkog jezera (Ciglencčki i sur., 2015.), pa je moguće da razlike u koncentraciji, ali i vrsti DOC-a, posebno njegove reaktivne površinsko aktivne frakcije (tj. njegove biodostupnosti), utječu na bakterioplanktonske zajednice i posljedično na strukturu SRB. Utjecaj organske tvari na pojavu i/ili razvoj određenih populacija SRB ne može se korelirati sa sigurnošću, budući da se većina klonova nije mogla blisko identificirati s do sada izoliranim vrstama. Ukoliko je fiziologija klonova slična kultiviranim predstavnicima, može se zaključiti da SRB koje organsku tvar oksidiraju u potpunosti do CO_2 (DCC podskupina) preferiraju zimske, a one koje organsku tvar oksidiraju djelomično do acetata (DSV podskupina) ljetne uvjete.

Brojnost ukupnih bakterijskih zajednica pokazala se vrlo stabilnom tijekom obje istraživane sezone, neovisno o promjenama fizičko-kemijskih uvjeta. U usporedbi s ukupnim bakterijskim zajednicama, brojnost SRB bila je podložnija sezonskim promjenama. Razlike u brojnosti izraženije su u vodenom stupcu, gdje je u odnosu na ljetnu sezonu, u zimskom razdoblju bilo statistički značajno više SRB, što vjerojatno odražava varijabilnije uvjete od onih u sedimentu. Očekivano, brojnost SRB u sedimentu bila je veća nego u vodenom stupcu. Ipak, one su i dalje činile relativno mali dio ukupnih bakterija (do 2,8%). Općenito, analize su pokazale da SRB u Rogozničkom jezeru čine malu frakciju ukupne bakterijske zajednice, iako visoke koncentracije H_2S ukazuju na njihovu visoku biološku aktivnost. Ova diskrepancija može biti uzrokovana činjenicom da su parovi početnica korišteni za njihovu detekciju dizajnirani na temelju do danas poznatih i kultiviranih predstavnika SRB, stoga ne odražavaju stvarnu *in situ* genetičku raznolikost što se i pokazalo detaljnim analizama klonskih knjižnica. Također, poznato je i da analize bazirane na 16S rRNA genu mogu podcijeniti brojnost SRB u okolišu (Wagner i sur.,

2005.). Iako se funkcionalni *dsrAB* gen smatra boljim markerom za procjenu brojnosti SRB u okolišu, analize temeljene i na ovom genu također su potvrdile da SRB čine samo malu frakciju unutar bakterijske zajednice Rogozničkog jezera. Iako u morskim sedimentima SRB mogu činiti i do 26% zajednica (Ravenschlag i sur., 2000.; Koizumi i sur., 2004.; Kondo i sur., 2004.; Leloup i sur., 2004.; Leloup i sur., 2005.), mali udio SRB zabilježen je i u anoksičnim vodenim slojevima Crnog mora u kojima čine svega 0,3 – 9% ukupnih bakterijskih zajednica (Neretin i sur., 2007.). Niska zastupljenost može se objasniti činjenicom da su mikroorganizmi sa specijaliziranim metaboličkim funkcijama obično slabo zastupljeni u biosferi, dok su generalisti mnogo brojniji u ukupnim zajednicama (Inceoglu i sur., 2015.; Lynch i Neufeld, 2015.). Većina SRB ne može koristiti mnogo organskih spojeva, posebno kompleksne organske polimere, stoga su ovisni o drugim mikroorganizmima koji mineraliziraju organsku tvar. Međutim, qPCR analize su pokazale da je DCC podskupna u jezeru brojnija od DSV podskupine. Razlog njihove veće brojnosti vjerojatno je taj što članovi ove podskupine oksidiraju organsku tvar u potpunosti do CO₂ i mogu koristiti širi spektar supstrata (Belila i sur., 2013.).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju taksonomske klasifikacije i utvrđene brojnosti prokariotskih zajednica u Rogozničkom jezeru te detaljnih analiza fizičko-kemijskih čimbenika mogu se donijeti sljedeći zaključci i pretpostavke:

1. Rogozničko jezero predstavlja tipični morski okoliš s meromiktičkim karakteristikama. Vertikalna stabilnost vodenog stupca postojana je kroz duga vremenska razdoblja s povremenom pojavom holomiksije. Izostanak miješanja pridnenih s površinskim slojevima, dovodi do pojave anoksije i posljedično euskinije u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu jezera, dok tijekom holomiksije cijeli vodeni stupac postaje euksiničan.
2. Sastav i raspodjela prokariotskih zajednica u jezeru usko je povezana s okolišnim uvjetima. Ujednačenost u sastavu zajednica tijekom istraživanih sezona odraz je stabilnih uvjeta u kemoklini, monimolimnionu i sedimentu jezera, s jasnim razlikama u vertikalnoj razdiobi dominantnih i jedinstvenih skupina. Nestanak vertikalne stabilnosti vodenog stupca tijekom holomiksije uzrokuje i nestanak „mikrobiološke stratifikacije“.
3. Sezonske razlike unutar prokariotskih zajednice vidljive su na nižim taksonomskim razinama, unutar zajednice sulfat-reducirajućih bakterija (SRB), čija je dinamika najvjerojatnije posljedično definirana vrstom dostupne organske tvari koja dolazi iz miksolimniona. Tijekom zime u jezeru dominiraju SRB koji organsku tvar oksidiraju u potpunosti do CO₂, dok tijekom ljeta dominiraju one koje organsku tvar oksidiraju djelomično do acetata.
4. Niska sličnost identificiranih bakterija s onima dostupnima u bazama podataka ukazuje na postojanje jedinstvenih skupina SRB u euksinskoj zoni Rogozničkog jezera.
5. Dugotrajna vertikalna stabilnost vodenog stupca, kao i visoke koncentracije organske tvari i nutrijenata omogućili su razvoj vrlo raznolike bakterijske zajednice, što se očituje u jednoj od najvećih zabilježenih raznolikosti u meromiktičkim jezerima. Do značajnog pada raznolikosti došlo je tijekom pojave holomiksije, kada su pojava euskinije u cijelom vodenom stupcu, formiranje koloidnog sumpora, povišene vrijednosti NO₂⁻, te jednolika raspodjela organske tvari (posebno DOC-a), doveli do gotovo potpune promjene u strukturi pojedinih taksonomskih skupina te omogućili razvoj nekih koje tijekom stratifikacije nisu bile prisutne.
6. U stratificiranim uvjetima kemoklinom jezera dominira razred *Gammaproteobacteria*, isključivo zastupljeno porodicom *Chromatiaceae*, monimolimnionom dominiraju sulfat-reducirajuće bakterije iz razreda *Deltaproteobacteria* i koljeno *Bacteroidetes*,

dok je značajno veći udio arheja pronađen u sedimentu. Tijekom holomiksije porodica *Chromatiaceae* gotovo u potpunosti je zamijenjena porodicom *Thioglobaceae* (SUP05 klaster), a došlo je i do pojave koljena *Epsilonbacteraeota*, razreda *Chlorobia*, te povećanog udjela razreda *Planctomycetacia*.

7. Ekstremni euksinski okoliš uvelike ograničava taksonomsku i metaboličku raznolikost, koja se svodi na mali broj identificiranih dominantnih skupina koje podupiru funkcioniranje euksinskih zona jezera tijekom stratifikacije. To se očituje u anoksigenoj fotosintezi i proizvodnji ugljika u kemoklini, koji dopijeva u monimolimnion gdje prevladava redukcija sulfata, fermentacija, acetogeneza i u manjoj mjeri anammox. Kemolitautotrofna oksidacija reduciranih sumpornih spojeva dominantan je proces fiksacije ugljika u holomiktičkim uvjetima, tijekom kojih je povećan i udio potencijalnih denitrifikacijskih i anammox bakterija.
8. Nedostatak denitrifikacijskih i mali udio anammox bakterija, vjerojatan reduktivni acetyl-CoA metabolički put (Wood-Ljungdahl put) pri oksidaciji CO i fiksaciji CO₂, te velika mikrobna raznolikost, glavne su značajke Rogozničkog jezera koje mogu odražavati procese koji su se odvijali u davnoj Zemljinoj prošlosti dok je atmosfera bila reduktivna.
9. Veliki dio mikrobne raznolikosti i metaboličkog potencijala Rogozničkog jezera leži u neklasificiranim bakterijama i arhejama koje čine znatan udio prokariotskih zajednica tijekom stratifikacije, dok tijekom holomiksije gotovo u potpunosti nestaju. Njihova fiziologija za sada je nepoznata, a ovi organizmi bi mogli biti nositelji važnih i trenutno podcijenjenih metaboličkih funkcija, koje bi trebale biti predmet budućih istraživanja. Također bi bilo važno i kvantitativno odrediti ove procese i njihovu međusobnu ovisnost.
10. Gubitak određenih metaboličkih puteva vjerojatno je uzrokovan razvojem vrlo specijaliziranih svojti pri stagnantnim uvjetima tijekom stratifikacije, što ovaj okoliš čini jedinstvenim, ali i vrlo osjetljivim.

7. POPIS LITERATURE

- Acosta-Gonzalez, A., Rossello-Mora, R. i Marques, S. (2013.). Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. *Environ Microbiol*, 15, 77-92.
- Alain, K. i Querellou, J. (2009.). Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, 13, 583-594.
- Alonso-Saez, L. i 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 Microb*, 73, 3528-3535.
- Amann, R.L., Ludwig, W. i Schleifer, K.H. (1995.). Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiol Rev*, 59, 143-169.
- Andrei, A.S., Robeson, M.S., Baricz, A., Coman, C., Muntean, V., Ionescu, A. (2015.). Contrasting taxonomic stratification of microbial communities in two hypersaline meromictic lakes. *Isme J*, 9, 2642-2656.
- Arrigo, K.R. (2005.). Marine microorganisms and global nutrient cycles (vol 437, str. 349, 2005.). *Nature*, 438, 122-122.
- Baatar, B., Chiang, P.W., Rogozin, D.Y., Wu, Y.T., Tseng, C.H., Yang, C.Y. i sur., (2016.). Bacterial Communities of Three Saline Meromictic Lakes in Central Asia. *Plos One*, 11.
- Barberan, A. i Casamayor, E.O. (2011.). Euxinic Freshwater Hypolimnia Promote Bacterial Endemicity in Continental Areas. *Microb Ecol*, 61, 465-472.
- Baricz, A., Coman, C., Andrei, A.S., Muntean, V., Keresztes, Z.G., Pausan, M. (2014.). Spatial and temporal distribution of archaeal diversity in meromictic, hypersaline Ocnei Lake (Transylvanian Basin, Romania). *Extremophiles*, 18, 399-413.
- Barić, A., Grbec, B., Kušpilic, G., Marasović, I., Ninčević, Z. i Grubelić, I. (2003.). Mass mortality event in a small saline lake (Lake Rogoznica) caused by unusual holomictic conditions. *Scientia marina*, 67, 129-141.
- Barton, L.L. i Fauque, G.D. (2009.). Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria. *Adv Appl Microbiol*, 68, 41-98.
- Barton, L.L. i Hamilton, W.A. (2007.). *Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems*. Cambridge University Press, 1-38.
- Belila, A., Abbas, B., Fazaa, I., Saidi, N., Snoussi, M., Hassen, A. i sur., (2013.). Sulfur bacteria in wastewater stabilization ponds periodically affected by the 'red-water' phenomenon. *Appl Microbiol Biot*, 97, 379-394.
- Bench-Osmolovskaya, E. i Atomi, H. (2015.). Extremophiles: From extreme environments to highly stable biocatalysts. *Curr Opin Microbiol*, 25, 7-8.

- Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G. (2008.). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456, 53-59.
- Biderre-Petit, C., Jezequel, D., Dugat-Bony, E., Lopes, F., Kuever, J., Borrel, G. (2011.). Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake. *Fems Microbiol Ecol*, 77, 533-545.
- Blaustein, R. (2016.). The Great Oxidation Event. *Bioscience*, 66, 189-195.
- Boehrer, B. i Schultze, M. (2008.). Stratification of lakes. *Rev Geophys*, 46, 1-27.
- Boehrer, B., Kiwel, U., Rahn, K. i Schultze, M. (2014.). Chemocline erosion and its conservation by freshwater introduction to meromictic salt lakes. *Limnologia*, 44, 81-89.
- Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A. (2000.). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407, 623-626.
- Borrel, G., Adam, P.S. i Gribaldo, S. (2016.). Methanogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway: An Ancient, Versatile, and Fragile Association. *Genome Biol Evol*, 8, 1706-1711.
- Bosshard, P.P., Santini, Y., Gruter, D., Stettler, R. i Bachofen, R. (2000.). Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *Fems Microbiol Ecol*, 31, 173-182.
- Bouchez, T., Blieux, A.L., Dequiedt, S., Domaizon, I., Dufresne, A., Ferreira, S. (2016.). Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. *Environ Chem Lett*, 14, 423-441.
- Brooks, G. (1998.). *Biotechnology in Healthcare: An Introduction to Biopharmaceuticals*. The Pharmaceutical Press, 228
- Bryukhanov, A., Korneeva, V. i Pimenov, N. (2015.). Detection of anaerobic sulfate-reducing bacteria in oxygen-containing upper water layers of the Black and Baltic Seas. *Moscow University biological sciences bulletin*, 70, 184-188.
- Buckingham, L. (2011.). *Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications*. FA Davis, 576.
- Buhring, S.I., Sievert, S.M., Jonkers, H.M., Ertefai, T., Elshahed, M.S., Krumholz, L.R. (2011.). Insights into chemotaxonomic composition and carbon cycling of phototrophic communities in an artesian sulfur-rich spring (Zodletone, Oklahoma, USA), a possible analog for ancient microbial mat systems. *Geobiology*, 9, 166-179.
- Bura-Nakić, E., Helz, G.R., Ciglencečki, I. i Čosović, B. (2009.). Reduced sulfur species in a stratified seawater lake (Rogoznica Lake, Croatia); seasonal variations and argument for organic carriers of reactive sulfur. *Geochim Cosmochim Ac*, 73, 3738-3751.

- Burić, Z., Mihalić, K.C., Cetinić, I., Ciglenečki, I., Carić, M., Viličić, D. (2009.). Occurrence of the rare microflagellates *Prorocentrum arcuatum* Issel and *Hermesinum adriaticum* Zacharias in the marine Lake Rogoznica (eastern Adriatic coast). *Acta Adriat*, 50, 31-43.
- Camacho, A., Rochera, C., Silvestre, J.J., Vicente, E. i Hahn, M.W. (2005.). Spatial dominance and inorganic carbon assimilation by conspicuous autotrophic biofilms in a physical and chemical gradient of a cold sulfurous spring: the role of differential ecological strategies. *Microb Ecol*, 50, 172-184.
- Camacho, A., Vicente, E. i Miracle, M.R. (2000.). Spatio-temporal distribution and growth dynamics of phototrophic sulfur bacteria populations in the sulfide-rich Lake Arcas. *Aquat Sci*, 62, 334-349.
- Camacho, A., Vicente, E., Garcia-Gil, L.J., Miracle, M.R., Sendra, M.D., Vila, X. i sur., (2002.). Factors determining changes in the abundance and distribution of micro-, nano- and picoplanktonic phototrophs in Lake El Tobar (Central Spain). *Int Ver Theor Angew*, 28, 613-619.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. (2009.). BLAST+: architecture and applications. *Bmc Bioinformatics*, 10, 421.
- Capone, D.G., Bronk, D.A., Mulholland, M.R. i Carpenter, E.J. (2008.). *Nitrogen in the marine environment*. Academic Press, 1757.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. (2010.). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7, 335-336.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J. (2011.). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *P Natl Acad Sci USA*, 108, 4516-4522.
- Casamayor, E.O., Lliros, M., Picazo, A., Barberan, A., Borrego, C.M. i Camacho, A. (2012.). Contribution of deep dark fixation processes to overall CO₂ incorporation and large vertical changes of microbial populations in stratified karstic lakes. *Aquat Sci*, 74, 61-75.
- Casamayor, E.O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C. i Muyzer, G. (2000.). Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microb*, 66, 499-508.
- Casanueva, A., Galada, N., Baker, G.C., Grant, W.D., Heaphy, S., Jones, B. (2008.). Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. *Extremophiles*, 12, 651-656.
- Ciglenečki I, P.S., Prohić E, Čosović B (2006.). Distribution of redox-sensitive elements in bottom waters, porewaters and sediments of Rogoznica Lake (Croatia) in both oxic and anoxic conditions. *Water, Air and Soil Pollution* 6, 534-545.

- Ciglenečki, I. i Čosović, B. (1997.). Electrochemical determination of thiosulfate in seawater in the presence of elemental sulfur and sulfide. *Electroanal*, 9, 775-780.
- Ciglenečki, I., Janeković, I., Marguš, M., Bura-Nakić, E., Carić, M., Ljubešić, Z. (2015.). Impacts of extreme weather events on highly eutrophic marine ecosystem (Rogoznica Lake, Adriatic coast). *Cont Shelf Res*, 108, 144-155.
- Ciglenečki, I., Kodba, Z., Viličić, D. i Cosovic, B. (1998.). Seasonal variation of anoxic conditions in the Rogoznica Lake. *Croat Chem Acta*, 71, 217-232.
- Ciglenečki, I., Ljubešić, Z., Janeković, I. i Batistić, M. (2017.). Rogoznica Lake, a Euxinic Marine Lake on the Adriatic Coast (Croatia) that Fluctuates Between Anoxic Holomictic and Meromictic Conditions. U: Gulati, R.D., Zadereev, E.S., Degermendzhi, A.G. (ur.). *Ecology of Meromictic Lakes*. Springer, 228, 125-154.
- Clarke, K. i Warwick, R. (1994.). An approach to statistical analysis and interpretation. *Change in Marine Communities*, 2.
- Clarke, K.R. i Gorley, R.N. (2006.). *PRIMER V6: user manual-tutorial*. Plymouth Marine Laboratory, 192.
- Cline, J., Braman, J.C. i Hogrefe, H.H. (1996.). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 24, 3546-3551.
- Corless, C.E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarski, E.B. i Fox, A.J. (2000.). Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol*, 38, 1747-1752.
- Crowe, S.A., Katsev, S., Leslie, K., Sturm, A., Magen, C., Nomosatryo, S. (2011.). The methane cycle in ferruginous Lake Matano. *Geobiology*, 9, 61-78.
- Crump, B.C. i Hobbie, J.E. (2005.). Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Limnol Oceanogr*, 50, 1718-1729.
- Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B. i Westfall, M.V. (2011.). *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. CRC press.
- Dalsgaard, T., Canfield, D.E., Petersen, J., Thamdrup, B. i Acuña-González, J. (2003.). N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*, 422, 606.
- Daly, K., Sharp, R.J. & McCarthy, A.J. (2000.). Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology+*, 146, 1693-1705.
- Dautović, J., Strmečki, S., Pistoréc, B., Vojvodić, V., Plavšić, M., Krivokapić, S. (2012.). Organic Matter in the Karstic Enclosed Bay (Boka Kotorska Bay, South Adriatic Sea). Influence of Freshwater Input. *Fresen Environ Bull*, 21, 995-1006.

- de Wit, R. i Bouvier, T. (2006.). 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ Microbiol*, 8, 755-758.
- Dekas, A.E., Poretsky, R.S. i Orphan, V.J. (2009.). Deep-Sea Archaea Fix and Share Nitrogen in Methane-Consuming Microbial Consortia. *Science*, 326, 422-426.
- Delong, E.F. (1992.). Archaea in Coastal Marine Environments. *P Natl Acad Sci USA*, 89, 5685-5689.
- DeSantis, T.Z., Brodie, E.L., Moberg, J.P., Zubietta, I.X., Piceno, Y.M. i Andersen, G.L. (2007.). High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microb Ecol*, 53, 371-383.
- Diaz, R.J. i Rosenberg, R. (2008.). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321, 926-929.
- Dimitriu, P.A., Pinkart, H.C., Peyton, B.M. i Mormile, M.R. (2008.). Spatial and temporal patterns in the microbial diversity of a meromictic soda lake in Washington State. *Appl Environ Microb*, 74, 4877-4888.
- Domazet-Lošo, T. i Tautz, D. (2008.). An Ancient Evolutionary Origin of Genes Associated with Human Genetic Diseases. *Mol Biol Evol*, 25, 2699-2707.
- Doyle, K. (1996.). DNA sequencing. *The Sources for Discovery, Protocol and Application Guide*. Madison, WI, USA: Promega, 147-162.
- Dunbar, J., Barns, S.M., Ticknor, L.O. i Kuske, C.R. (2002.). Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl Environ Microb*, 68, 3035-3045.
- Durbin, A.M. i Teske, A. (2012.). Archaea in organic-lean and organic-rich marine subsurface sediments: an environmental gradient reflected in distinct phylogenetic lineages. *Front Microbiol*, 3, 168.
- Eiler, A. i Bertilsson, S. (2004.). Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol*, 6, 1228-1243.
- Ekau, W., Auel, H., Portner, H.O. i Gilbert, D. (2010.). Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). *Biogeosciences*, 7, 1669-1699.
- Fang, Y., Wu, W.H., Pepper, J.L., Larsen, J.L., Marras, S.A.E., Nelson, E.A. (2002.). Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *J Clin Microbiol*, 40, 287-291.
- Fernandez-Gomez, B., Richter, M., Schuler, M., Pinhassi, J., Acinas, S.G., Gonzalez, J.M. i sur., (2013.). Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *Isme J*, 7, 1026-1037.
- Ferry, J.G. i Lessner, D.J. (2008.). Methanogenesis in marine sediments. *Ann Ny Acad Sci*, 1125, 147-157.

- Finkel, O.M., Burch, A.Y., Lindow, S.E., Post, A.F. i Belkin, S. (2011.). Geographical Location Determines the Population Structure in Phyllosphere Microbial Communities of a Salt-Excreting Desert Tree. *Appl Environ Microb*, 77, 7647-7655.
- Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K. i Greer, C.W. (2004.). Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J Microbiol Meth*, 56, 181-191.
- Foti, M., Sorokin, D.Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E.E., Pimenov, N.V. i sur., (2007.). Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Appl Environ Microb*, 73, 2093-2100.
- Fuhrman, J.A. (2009.). Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, 459, 193-199.
- Fuhrman, J.A. i Hagström, Å. (2008.). Bacterial and archaeal community structure and its patterns. *Microbial Ecology of the Oceans, Second Edition*, 45-90.
- Fuhrman, J.A., Hewson, I., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Brown, M.V. i Naeem, S. (2006.). Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 13104-13109.
- Fujii, M., Kojima, H., Iwata, T., Urabe, J. i Fukui, M. (2012.). Dissolved organic carbon as major environmental factor affecting bacterioplankton communities in mountain lakes of eastern Japan. *Microb Ecol*, 63, 496-508.
- Garcia-Cantizano, J., Casamayor, E.O., Gasol, J.M., Guerrero, R. i Pedros-Alio, C. (2005.). Partitioning of CO₂ incorporation among planktonic microbial guilds and estimation of in situ specific growth rates. *Microb Ecol*, 50, 230-241.
- Garcia-Gil, L.J., Vicente, E., Camacho, A., Borrego, C.M., Vila, X., Cristina, X.P. i sur., (1999.). Vertical distribution of photosynthetic sulphur bacteria linked to saline gradients in Lake 'El Tobar' (Cuenca, Spain). *Aquat Microb Ecol*, 20, 299-303.
- Gasol, J.M. i Kirchman, D.L. (2018.). *Microbial ecology of the oceans*. John Wiley i Sons, 528.
- Gies, E.A., Konwar, K.M., Beatty, J.T. i Hallam, S.J. (2014.). Illuminating Microbial Dark Matter in Meromictic Sakinaw Lake. *Appl Environ Microb*, 80, 6807-6818.
- Giglio, S., Monis, P.T. i Saint, C.P. (2003.). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res*, 31.
- Gilbert, J.A., Steele, J.A., Caporaso, J.G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B. (2012.). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME journal*, 6, 298.
- Glenn, T.C. (2011.). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular ecology resources*, 11, 759-769.

- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G. i Bailey, M.J. (2000.). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microb*, 66, 5488-5491.
- Grote, J., Labrenz, M., Pfeiffer, B., Jost, G. i Jürgens, K. (2007.). Quantitative distributions of Epsilonproteobacteria and a Sulfurimonas subgroup in pelagic redoxclines of the central Baltic Sea. *Appl Environ Microb*, 73, 7155-7161.
- Gruber, N. (2008.). The marine nitrogen cycle: overview and challenges. *Nitrogen in the marine environment*, 2, 1-50.
- Guiver, M., Borrow, R., Marsh, J., Gray, S.J., Kaczmarek, E.B., Howells, D. (2000.). Evaluation of the Applied Biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *Fems Immunol Med Mic*, 28, 173-179.
- Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G.A.C. i Baird, D.J. (2011.). Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *Plos One*, 6.
- Hall, K.J. i Northcote, T.G. (2012.). Meromictic lakes. In: *Encyclopedia of Lakes and Reservoirs*. Springer, 519-524.
- Hamilton, T.L., Bovee, R.J., Sattin, S.R., Mohr, W., Gilhooly, W.P., Lyons, T.W. (2016.). Carbon and Sulfur Cycling below the Chemocline in a Meromictic Lake and the Identification of a Novel Taxonomic Lineage in the FCB Superphylum, Candidatus Aegiribacteria. *Front Microbiol*, 7.
- Hargrave, B., Holmer, M. i Newcombe, C. (2008.). Towards a classification of organic enrichment in marine sediments based on biogeochemical indicators. *Marine Pollution Bulletin*, 56, 810-824.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. i Williams, P.M. (1996.). Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-994.
- Henstra, A.M., Dijkema, C. i Stams, A.J.M. (2007.). Archaeoglobus fulgidus couples CO oxidation to sulfate reduction and acetogenesis with transient formate accumulation. *Environ Microbiol*, 9, 1836-1841.
- Hohn, M.J., Hedlund, B.P. i Huber, H. (2002.). Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum "Nanoarchaeota": indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *Syst Appl Microbiol*, 25, 551-554.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Will, S., Saiki, R.K. i Gelfand, D.H. (1992.). Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product by Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of Thermus-Aquaticus DNA-Polymerase. *Clin Chem*, 38, 462-463.
- Huber, C. i Wächtershäuser, G. (1997.). Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe,Ni)S under primordial conditions. *Science*, 276, 245-247.

- Huber, J.A., Mark Welch, D., Morrison, H.G., Huse, S.M., Neal, P.R., Butterfield, D.A. (2007.). Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science*, 318, 97-100.
- Hugenholtz, P. (2002.). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3, reviews0003. 0001.
- Hurt, R.A., Qiu, X.Y., Wu, L.Y., Roh, Y., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M. (2001.). Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl Environ Microb*, 67, 4495-4503.
- Imboden, D.M.W., A. (1995.). Mixing mechanisms in lakes. In: *Physics and Chemistry of Lakes* (ur. Lerman A., IDM, Gat J.R.). Springer Berlin, Heidelberg pp. 83-138.
- Inceoglu, O., Lliros, M., Crowe, S.A., Garcia-Armisen, T., Morana, C., Darchambeau, F. i sur., (2015.). Vertical Distribution of Functional Potential and Active Microbial Communities in Meromictic Lake Kivu. *Microb Ecol*, 70, 596-611.
- Jahn, U., Hohn, M.J., Kronner, M., Näther, D.J., Burghardt, T., Rachel, R. (2007.). *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of 'Nanoarchaeum equitans'. *Int J Syst Evol Micr*, 57, 803-808.
- Jensen, M.M., Kuypers, M.M., Gaute, L. i Thamdrup, B. (2008.). Rates and regulation of anaerobic ammonium oxidation and denitrification in the Black Sea. *Limnol Oceanogr*, 53, 23-36.
- Jorgensen, B.B. (1990.). The Sulfur Cycle of Fresh-Water Sediments - Role of Thiosulfate. *Limnol Oceanogr*, 35, 1329-1342.
- Juusola, J. i Ballantyne, J. (2003.). Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Science International*, 135, 85-96.
- Kalvelage, T., Lavik, G., Lam, P., Contreras, S., Arteaga, L., Loscher, C.R. (2013.). Nitrogen cycling driven by organic matter export in the South Pacific oxygen minimum zone. *Nat Geosci*, 6, 228-234.
- Kamysny, A., Zerkle, A.L., Mansaray, Z.F., Ciglenc̆ki, I., Bura-Nakić, E., Farquhar, J. (2011.). Biogeochemical sulfur cycling in the water column of a shallow stratified sea-water lake: Speciation and quadruple sulfur isotope composition. *Mar Chem*, 127, 144-154.
- Kan, J., Suzuki, M.T., Wang, K., Evans, S.E. i Chen, F. (2007.). High temporal but low spatial heterogeneity of bacterioplankton in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microb*, 73, 6776-6789.
- Kasting, J.F. i Siefert, J.L. (2003.). Life and the evolution of Earth's atmosphere (vol 296, str. 1066, 2002). *Science*, 299, 1015-1015.

- Kehayias, G., Ramfos, A., Ntzialas, P., Ioannou, S., Bisouki, P., Kyrtzoglou, E. (2013.). Zooplankton diversity and distribution in a deep and anoxic Mediterranean coastal lake. *Mediterr Mar Sci*, 14, 179-192.
- Khresat, S.A. i Rawajfih, Z. (1999.). Morphological, chemical, and physical characteristics of shrink-swell soils in a Mediterranean semiarid region. *Commun Soil Sci Plan*, 30, 1291-1298.
- Kleinjan, W.E., de Keizer, A. i Janssen, A.J. (2003.). Biologically produced sulfur. In: *Elemental sulfur and sulfur-rich compounds I*. Springer, 167-188.
- Klepac-Ceraj, V., Hayes, C.A., Gilhooly, W.P., Lyons, T.W., Kolter, R. i Pearson, A. (2012.). Microbial diversity under extreme euxinia: Mahoney Lake, Canada. *Geobiology*, 10, 223-235.
- Koizumi, Y., Kojima, H., Oguri, K., Kitazato, H. i Fukui, M. (2004.). Vertical and temporal shifts in microbial communities in the water column and sediment of saline meromictic Lake Kaiike (Japan), as determined by a 16S rDNA-based analysis, and related to physicochemical gradients. *Environ Microbiol*, 6, 622-637.
- Kondo, R. i Butani, J. (2007.). Comparison of the diversity of sulfate-reducing bacterial communities in the water column and the surface sediments of a Japanese meromictic lake. *Limnology*, 8, 131-141.
- Kondo, R., Nedwell, D.B., Purdy, K.J. i Silva, S.Q. (2004.). Detection and enumeration of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments by competitive PCR. *Geomicrobiology Journal*, 21, 145-157.
- Kožich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. i Schloss, P.D. (2013.). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl Environ Microb*, 79, 5112-5120.
- Krstulović, N. i Šolić, M. (2001.). Distribution of phototrophic sulfur bacteria throughout the time scale of the anoxic water renewal in the Rogoznica lake. *Fresen Environ Bull*, 10, 586-589.
- Kršinić, F., Carić, M., Viličić, D. i Ciglencečki, I. (2000.). The calanoid copepod *Acartia italica* Steuer, phenomenon in the small saline Lake Rogoznica (Eastern Adriatic coast). *Journal of plankton research*, 22, 1441-1464.
- Kršinić, F., Ciglencečki, I., Ljubešić, Z. i Viličić, D. (2013.). Population dynamics of the calanoid copepod *Acartia italica* Steurer in a small saline lake. *Acta Adriat*, 54, 229-239.
- Kubo, K., Kojima, H. i Fukui, M. (2014.). Vertical distribution of major sulfate-reducing bacteria in a shallow eutrophic meromictic lake. *Syst Appl Microbiol*, 37, 510-519.
- Kuenen, J.G. (2008.). Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Rev Microbiol*, 6, 320-326.

- Kuypers, M.M., Lavik, G. i Thamdrup, B. (2006.). Anaerobic ammonium oxidation in the marine environment. U: *Past and present water column anoxia*. Springer, 311-335.
- Labrenz, M., Jost, G., Pohl, C., Beckmann, S., Martens-Habbena, W. i Jürgens, K. (2005.). Impact of different in vitro electron donor/acceptor conditions on potential chemolithoautotrophic communities from marine pelagic redoxclines. *Appl Environ Microb*, 71, 6664-6672.
- Lam, P. i Kuypers, M.M. (2011.a). Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Annual review of marine science*, 3, 317-345.
- Lam, P. i Kuypers, M.M.M. (2011.b). Microbial Nitrogen Cycling Processes in Oxygen Minimum Zones. *Annu Rev Mar Sci*, 3, 317-345.
- Lane, D. (1991.). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons, 115–175.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. i Pace, N.R. (1985.). Rapid-Determination of 16s Ribosomal-Rna Sequences for Phylogenetic Analyses. *P Natl Acad Sci USA*, 82, 6955-6959.
- Lauro, F.M., DeMaere, M.Z., Yau, S., Brown, M.V., Ng, C., Wilkins, D. (2011.). An integrative study of a meromictic lake ecosystem in Antarctica. *Isme J*, 5, 879-895.
- Lavik, G., Stührmann, T., Brüchert, V., Van der Plas, A., Mohrholz, V., Lam, P. (2009.). Detoxification of sulphidic African shelf waters by blooming chemolithotrophs. *Nature*, 457, 581.
- Lay, C.Y., Mykytczuk, N.C.S., Yergeau, E., Lamarche-Gagnon, G., Greer, C.W. i Whyte, L.G. (2013.). Defining the Functional Potential and Active Community Members of a Sediment Microbial Community in a High-Arctic Hypersaline Subzero Spring. *Appl Environ Microb*, 79, 3637-3648.
- Lehours, A.C., Bardot, C., Thenot, A., Debroas, D. i Fonty, G. (2005.). Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. *Appl Environ Microb*, 71, 7389-7400.
- Lehours, A.C., Evans, P., Bardot, C., Joblin, K. i Gerard, F. (2007.). Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in the anoxic zone of a meromictic lake (Lake Pavin, France). *Appl Environ Microb*, 73, 2016-2019.
- Leloup, J., Quillet, L., Berthe, T. i Petit, F. (2005.). Diversity of the dsrAB (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *Fems Microbiol Ecol*, 55, 230-238.
- Leloup, J., Quillet, L., Oger, C., Boust, D. i Petit, F. (2004.). Molecular quantification of sulfate-reducing microorganisms (carrying dsrAB genes) by competitive PCR in estuarine sediments. *Fems Microbiol Ecol*, 47, 207-214.

- Lemos, L.N., Fulthorpe, R.R., Triplett, E.W. i Roesch, L.F. (2011.). Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *J Microbiol Meth*, 86, 42-51.
- Li, X.H., Duan, J.Z., Xiao, H., Li, Y.Q., Liu, H.X., Guan, F. (2017.). Analysis of Bacterial Community Composition of Corroded Steel Immersed in Sanya and Xiamen Seawaters in China via Method of Illumina MiSeq Sequencing. *Front Microbiol*, 8.
- Lim, Y.W., Kim, B.K., Kim, C., Jung, H.S., Kim, B.S., Lee, J.H. i sur., (2010.). Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *J Microbiol*, 48, 284-289.
- Lin, X., Wakeham, S.G., Putnam, I.F., Astor, Y.M., Scranton, M.I., Chistoserdov, A.Y. (2006.). Comparison of vertical distributions of prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco Basin and Black Sea by use of fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microb*, 72, 2679-2690.
- Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W. i Deetz, K. (1995.). Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting Pcr Product and Nucleic-Acid Hybridization. *Pcr Meth Appl*, 4, 357-362.
- Lliros, M., Garcia-Armisen, T., Darchambeau, F., Morana, C., Triado-Margarit, X., Inceoglu, O. (2015.). Pelagic photoferrotrophy and iron cycling in a modern ferruginous basin. *Sci Rep-Uk*, 5.
- Llorens-Mares, T., Yooseph, S., Goll, J., Hoffman, J., Vila-Costa, M., Borrego, C.M. (2015.). Connecting biodiversity and potential functional role in modern euxinic environments by microbial metagenomics. *Isme J*, 9, 1648-1661.
- Lobo, A.L. i Zinder, S.H. (1988.). Diazotrophy and Nitrogenase Activity in the Archaeobacterium *Methanosarcina-Barkeri* 227. *Appl Environ Microb*, 54, 1656-1661.
- Love, J.L., Scholes, P., Gilpin, B., Savill, M., Lin, S. i Samuel, L. (2006.). Evaluation of uncertainty in quantitative real-time PCR. *J Microbiol Meth*, 67, 349-356.
- Luna, G.M., Dell'Anno, A. i Danovaro, R. (2006.). DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environ Microbiol*, 8, 308-320.
- Lynch, M.D. i Neufeld, J.D. (2015.). Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol*, 13, 217.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. i Parker, J. (2017.). *Brock biology of microorganisms*. Pearson.
- Maier, R.M., Pepper, I.L. i Gerba, C.P. (2009.). *Environmental microbiology*. Academic press, 589, 124-132.
- Manske, A.K., Glaeser, J., Kuypers, M.M. i Overmann, J. (2005.). Physiology and phylogeny of green sulfur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the Black Sea. *Appl Environ Microb*, 71, 8049-8060.
- Martinez-Garcia, M., Brazel, D.M., Swan, B.K., Arnosti, C., Chain, P.S., Reitenga, K.G. (2012.). Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: an unexpected contribution of Verrucomicrobia. *Plos One*, 7, e35314.

- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G. (2001.). DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods (vol 67, pg 2354, 2001). *Appl Environ Microb*, 67, 4397-4397.
- Massana, R., Murray, A.E., Preston, C.M. i DeLong, E.F. (1997.). Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microb*, 63, 50-56.
- Melack, J.M. (2002.). Ecological dynamics in saline lakes. *International Association of Theoretical and Applied Limnology, Vol 28, Pt 1, Proceedings*, 28, 29-40.
- Metzker, M.L. (2010.). Applications Of Next-Generation Sequencing. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11, 31-46.
- Meyer, K.M. i Kump, L.R. (2008.). Oceanic euxinia in Earth history: Causes and consequences. *Annu Rev Earth Pl Sc*, 36, 251-288.
- Mihelčić, G., Surija, B., Juračić, M., Barišić, D. i Branica, M. (1996.). History of the accumulation of trace metals in sediments of the saline Rogoznica Lake (Croatia). *Sci Total Environ*, 182, 105-115.
- Miracle, M., Vicente, E. i Pedrós-Alió, C. (1992.). Biological studies of Spanish meromictic and stratified karstic lakes. *Limnetica*, 8, 59-77.
- Mizrahi-Man, O., Davenport, E.R. i Gilad, Y. (2013.). Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *Plos One*, 8.
- Muller, A.L., Kjeldsen, K.U., Rattei, T., Pester, M. i Loy, A. (2015.). Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi) sulfite reductases. *Isme J*, 9, 1152-1165.
- Mullis, K.B. i Faloona, F.A. (1989.). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Recombinant DNA Methodology*. Elsevier, pp. 189-204.
- Munn, C. (2011.). *Marine microbiology: Ecology and Applications*. Garland Science, 2. izdanje, 49-60.
- Munson-McGee, J.H., Field, E.K., Bateson, M., Rooney, C., Stepanauskas, R. i Young, M.J. (2015.). Nanoarchaeota, their sulfobales host, and Nanoarchaeota virus distribution across Yellowstone National Park Hot Springs. *Appl Environ Microb*, 81, 7860-7868.
- Musat, N., Halm, H., Winterholler, B., Hoppe, P., Peduzzi, S., Hillion, F. (2008.). A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria. *P Natl Acad Sci USA*, 105, 17861-17866.
- Muyzer, G. i Stams, A.J.M. (2008.). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 6, 441-454.
- Muzzey, D., Evans, E.A. i Lieber, C. (2015.). Understanding the basics of NGS: from mechanism to variant calling. *Current genetic medicine reports*, 3, 158-165.

- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A. i Hunter, N. (2002.). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiol-Sgm*, 148, 257-266.
- Nazina, T.N., Ivanova, A.E., Kanchaveli, L.P. i Rozanova, E.P. (1988.). A New Spore-Forming Thermophilic Methylophilic Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulfotomaculum-Kuznetsovii* Sp-Nov. *Microbiology+*, 57, 659-663.
- Neretin, L. N., Abed, R. M. M., Schippers, A., Schubert, C. J., Kohls, K., Kuypers, M. M. M. (2007.). Inorganic carbon fixation by sulfate-reducing bacteria in the Black Sea water column. *Env Microbiol*, 12, 3019-3024.
- Ng, C., DeMaere, M.Z., Williams, T.J., Lauro, F.M., Raftery, M., Gibson, J.A. (2010.). Metaproteogenomic analysis of a dominant green sulfur bacterium from Ace Lake, Antarctica. *The ISME Journal*, 4, 1002.
- Noguerola, I., Picazo, A., Lliros, M., Camacho, A. i Borrego, C.M. (2015.a). Diversity of freshwater Epsilonproteobacteria and dark inorganic carbon fixation in the sulphidic redoxcline of a meromictic karstic lake. *Fems Microbiol Ecol*, 91, 7.
- Nunoura, T., Nishizawa, M., Kikuchi, T., Tsubouchi, T., Hirai, M., Koide, O. et al. (2013.). Molecular biological and isotopic biogeochemical prognoses of the nitrification-driven dynamic microbial nitrogen cycle in hadopelagic sediments. *Environ Microbiol*, 15, 3087-3107.
- Ohan, N.W. i Heikkila, J.J. (1993.). Reverse transcription-polymerase chain reaction: an overview of the technique and its applications. *Biotechnology advances*, 11, 13-29.
- Okafor, N. (2011.). *Environmental microbiology of aquatic and waste systems*, Department of Biological Sciences, Clemson University, South Carolina, SAD. Springer, Nizozemska, 307, 123-148.
- Ollivier, B., Cordruwisch, R., Hatchikian, E.C. i Garcia, J.L. (1988.). Characterization of *Desulfovibrio-Fructosovorans* Sp-Nov. *Arch Microbiol*, 149, 447-450.
- O'Malley, M.A. i Dupre, J. (2007.). Size doesn't matter: towards a more inclusive philosophy of biology. *Biol Philos*, 22, 155-191.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D. i DeLong, E.F. (2002.a). Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 7663-7668.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D. i DeLong, E.F. (2002.b). Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *P Natl Acad Sci USA*, 99, 7663-7668.
- Overmann, J. i van Gemerden, H. (2000.). Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities. *Fems Microbiol Rev*, 24, 591-599.

- Pace, N.R., Sapp, J. i Goldenfeld, N. (2012.). Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. *P Natl Acad Sci USA*, 109, 1011-1018.
- Parfrey, L.W., Lahr, D.J.G., Knoll, A.H. i Katz, L.A. (2011.). Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *P Natl Acad Sci USA*, 108, 13624-13629.
- Parkin, T. i Brock, T. (1980.). Photosynthetic bacterial production in lakes: the effects of light intensity. *Limnol Oceanogr*, 25, 711-718.
- Peduzzi, S., Storelli, N., Welsh, A., Peduzzi, R., Hahn, D., Perret, X. (2012.). Candidatus "*Thiodictyon syntrophicum*", sp nov., a new purple sulfur bacterium isolated from the chemocline of Lake Cadagno forming aggregates and specific associations with *Desulfocapsa* sp. *Syst Appl Microbiol*, 35, 139-144.
- Pfaffl, M.W. (2012.). Quantification strategies in real-time polymerase chain reaction. *Applied Microbiology*. Caister Academic Press; Norfolk, UK, 53-61.
- Pfennig, N., Widdel, F. i Trüper, H.G. (1981.). The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In: *The prokaryotes*. Springer, 926-940.
- Pjevac, P., Korlević, M., Berg, J.S., Bura-Nakić, E., Ciglencečki, I., Amann, R. (2015.). Community Shift from Phototrophic to Chemotrophic Sulfide Oxidation following Anoxic Holomixis in a Stratified Seawater Lake. *Appl Environ Microb*, 81, 298-308.
- Polz, M.F. i Cavanaugh, C.M. (1998.). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microb*, 64, 3724-3730.
- Porubsky, W., Weston, N. i Joye, S. (2009.). Benthic metabolism and the fate of dissolved inorganic nitrogen in intertidal sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 83, 392-402.
- Pruesse, E., Peplies, J. i Glöckner, F.O. (2012.). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28, 1823-1829.
- Pulleman, M., Creamer, R., Hamer, U., Helder, J., Pelosi, C., Peres, G. (2012.). Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services-an overview of European approaches. *Curr Opin Env Sust*, 4, 529-538.
- Qiu, X.Y., Wu, L.Y., Huang, H.S., McDonel, P.E., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M. (2001.). Evaluation of PCR-generated chimeras: Mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microb*, 67, 880-887.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P. (2013.). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41, D590-D596.
- Ragsdale, S.W. i Pierce, E. (2008.). Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Bba-Proteins Proteom*, 1784, 1873-1898.

- Raskin, L., Rittmann, B.E. i Stahl, D.A. (1996.). Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl Environ Microb*, 62, 3847-3857.
- Rastogi, G. i Sani, R.K. (2011.). Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: *Microbes and microbial technology*. Springer, pp. 29-57.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jørgensen, B.B. i Amann, R. (2000.). Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl Environ Microb*, 66, 3592-3602.
- Reeburgh, W.S. (2007.). Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev*, 107, 486-513.
- Reis, M.A.M., Almeida, J.S., Lemos, P.C. i Carrondo, M.J.T. (1992.). Effect of Hydrogen-Sulfide on Growth of Sulfate Reducing Bacteria. *Biotechnol Bioeng*, 40, 593-600.
- Rika E, A., Mónica Torres, B., Steven J, H. i John A, B. (2013.). Microbial community structure across fluid gradients in the Juan de Fuca Ridge hydrothermal system. *Fems Microbiol Ecol*, 83, 324-339.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.-F. (2013.). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499, 431.
- Ristov, A.A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Hranilović, D., Herak Bosnar, M., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (ur.) (2007.). *Metode u molekularnoj biologiji*. Institut Ruđer Bošković, Zagreb. 384-389, 475-482.
- Rogozin, D.Y., Trusova, M.Y., Khromechek, E.B. i Degermendzhy, A.G. (2010). Microbial community of the chemocline of the meromictic Lake Shunet (Khakassia, Russia) during summer stratification. *Microbiology+*, 79, 253-261.
- Ross, M.G., Russ, C., Costello, M., Hollinger, A., Lennon, N.J., Hegarty, R. (2013.). Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biology*, 14.
- Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A.R. (1977.). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74, 5463-5467.
- Schloss, P.D. i Handelsman, J. (2005.). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microb*, 71, 1501-1506.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. (2009.). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microb*, 75, 7537-7541.

- Schultze, M., Boehrer, B., Wendt-Potthoff, K., Katsev, S. i Brown, E.T. (2017.). Chemical Setting and Biogeochemical Reactions in Meromictic Lakes. U: *Ecology of Meromictic Lakes*. Springer, pp. 35-59.
- Schuster, S.C. (2008.). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods*, 5, 16-18.
- Selig, U., Hubener, T., Heerkloss, R. i Schubert, H. (2004.). Vertical gradient of nutrients in two dimictic lakes - influence of phototrophic sulfur bacteria on nutrient balance. *Aquat Sci*, 66, 247-256.
- Shade, A., Kent, A.D., Jones, S.E., Newton, R.J., Triplett, E.W. i McMahon, K.D. (2007.). Interannual dynamics and phenology of bacterial communities in a eutrophic lake. *Limnol Oceanogr*, 52, 487-494.
- Sharma, S.K., Ramesh, A., Sharma, M.P., Joshi, O.P., Govaerts, B., Steenwerth, K.L. (2010.). Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality. U: *Biodiversity, biofuels, agroforestry and conservation agriculture*. Springer, pp. 317-358.
- Shen, Y.N. i Buick, R. (2004.). The antiquity of microbial sulfate reduction. *Earth-Sci Rev*, 64, 243-272.
- Shendure, J. i Ji, H.L. (2008.). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 26, 1135-1145.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F. i Hajibabaei, M. (2012.). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol*, 21, 1794-1805.
- Smith, C.J. i Osborn, A.M. (2009.). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *Fems Microbiol Ecol*, 67, 6-20.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F. i Osborn, A.M. (2006.). Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ Microbiol*, 8, 804-815.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R. (2006.). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *P Natl Acad Sci USA*, 103, 12115-12120.
- Sorokin, D.Y., Berben, T., Melton, E.D., Overmars, L., Vavourakis, C.D. i Muyzer, G. (2014.). Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*, 18, 791-809.
- Speksnijder, A.G.C.L., Kowalchuk, G.A., De Jong, S., Kline, E., Stephen, J.R. i Laanbroek, H.J. (2001.). Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microb*, 67, 469-472.

- Staley, J.T. i Konopka, A. (1985.). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Reviews in Microbiology*, 39, 321-346.
- Stein, L.D. (2004.). Human genome - End of the beginning. *Nature*, 431, 915-916.
- Strickland, J.D. i Parsons, T.R. (1972.). A practical handbook of seawater analysis.
- Sundh, I. (1992.). Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microb*, 58, 2938-2947.
- Suzuki, M.T. i Giovannoni, S.J. (1996.). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microb*, 62, 625-630.
- Svensen, C., Riser, C.W., Cetinić, I. i Carić, M. (2008.). Vertical flux regulation and plankton composition in a simple ecological system: snapshots from the small marine Lake Rogoznica (Croatia). *Acta Adriat*, 49, 37-51.
- Swan, B.K., Martinez-Garcia, M., Preston, C.M., Sczyrba, A., Woyke, T., Lamy, D. (2011.). Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. *Science*, 333, 1296-1300.
- Šestanović, S., Šolić, M., Krstulović, N., Šegvić, D. & Ciglencečki, I. (2005.). Vertical structure of microbial community in an eutrophic meromictic Saline Lake. *Fresen Environ Bull*, 14, 668-675.
- Tabor, S. i Richardson, C.C. (1989.). Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7 DNA polymerase by in vitro mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 6447-6458.
- Tang, K., Baskaran, V. i Nemati, M. (2009.). Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochem Eng J*, 44, 73-94.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. i Higgins, D.G. (1997.). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25, 4876-4882.
- Tiodjio, R.E., Sakatoku, A., Issa, Fantong, W.Y., Tchakam, K.B., Tanyileke, G. (2016.). Vertical distribution of bacteria and archaea in a CO₂-rich meromictic lake: A case study of Lake Monoun. *Limnologica*, 60, 6-19.
- Tiodjio, R.E., Sakatoku, A., Nakamura, A., Tanaka, D., Fantong, W.Y., Tchakam, K.B. (2014.). Bacterial and archaeal communities in Lake Nyos (Cameroon, Central Africa). *Sci Rep-Uk*, 4.
- Tonolla, M., Peduzzi, S., Hahn, D. i Peduzzi, R. (2003.). Spatio-temporal distribution of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *Fems Microbiol Ecol*, 43, 89-98.

- Torsvik, V. i Ovreas, L. (2002.). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 5, 240-245.
- Tuomi, P., Torsvik, T., Heldal, M. i Bratbak, G. (1997.). Bacterial population dynamics in a meromictic lake. *Appl Environ Microb*, 63, 2181-2188.
- Van Der Gucht, K., Sabbe, K., De Meester, L., Vloemans, N., Zwart, G., Gillis, M. (2001.). Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environ Microbiol*, 3, 680-690.
- Vaquer-Sunyer, R. i Duarte, C.M. (2008.). Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *P Natl Acad Sci USA*, 105, 15452-15457.
- von Rohden, C., Ilmberger, J. i Boehrer, B. (2009.). Assessing groundwater coupling and vertical exchange in a meromictic mining lake with an SF6-tracer experiment. *J Hydrol*, 372, 102-108.
- Wagner, M., Loy, A., Klein, M., Lee, N., Ramsing, N.B., Stahl, D.A. (2005.). Functional marker genes for identification of sulfate-reducing prokaryotes. *Methods in enzymology*, 397, 469-489.
- Waite, D.W., Vanwonterghem, I., Rinke, C., Parks, D.H., Zhang, Y., Takai, K. (2017.). Comparative genomic analysis of the class Epsilonproteobacteria and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). *Front Microbiol*, 8, 682.
- Walsh, D.A., Zaikova, E., Howes, C.G., Song, Y.C., Wright, J.J., Tringe, S.G. (2009.). Metagenome of a versatile chemolithoautotroph from expanding oceanic dead zones. *Science*, 326, 578-582.
- Watanabe, K., Kodama, Y. i Harayama, S. (2001.). Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J Microbiol Meth*, 44, 253-262.
- Wellington, E.M.H., Berry, A. i Krsek, M. (2003.). Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Curr Opin Microbiol*, 6, 295-301.
- Widdel, F. (1988.). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. *Biology of Anaerobic Microorganisms.*, 469-585.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. i Rasmussen, R.P. (2013.). Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *Biotechniques*, 54, 314-320.
- Woese, C.R., Kandler, O. i Wheelis, M.L. (1990.). Towards a Natural System of Organisms - Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *P Natl Acad Sci USA*, 87, 4576-4579.
- Wright, J.J., Konwar, K.M. i Hallam, S.J. (2012.). Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones. *Nat Rev Microbiol*, 10, 381-394.

- Yakimov, M.M., La Cono, V., Denaro, R., D'auria, G., Decembrini, F., Timmis, K.N. (2007.). Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L'Atalante, Eastern Mediterranean Sea. *The ISME journal*, 1, 743.
- Yang, B., Wang, Y. i Qian, P.Y. (2016.). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *Bmc Bioinformatics*, 17.
- Yau, S., Lauro, F.M., Williams, T.J., DeMaere, M.Z., Brown, M.V., Rich, J. (2013.). Metagenomic insights into strategies of carbon conservation and unusual sulfur biogeochemistry in a hypersaline Antarctic lake. *Isme J*, 7, 1944-1961.
- Yi, J., Dong, B., Jin, J.W. i Dai, X.H. (2014.). Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis. *Plos One*, 9.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. i Hwang, S. (2005.). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*, 89, 670-679.
- Yurkova, N., Rathgeber, C., Swiderski, J., Stackebrandt, E., Beatty, J.T., Hall, K.J. (2002.). Diversity, distribution and physiology of the aerobic phototrophic bacteria in the mixolimnion of a meromictic lake. *Fems Microbiol Ecol*, 40, 191-204.
- Zachara, J.M., Moran, J.J., Resch, C.T., Lindemann, S.R., Felmy, A.R., Bowden, M.E. (2016.). Geo- and biogeochemical processes in a heliothermal hypersaline lake. *Geochim Cosmochim Acta*, 181, 144-163.
- Zadereev, E.S., Boehrer, B., Gulati, R.D. (2017.). Meromictic Lakes, Their Terminology and Geographic Distribution. U: Gulati, R.D., Zadereev, E.S., Degermendzhi, A.G. (ur.). *Ecology of Meromictic Lakes*. Springer, 228, 1-14.
- Zagami, G. i Brugnano, C. (2013.). Diel, seasonal and man-induced changes in copepod assemblages and diversity, with special emphasis on hyperbenthic calanoid species, in a Mediterranean meromictic system (Lake Faro). *Mar Freshwater Res*, 64, 951-964.
- Zehnder, A.J. (1988.). *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons Inc., 872, 471-575.
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. i Zhang, G.F. (2011.). The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics*, 38, 95-109.
- Žic, V. i Branica, M. (2006.). The distributions of iodate and iodide in Rogoznica Lake (East Adriatic Coast). *Estuar Coast Shelf S*, 66, 55-66.
- Žic, V., Carić, M. i Ciglencečki, I. (2013.). The impact of natural water column mixing on iodine and nutrient speciation in a eutrophic anchialine pond (Rogoznica Lake, Croatia). *Estuar Coast Shelf S*, 133, 260-272.

8. PRILOZI

	D [m]	T [°C]	O ₂ [mg/l]	s	pH	ORP	NH ₄ ⁺ [µM]	NO ₂ ⁻ [µM]	NO ₃ ⁻ [µM]	PO ₄ ⁻³ [µM]	DOC [mg/l]	POC [mg/l]	H ₂ S [M]	SP [M]	
15. srpnja 2015.	0	28,9	9,02	30,3	7,93	135	14,059	0,037	0,293	0,152	1,392	0,449	7,86E-09	8,28E-09	
	0,5	28,8	9,02	30,4	7,95	131	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	1	28,6	9,05	30,4	7,95	131,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	1,5	28,5	9,1	30,4	7,95	129,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	2	28,6	9,08	30,5	7,96	128,8	4,421	0,043	0,167	0,233	1,302	0,009	9,07E-09	1,04E-08	
	2,5	28,5	9,04	30,5	7,87	127,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	28,5	9,05	30,5	7,97	125,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3,5	28,5	9,42	30,5	7,95	124,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	28,2	10,24	30,5	7,95	124,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4,5	28,1	10,23	30,6	7,96	123,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5	28	9,76	30,6	7,97	122,3	0,385	0,043	0,197	0,152	1,217	0,395	1,74E-08	1,67E-08	
	5,5	27,9	9,8	30,6	7,97	121,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	6	27,9	9,55	30,7	7,95	121,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6,5	27,9	9,6	30,7	7,85	120,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
7	27,8	9,44	30,8	7,95	120,5	4,782	0,057	0,243	0,193	1,264	0,582	1,59E-08	2,94E-08		
7,5	28,1	10,35	31,5	7,97	120,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
8	29,4	9,59	34,1	7,87	120,9	2,633	0,059	0,182	0,198	1,447	0,468	1,49E-08	1,18E-08		
8,5	29,9	2,92	34,7	7,5	123,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
9	29,5	0,6	34,9	7,42	124,1	1,591	0,088	0,162	0,730	2,576	0,936	1,78E-08	1,52E-08		
9,5	27,1	0,21	34,8	6,85	-333,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10	24,7	0,17	34,7	6,85	-347,8	118,115	0,130	0,000	8,918	3,182	2,480	6,13E-04	1,86E-05		
10,5	22,8	0,14	34,6	6,85	-351,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
11	21,4	0,14	34,6	6,84	-356,8	239,639	0,120	0,000	11,534	2,953	2,919	8,05E-04	1,22E-04		
11,5	20,6	0,13	34,6	6,83	-359,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
12	19,6	0,14	34,7	6,82	-362,8	148,151	0,060	0,000	12,858	4,789	3,545	1,08E-03	9,37E-05		
12,5	19	0,14	34,8	6,82	-368,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
13	18,7	0,15	34,7	6,81	-370,8	23,613	0,160	0,000	13,856	4,270	3,896	2,81E-03	5,02E-05		
23. rujna 2015.	0	24,7	6,88	32,1	8	72	2,011	0,047	0,211	0,208	1,897	0,126	1,61E-09	5,94E-09	
	0,5	24,8	6,83	32,1	8,02	69,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	1	24,8	6,84	32,1	8,03	69,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	1,5	24,8	6,83	32,1	8,04	68,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	2	24,9	6,81	32,1	8,05	68,5	1,151	0,043	0,059	0,314	1,374	0,342	4,43E-09	5,18E-09	
	2,5	24,9	6,78	32,1	8,05	68,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	3	24,9	6,7	32,1	8,05	67,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	3,5	24,9	6,75	32,1	8,05	64,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	4	24,9	6,69	32,1	8,06	66,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	4,5	24,9	6,69	32,1	8,05	66,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	5	24,9	6,7	32,1	8,06	65,5	1,833	0,041	0,274	0,208	1,408	0,363	2,32E-09	3,26E-09	
	5,5	24,9	6,69	32,1	8,06	65,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	6	24,9	6,63	32,2	8,06	64,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6,5	24,9	6,57	32,2	8,06	64,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
7	24,9	6,6	32,2	8,06	64,4	0,815	0,049	0,264	0,243	1,374	0,414	2,35E-09	2,63E-09		
7,5	24,9	6,58	32,2	8,06	64,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
8	24,9	6,54	32,2	8,06	63,9	1,028	0,051	0,221	0,355	1,319	0,325	1,05E-08	4,66E-09		
8,5	25,2	3,5	33	7,9	63,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
9	26,3	0,35	35	7,4	-305,6	104,975	0,069	0,000	3,047	2,957	3,671	3,23E-04	4,71E-06		
9,5	26,6	0,2	35,2	7,03	-328,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10	26	0,17	35,1	6,98	-347,9	254,064	0,096	0,000	7,828	3,354	0,886	1,19E-03	7,73E-06		
10,5	25	0,19	35	6,96	-359,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
11	23,3	1,14	35	6,96	-379,2	114,756	0,116	0,000	10,789	3,693	2,764	1,97E-03	6,10E-05		
11,5	22,2	0,14	34,9	6,96	-386,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
12	20,9	0,09	33	6,97	-392,7	100,924	0,064	0,000	18,140	3,988	3,378	2,97E-03	1,72E-05		
12,5	20,8	0,09	30,3	6,96	-395,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
13	20,8	0,08	30,2	6,96	-402,1	54,636	0,577	0,000	20,777	4,642	4,154	2,78E-03	1,65E-05		
24. listopada 2016.	0	19,4	0,4	31,2	7,43	-109	55,822	0,230	1,250	1,744	1,634	0,458	3,26E-05	2,037E-06	
	0,5	20,7	0,44	32,9	7,44	-100,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	1	21	0,4	33,1	7,46	-96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	1,5	21,2	0,25	33,6	7,5	-90,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	2	20,9	0,15	33,7	7,51	-89,1	61,552	0,300	0,270	2,170	1,604	2,863	8,788E-06	2,215E-06	
	2,5	20,6	0,14	33,6	7,52	-145,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	20,3	0,13	33,7	7,47	-191,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3,5	20,2	0,13	33,7	7,44	-211,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	20,2	0,13	33,7	7,43	-233,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4,5	20,1	0,11	33,7	7,43	-232,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5	20,1	0,11	33,8	7,42	-239	73,902	0,172	0,208	3,088	1,601	1,247	1,384E-05	2,591E-06	
	5,5	20,1	0,1	33,8	7,42	-243,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	6	20	0,1	33,8	7,42	-249,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6,5	20,1	0,1	33,8	7,41	-253	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
7	20,1	0,09	33,8	7,41	-256,9	90,797	0,088	0,382	3,590	1,440	0,858	6,564E-06	2,958E-06		
7,5	20,1	0,08	33,8	7,41	-259,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
8	20,1	0,08	33,9	7,41	-262,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
8,5	20,1	0,09	33,9	7,41	-265,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
9	20,1	0,08	33,9	7,41	-268,3	52,463	0,080	0,000	3,366	1,276	0,726	3,688E-05	1,301E-06		
9,5	20,1	0,07	33,9	7,4	-271,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10	20,1	0,07	33,9	7,39	-274,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10,5	20,1	0,06	33,9	7,38	-277,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
11	20,2	0,07	34,1	7,23	-284,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
11,5	20,5	0,07	35,3	7,02	-316,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
12	20,6	0,1	35,3	7	-334,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
12,5	20,6	0,13	35,3	7	-347,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
13	20,7	0,14	35,6	6,98	-366,5	144,841	0,090	0,000	10,561	2,848	1,320	2,368E-03	1,056E-04		

„ND“ – nije determinirano

Tablica II. Broj sekvenci, OTU-a, Shannonov indeks, Chao1 procjeitelj, ACE i Coverage u različitim uzorcima Rogozničkog jezera tijekom stratifikacije i holomiksije.

SEZONA	SLOJ	Broj sekvenci	Broj OTU-a	Shannonov indeks (H')	Chao1	ACE	Coverage (%)
Zima	Kemoklina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Kemoklina*	26361	1268	2,55	2092,33	2314,40	95,49
	Monimolimnion	48276	2297	6,89	2055,15	2032,72	94,83
	Monimolimnion*	50485	2613	5,82	2358,36	2374,74	94,46
	Sediment	24740	2833	9,74	9535,74	10010,72	97,92
	Sediment*	44294	7257	9,21	8371,94	9043,85	81,72
Proljeće	Kemoklina	34370	1773	7,03	2071,07	1963,91	95,35
	Kemoklina*	49194	1656	2,68	1645,45	1813,72	96,15
	Monimolimnion	63053	3412	7,33	2894,62	2927,07	92,92
	Monimolimnion*	53680	2707	5,58	2643,52	2776,92	94,12
	Sediment	17025	6711	7,91	1039,84	964,81	97,99
	Sediment*	51934	6139	9,05	7452,09	7998,11	83,88
Ljeto	Kemoklina	35042	1850	6,48	2520,94	2297,97	94,75
	Kemoklina*	67043	1468	1,87	1749,13	1553,01	96,94
	Monimolimnion	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Monimolimnion*	41370	1610	3,88	1820,91	1874,87	95,83
	Sediment	41320	5861	9,64	24142,92	27786,65	66,72
	Sediment*	72725	5861	8,59	4647,90	4758,13	88,95
Jesen	Kemoklina	33091	1194	6,85	1318,05	1309,59	96,94
	Kemoklina*	39327	1445	3,045	1805,28	1885,71	96,12
	Monimolimnion	64844	3431	7,02	2777,48	2724,26	93,46
	Monimolimnion*	46856	3109	5,64	3405,29	3731,66	92,61
	Sediment	20611	6964	9,34	11718,09	13095,52	90,35
	Sediment*	64478	6160	7,99	4898,28	5197,23	88,42
Holomiksija	0 m	59347	1157	3,90	1664,80	2700,49	98,41
	2 m	119444	1923	3,73	1848,12	2846,56	98,26
	5 m	96841	1564	3,54	1616,93	2310,43	98,37
	9 m	89528	1811	3,87	1961,62	2814,22	98,04
	11 m	83673	2616	4,48	2869,70	3988,58	97,06
	13 m	75875	3016	5,10	3282,59	4342,50	96,51

„*“-uzorak transkriptoma; „ND“-nije determinirano

9. ŽIVOTOPIS

Milan Čanković rođen je 28. svibnja 1982. godine u Šibeniku, gdje je završio osnovnu školu i opći smjer Gimnazije Antuna Vrančića. Diplomirao je morsko ribarstvo na Centru za studije mora, Sveučilišta u Splitu, 2005. godine s diplomskim radom pod naslovom „Izolacija i određivanje bioluminiscentnih bakterija na osliću (*Merluccius merluccius*)“. Interdisciplinarni doktorski studij Oceanologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, upisuje 2012. godine. Od 2013. godine zaposlen je kao stručni suradnik u sustavu znanosti i visokog školstva u Laboratoriju za fiziku mora i kemiju vodenih sustava, Zavoda za istraživanje mora i okoliša, na Institutu Ruđer Bošković. Aktivno je sudjelovao na dva međunarodna znanstvena skupa održana u zemlji i na sedam međunarodnih skupova u inozemstvu, te se usavršavao na nizu međunarodnih škola i radionica. Proveo je mjesec dana tijekom 2013. godine na usavršavanju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Politehničkog sveučilišta u Anconi (Italija) u grupi prof. Roberta Danovara. Kao dobitnik dviju COST STSM stipendija tijekom 2015. i 2017. godine provodi ukupno tri mjeseca na Nacionalnom sveučilištu u Irskoj, Galway, na Odjelu za mikrobiologiju u grupi dr. Gavina Collinsa. Suradnik je na projektu financiranom od strane HRZZ-a („Kruženje sumpora i ugljika u morskom i slatkovodnom okolišu“, HRZZ-IP-2013-11-1205) te na nekoliko bilateralnih (Austrija, NR Kina) i komercijalnih (NP Krka, Hrvatske Vode) projekata. Autor je dvaju znanstvenih radova koje citira Current Contents.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Čanković, Milan; Sviličić Petrić, Ines; Marguš, Marija; Ciglencečki, Irena.
Spatio-temporal dynamics of sulfate-reducing bacteria in extreme environment of Rogoznica Lake revealed by 16S rRNA analysis. // Journal of marine systems. 172 (2017) ; 14-23 (članak, znanstveni).
2. Mladineo, Ivona; Žilić, Jelena; Čanković, Milan.
*Health survey of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) reared in Adriatic cages from 2003-2006* // Journal of the world aquaculture society. 32 (2008) , 2; 281-289 (članak, znanstveni).

Znanstveni radovi u postupku objavljivanja

1. Jianan, Liu; Jinzhou, Du; Gašparović, Blaženka; Čanković, Milan; Hrustić, Enis; Cukrov, Neven; Zhu, Zhuoyi; Zhang, Ruifeng.
226Ra and 228Ra in the stratified estuary of the Krka River (Adriatic Sea, Croatia): implications for submarine groundwater discharge and its derived nutrients. // Biogeosciences Discussions. xx (2017) , xx; 1-29 (članak, znanstveni).

Ostali radovi u drugim časopisima

1. Čanković, Milan.

Bioluminescentne bakterije na osliću (Merluccius merluccius). // Meso : prvi hrvatski časopis o mesu. 6 (2006) ; 350-354 (prethodno priopćenje, stručni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

1. Ciglonečki, Irena; Bura-Nakić, Elvira; Marguš, Marija; Burić, Zrinka; Carić, Marina; Batistić, Mirna; Čanković, Milan; Janeković, Ivica; Viličić, Damir.

Rogoznica Lake (Croatia), a Unique Euxinic Seawater System on the Adriatic Coast // The 12 International Conference on Salt Lake Research : Meeting Abstracts ; u: Acta Geologica Sinica (English Edition) 88 (2014) (S1). 2014. 205-207 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. Čanković, Milan; Žilić, Jelena; Mladineo, Ivona.

Microparasites of reared bluefin tuna (Thunnus thynnus) // Abstracts of the 7th International Symposium on Fish Parasites ; u: Parassitologia 49 (2007) / Coluzzi M (ur.). Rim : Lombardo Editore, 2007. 72-72 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak).

2. Žilić, Jelena; Čanković, Milan; Mladineo, Ivona.

Biodiversity of Didymozoid trematodes in reared bluefin tuna (Thunnus thynnus) // Abstracts of the 7th International Symposium on Fish Parasites ; u: Parassitologia 49 (2007) / Coluzzi, M. (ur.). Rim : Lombardo Editore, 2007. 78-78 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak).

Drugi radovi u zbornicima skupova s recenzijom

1. Čanković, Milan; Petrić, Ines; Ciglonečki, Irena.

Rogoznica Lake – an Extreme Seawater Environment Hosting Specific Sulfate-reducing Bacterial Community // Proceedings of the 4th International Conference on Research Frontiers in Chalcogen Cycle Science i Technology / Rene, Eldon R. ; Bhattararai, S. ; Nancharaiah, Yarlagadda, V. ; Lens, Piet N.L. (ur.). bDelft, The Netherlands : UNESCO-IHE, 2015. 115-124 (predavanje, međunarodna recenzija, objavljeni rad).

2. Ciglonečki-Jušić, Irena; Ahel, Marijan; Omanović, Dario; Mikac, Nevenka; Bura Nakić, Elvira; Marguš, Marija, Dautović, Jelena, Caktaš Šagi, Filipa; Čanković, Milan; Bačić, Niko.

Eutrofikacijski procesi u ekosustavu rijeke Krke - područje Visovačkog jezera // Hrvatske vode na investicijskom valu, 6.th Croatian Water Conference with International Participation, Zbornik radova-Proceedings, Opatija May 2015, p.353- 362. / Danko Bionsić, Danko Holjević, Marija Vizner (ur.). Kraljevica : Neograf d.o.o. Kraljevica, 2015. 353-362 (predavanje, domaća recenzija, objavljeni rad, znanstveni).

Sažeci u zbornicima skupova

1. Ciglonečki, Irena; Marguš, Marija; Čanković, Milan; Cvitešić, Ana; Petrić, Ines; Collins, Gavin. *Redox regime shifts in euxinic marine environment (Rogoznica Lake, eastern Adriatic coast)* // 255th American Chemical Society, New Orleans (SAD) 1-1 (predavanje, sažetak, znanstveni).

2. Čanković, Milan; Collins, Gavin; Porca, Estefania; Petrić, Ines; Ciglonečki, Irena.
BENEATH THE OXIA: Insight into the prokaryotes of marine meromictic Rogoznica lake (Croatia) and their potential in elemental cycling // 2018 Ocean Science Meeting. Portland (SAD) 149-149 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

3. Čanković, Milan; Collins, Gavin; Porca, Estefania; Petrić, Ines; Ciglonečki, Irena.
Life under euxinia: Potential role of active prokaryotes in elemental cycling in marine meromictic Rogoznica Lake (Eastern Adriatic coast) // 15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, SAME, Zagreb, book of abstract / Gligora Udovič, Marija ; Orlić, Sandi ; Šolić, Mladen (ur.). Zagreb : Institut Ruđer Bošković, 2017. 154-154 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

4. Čanković, Milan; Collins, Gavin; Porca, Estefania; Petrić, Ines; Ciglonečki, Irena.
The extremes of Rogoznica Lake (Eastern Adriatic coast): In-Depth Characterisation Of The Prokaryotic Community Beneath The Oxic Zone // FEMS 2017 abstract book. Valencia (Španjolska), 2017. 469-469 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

5. Čanković, Milan; Marguš, Marija; Ciglonečki-Jušić, Irena; Corinaldesi, Cinzia; Dell'Anno, Antonio; Petani, Bruna; Rastelli, Eugenio; Danovaro, Roberto.
Exploring microbial interactions, functions and diversity under euxinic conditions in Rogoznica Lake (Croatia) - an unique, extreme environment on the Adriatic coast // Central European Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology „Power of Microbes in Industry and Environment“, Primošten: programme and abstracts / Teparić, Renata ; Frece, Jadranka ; Mrša, Vladimir (ur.). Zagreb : Croatian Microbiological Society, 2013. 51-52 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Neobjavljena sudjelovanja na skupovima

1. Čanković, Milan; Collins, Gavin; Petrić, Ines; Ciglonečki, Irena.
Rogoznica Lake – a Conceptual Framework to Study Sulfate-reducing Bacteria Across a Wide Range of Anoxic/hypoxic Marine Environments // (predavanje, međunarodna recenzija, neobjavljeni rad, znanstveni).

2. Ciglonečki, Irena; Bura-Nakić, Elvira; Marguš, Marija; Čanković, Milan; Carić, Marina; Viličić, Damir; Ljubešić, Zrinka; Kršinić, Frano; Batistić, Mirna; Janeković, Ivica; Plavčić, Filip.
Rogoznica Lake (Croatia), a unique anoxic seawater system on the Adriatic coast under the anthropogenic pressures // Geophysical Research Abstracts Vol. 16, EGU2014-7925, 2014. 2014. (poster, neobjavljeni rad).

3. Mladineo, Ivona; Žilić, Jelena; Čanković, Milan.
*Biodiversity of Didymozoid trematodes of reared bluefin tuna *Thunnus thynnus** // Proceedings of the 13th EAFP conference on "Diseases of Fish and shellfish". Grado, Italija 2007. (poster, međunarodna recenzija, neobjavljeni rad).

4. Mladineo, Ivona; Žilić, Jelena; Čanković, Milan.
*Parasite communities in the wild and reared bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Adriatic Sea* // 5th International Symposium of Aquatic Animal Health : program and abstracts. American Fisheries Society, Fish Health Section, San Francisco (SAD) (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, neobjavljeni rad, znanstveni).

5. Mladineo, Ivona; Čanković, Milan; Ščekić, Vida; Žilić, Jelena.

Camallanus sp. infection in cage-reared bluefin tuna (Thunnus thynnus) // Abstracts of the 12th International Conference of the EAAP. 2005. (poster, međunarodna recenzija, neobjavljeni rad, znanstveni).