

# Polifazna karakterizacija sojeva cijanobakterija iz bentičkih i epibiotskih staništa istočnog Jadranskog mora

---

Pahor, Ela

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:907914>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ela Pahor

**Polifazna karakterizacija sojeva  
cijanobakterija iz bentičkih i epibiotskih  
staništa istočnog Jadranskog mora**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Ela Pahor

**Polyphasic characterization of  
cyanobacterial strains from benthic and  
epibiotic habitats from the eastern Adriatic  
Sea**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za algologiju na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Bosak, te komentorstvom Lucije Kanjer, mag. oecol. et prot. nat. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

## **ZAHVALE**

Prvo se želim zahvaliti mentorici ovoga rada, profesorici Sunčici Bosak, te komentorici Luciji Kanjer jer su me vodile kroz njegovu izradu s puno upornosti, razumijevanja i strpljenja. Hvala vam na svim ispravcima koji su poboljšali ovaj tekst, savjetima te na svemu što ste me naučile o laboratorijskom radu, analizama podataka te pisanju znanstvenog rada.

Hvala Istraživačkoj skupini za algologiju Biološkog odsjeka što su mi omogućili slobodan rad u labosu.

Hvala svim mojim prijateljima što su mi druženjima, šalama, smijehom i utjehom uljepšali godine studiranja.

Mojoj obitelji, koja me je uvijek podupirala i omogućavala mi da radim ono što volim... Ne mogu vam se dovoljno zahvaliti.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Polifazna karakterizacija sojeva cijanobakterija iz bentičkih i epibiotskih staništa istočnog Jadranskog mora

Ela Pahor

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cijanobakterije su fotolitoautotrofni prokarioti koje nalazimo široko rasprostranjene diljem svijeta u različitim staništima zahvaljujući njihovoj izrazitoj sposobnosti prilagodbe. Njihova prva sistematska podjela temeljila se isključivo na morfološkim značajkama, međutim uključivanjem molekularnih metoda i filogenetskih analiza došlo je do znatnih promjena u klasifikaciji i imenovanju taksona. Najboljim se pristupom smatra polifazna karakterizacija taksona koja uključuje analiziranje većeg broja čimbenika kao što su filogenetske, morfološke, fiziološke i ekološke značajke. Cilj ovog rada bio je izolirati i polifaznim pristupom opisati bentičke taksone iz epilitskih staništa zona supralitorala i mediolitorala istočnog Jadranskog mora te epibiotske taksone cijanobakterija s oklopa glavatih želvi. Izolirane su ukupno 34 laboratorijske kulture koje su na temelju morfologije svrstane u 4 osnovna morfotipa. Na temelju morfoloških i filogenetskih analiza koje su uključivale 16S rDNA, 28 sojeva izoliranih iz bentičkih staništa su svrstani u rodove *Sodalinema*, *Salileptolyngbya* i *Nunduva*, te su prvi put zabilježeni za područje Jadranskog mora. Svih 6 epibiotskih sojeva izoliranih s oklopa glavatih želvi su svrstani u rod *Leptothoe*, koji je prethodno zabilježen u metagenomskim istraživanjima oklopa morskih kornjača, međutim u ovom radu su prvi put pripadnici izolirani u laboratorijske kulture. Za potpunu i točnu karakterizaciju sojeva, u budućim se istraživanjima preporuča uključiti dodatne genske markere u filogenetsku analizu, kako bi se riješile nedoumice u identifikaciji i klasifikaciji te pridonijelo opisivanju novih taksona izoliranih u ovome radu.

Ključne riječi: *Leptothoe*, *Nunduva*, *Salileptolyngbya*, *Sodalinema*, *Caretta caretta*, supralitoral (72 stranice, 25 slika, 7 tablica, 146 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sunčica Bosak  
Komentor: Lucija Kanjer, mag. oecol. et prot. nat

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Sunčica Bosak  
Doc. dr. sc. Petar Žutinić  
Izv. prof. dr. sc. Sandra Hudina

Rad prihvaćen: 4.7.2024.

---

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

# Polyphasic characterization of cyanobacterial strains from benthic and epibiotic habitats from the eastern Adriatic Sea

Ela Pahor

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Cyanobacteria are photolithoautotrophic organisms inhabiting different ecosystems all over the world thanks to their exceptional adaptability. Classification and taxonomy of cyanobacteria were at first based solely on their morphology and have changed significantly with the introduction of molecular methods and phylogenetic analyses. Polyphasic characterization is considered the best approach because it includes the analysis of several parameters, like phylogenetic, morphological, physiological and ecological traits of cyanobacteria. The aim of this study was to isolate and describe benthic taxons of cyanobacteria from epilithic habitats of supralittoral and mediolittoral zones of the eastern Adriatic Sea and epibiotic taxons of cyanobacteria from the carapace of loggerhead sea turtles, using polyphasic approach. A total of 34 laboratory cultures were isolated and classified into 4 basic morphotypes based on their morphology. Based on morphological and phylogenetic analyses that included 16S rDNA, 28 strains isolated from benthic habitats were classified into the genera *Sodalinema*, *Salileptolyngbya* and *Nunduva*, and were recorded for the first time in the Adriatic Sea. All 6 epibiotic strains isolated from the carapace of loggerhead sea turtles were classified in the genus *Leptothoe*, previously discovered on the carapace of sea turtles using metagenomics, and in this study were isolated into laboratory cultures for the first time. For future research a complete and accurate characterization of strains, including additional genetic markers in the phylogenetic analysis, is recommended to resolve the doubts in identification and classification and attribute to the description of taxons new to science.

Keywords: *Leptothoe*, *Nunduva*, *Salileptolyngbya*, *Sodalinema*, *Caretta caretta*, supralittoral  
(72 pages, 25 figures, 7 tables, 146 references, original in: Croatian)

This thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Sunčica Bosak, PhD

Co-mentor: Lucija Kanjer, mag. oecol. et prot. nat

Reviewers:

Assoc. Prof. Sunčica Bosak, PhD

Asst. Prof. Petar Žutinić, PhD

Assoc. Prof. Sandra Hudina, PhD

Thesis accepted: 4.7.2024.

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1.1. Ekološke i biološke značajke cijanobakterija.....                        | 1  |
| 1.2. Morfologija cijanobakterija .....  | 4  |
| 1.3. Bentičke cijanobakterije u Jadranskom moru.....                          | 10 |
| 1.4. Cijanobakterije u epizoičkim zajednicama biofilma morskih kornjača ..... | 13 |
| 1.5. Evolucija i filogenija cijanobakterija.....                              | 16 |
| 1.6. Usklađivanje tradicionalnog klasifikacijskog pristupa i filogenije ..... | 19 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....   | 20 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....  | 21 |
| 3.1. Uzorkovanje .....  | 21 |
| 3.2. Izolacija cijanobakterijskih sojeva i uspostavljanje monokultura .....   | 23 |
| 3.3. Morfološke, molekularne i filogenetske analize izoliranih sojeva .....   | 27 |
| 4. REZULTATI.....   | 30 |
| 4.1. Morfološka karakterizacija izoliranih sojeva cijanobakterija.....        | 30 |
| 4.1.1. Morfološki tip 1 .....   | 33 |
| 4.1.2. Morfološki tip 2.....  | 39 |
| 4.1.3. Morfološki tip 3.....  | 42 |
| 4.1.4. Morfološki tip 4.....  | 45 |
| 4.2. Filogenetska analiza .....   | 48 |
| 5. RASPRAVA.....  | 52 |
| 5.1. Morfološki tip 1 i rod <i>Sodalinema</i> .....                           | 52 |
| 5.2. Morfološki tip 2 i rod <i>Salileptolyngbya</i> .....                     | 53 |
| 5.3. Morfološki tip 3 i rod <i>Nunduva</i> .....                              | 55 |
| 5.4. Morfološki tip 4 i rod <i>Leptolyngbya</i> .....                         | 55 |
| 5.5. Rodovi i staništa iz kojih su izolirani .....                            | 57 |
| 5.6. Pitanja i preporuke za buduća istraživanja .....                         | 58 |
| 6. ZAKLJUČAK .....  | 60 |
| 7. LITERATURA.....  | 61 |
| 8. ŽIVOTOPIS .....  | 72 |
| 9. PRILOZI.....   | I  |



# 1. UVOD

## 1.1. Ekološke i biološke značajke cijanobakterija

Cijanobakterije su fotolitoautotrofni organizmi koji predstavljaju jednu od najrasprostranjenijih skupina mikroorganizama na Zemlji. Prije otkrića njihova bakterijskog podrijetla, zbog svoje su plavozelene boje i makromorfoloških obilježja svrstavane u alge, te nazivane “ modrozelenim algama“. Danas znamo da su one prokariotski organizmi, srodniji ostalim grupama gram negativnih bakterija nego algama te ih svrstavamo u domenu Bacteria, koljeno Cyanobacteriota (Oren i sur., 2022). One su prvi organizmi koji su proizvodili kisik kao dio fotosintetskog procesa te su time značajno preoblikovale atmosferu i izgled planete Zemlje. Smatra se da su prije 2.7 milijardi godina, dok su na Zemlji vladali anoksični uvjeti, prve cijanobakterije u oceanima počele mjestimično oslobađati manje količine kisika (Kendall i sur., 2010). Promjene u fizikalnim uvjetima u okolišu koje su uslijedile omogućile su naglo oslobađanje nakupljenog kisika (Alcott i sur., 2022; Garduno Ruiz i sur., 2023), a u istom razdoblju cijanobakterije su postale brojnije od anoksičnih fotosintetskih bakterija (Olejarz i sur., 2021). Posljedica navedenih promjena bio je globalni porast koncentracije kisika prije 2.4 milijarde godina što nazivamo Velikom oksidacijskim događajem (Sessions i sur., 2009).

Fotosinteza se u stanicama cijanobakterija odvija na tilakoidnim membranama koje su koncentrično ili radijalno jednoliko raspoređene u stanici. Na tilakoidima su smješteni fikobilisomi u kojima se nalaze fotosintetski i antenski pigmenti: klorofil *a*, alofikocijanin, fikoeritrin i fikocijanin. (Castenholz i sur., 2001; Komárek i Johansen, 2015a). Cijanobakterije također posjeduju veliki broj različitih karotenoida koji apsorbiraju dio svjetlosti te smanjuju opterećenje fotosustava i sprečavaju nastajanje oksidativnog stresa (Zakar i sur., 2016). Cijanobakterije su u vodenim staništima na različitim dubinama tijekom godine izložene širem spektru svjetlosti od kopnenih biljaka, zbog čega u stanicama imaju veći broj različitih tipova pigmenata (Kehoe, 2010). Cijanobakterijski pigmenti apsorbiraju svjetlost različitih valnih duljina te tako omogućuju iskorištavanje šireg dijela svjetlosnog spektra za fotosintezu (Grossman i sur., 1995). Osim različitih tipova pigmenata, cijanobakterije imaju sposobnost fotoaklimatizacije, odnosno prilagodbe omjera različitih pigmenata u fikobilisomima ovisno o svjetlu koje dopire do njihovih stanica. U nekih vrsta tijekom fotoaklimatizacije može doći i do sinteze pigmenata koji do tada nisu bili prisutni (Antonaru i sur., 2023), što pridonosi većoj prilagodljivosti uvjetima okoliša te se u istoj vrsti, čak i populaciji, mogu naći stanice s različitim omjerima različitih pigmenata (Komárek i Johansen, 2015a; Vidal i sur., 2021).

U počecima njihovog istraživanja cijanobakterije su se smatrale skupinom koja ima iznimnu sposobnost prilagodbe različitim ekološkim uvjetima te da ih karakterizira velika raznolikost svojti i vrlo široka biogeografska rasprostranjenost. Međutim, recentna istraživanja ukazuju da je većina svojti ustvari ograničena na manji broj staništa te da imaju uže ekološke valencije. Korištenjem molekularnih metoda dokazano je da se kod mnogih rodova, koji su do nedavno smatrani kozmopolitskim i eurivalentnim, ustvari radi o rodovima s polifiletskim porijeklom te su unutar njih napravljene nove

podjele u kojima razlikujemo velik broj novih, specijaliziranih vrsta s ograničenom rasprostranjenosti (Komárek i Johansen, 2015a).

Cijanobakterije naseljavaju raznovrsna staništa terestričkih, slatkovodnih i morskih ekosustava. Mnoge svojite cijanobakterija vrlo dobro podnose ekstremne uvjete u staništima poput termalnih izvora (Jasser i sur., 2022), vodenih tijela koja periodički presušuju (Costa i sur., 2016) te unutrašnjosti stijena u pustinjama (Murray i sur., 2022). Terestrička staništa nastanjuju većinom nitaste svojite koje stvaraju makroskopske obraštaje, a nalazimo ih u gotovo svim tipovima tla. Cijanobakterije su najvažniji autotrofni organizmi na staništima poput vlažnog kamenja, tla i zidova te u ekstremnim staništima jer stvaranjem oksičnih uvjeta omogućuju nastanjivanje drugih organizama (Roush i Garcia-Pichel, 2020; Kanellopoulos i sur., 2022). U vodenim staništima ih nalazimo kao dio planktonskih zajednica te su pikoplanktonske cijanobakterije kao što je *Prochlorococcus* i neki nitasti predstavnici poput vrste *Trichodesmium* spp. poznati kao iznimno važni primarni proizvođači u morskim ekosustavima pridonoseći i do 20 % primarnoj proizvodnji (Novotny i sur., 2023). Naseljavaju i bentička staništa, u kojima epilitske svojite nastanjuju čvrste kamene podloge, a epipeličke i episamičke svojite sediment, ili makrofaunu i makrofloru, a te svojite nazivamo epizoičkim i epifitskim (Komárek i Johansen, 2015a).

Životni ciklus cijanobakterija je karakterističan za prokariotske organizme, međutim razlikuje se između pripadnika različitih rodova. Najčešći oblik nespolne reprodukcije cijanobakterija je stanična binarna dioba u kojoj stanična stijenka probija u protoplast stanice i dijeli je na dvije nove (Komárek i Johansen, 2015a). Do podjele majčinske stanice i odvajanja novih stanica može doći istovremenom invaginacijom svih slojeva stanične stijenke ili odvajanje slijedi nakon podjele, pri čemu prvo slijedi primarna invaginacija samo stanične membrane i peptidoglikanskog sloja, a zatim stanične stijenke (Drews i Weckesser, 1982). Asimetrična stanična dioba česta je u rodova kokoidnih cijanobakterija s polariziranim stanicama, a može se pojaviti i u drugih rodova u slučaju pogoršanja okolišnih uvjeta (Liao i Rust, 2018). Stanice nekih pripadnika kokoidnih rodova mogu se podijeliti u više stanica kćeri, koje nastaju gotovo istovremeno. Ovakvi tipovi diobe zovu se asimetrična diferencijacija stanica i višestruka dioba. Kod asimetrične diferencijacije uvijek se dijeli apikalni dio majčinske stanice, a iz ovojnice se oslobađaju solitarne stanice ili redovi/ nakupine stanica. U višestrukoj diobi može se dijeliti cijela stanica ili apikalni dio, a uvijek se oslobađaju solitarne stanice (Komárek i Johansen, 2015a). Stanice koje se oslobađaju u oba se tipa diobe nazivaju eksocite, a dijele se na nanocite, koje se oslobađaju iz difuznog, sluzavog omotača (Komárek i Anagnostidis, 1999), te beocite koje se oslobađaju iz čvrste ovojnice (Waterbury i Stanier, 1978). Vrste kokoidnih i nitastih cijanobakterija koje grade taluse mogu se razmnožavati njihovom fragmentacijom. Najčešći oblik razmnožavanja nitastih cijanobakterija je fragmentacija dijela trihoma nazvanog hormogonij. Hormogoniji nastaju stvaranjem sluzavog ovoja između susjednih stanica u trihomu ili stvaranjem nekridija, a mogu se sastojati od jedne ili niza stanica (Komárek i Johansen, 2015a).

Neki rodovi cijanobakterija imaju životni ciklus s izmjenama različitih razvojnih stadija. Izmjena razvojnog stadija kokoidnih cijanobakterija uključuje diferencijaciju stanica i promjenu morfologije, a

često počinje početkom novog godišnjeg doba. Na primjer, životni ciklus kokoidnog planktonskog roda *Microcystis* uključuje proliferaciju na površini vodnog tijela u ljetnim te morfološku promjenu i spuštanje vegetativnih stanica na površinu sedimenta u zimskim mjesecima (Komárek i Johansen, 2015a). Hense i Beckmann (2006) uspostavili su općeniti model životnog ciklusa nitastih rodova iz reda Nostocales koji izazivaju cvjetanja u ljetnim mjesecima. Model su podijelili u četiri glavna razvojna stadija, prema razini energije i količini dušika u stanicama. Životni ciklus oba spomenuta planktonska roda uključuje i bentičke faze. S druge strane, bentičke vrste mogu jedan dio godine, tijekom kolonizacije, živjeti u planktonu.

Cijanobakterije su, osim kao primarni proizvođači, važne za čitav živi svijet zbog nekoliko obilježja: proizvodnje sekundarnih metabolita, povremenih cvjetanja, sposobnosti fiksacije dušika te svojeg biotehnološkog potencijala. Osim kao primarnih proizvođača, utjecaj cijanobakterija na ekosustav očituje se i u proizvodnji sekundarnih metabolita, od kojih neki mogu biti toksični za ostale članove biocenoze. Iako promjene okolišnih uvjeta uslijed kojih dolazi do proizvodnje cijanotoksina nisu u potpunosti razjašnjene, smatra se da iznimno važan utjecaj imaju temperatura, količina dostupnog svjetla te protok vode (Gaget i sur., 2022). Proizvodnja toksina u bentičkih vrsta mnogo je manje istražena nego u planktonskih svojti (Quiblier i sur., 2013). U nekih svojti poznata je pojava „cvjetanja“, iznimnog povećanja biomase cijanobakterija u vodnim tijelima što može uzrokovati promjenu boje, okusa i mirisa površinskih voda. Cijanotoksini se obično istražuju kod vrsta koje izazivaju cvjetanja jer je njihov učinak na ekosustav značajniji (Zhang i sur., 2023), ali proizvode ih i vrste koje ne izazivaju cvjetanja (Khomutovska i sur., 2020). Okolišni uvjeti koji pogoduju proliferaciji cijanobakterija nedovoljno su istraženi (Kahru i sur., 2020), ali smatra se da veliku ulogu u pojavi češćih i intenzivnijih proliferacija ima antropogeni utjecaj, primjerice povećani dotok organskih i anorganskih tvari poput dušika i fosfora. Povišene temperature potiču rast cijanobakterija te ustaljuju stratifikaciju vodnih tijela, što rezultira duljim prisustvom različitih svojti cijanobakterija te jačim intenzitetom i učestalošću cvjetanja u toplijim mjesecima (Jöhnk i sur., 2008). Osim sezonskog utjecaja, višegodišnja produljena ljetna proliferacija može uzrokovati trajnu promjenu u sastavu mikroflore vodnih tijela (Slim i sur., 2014).

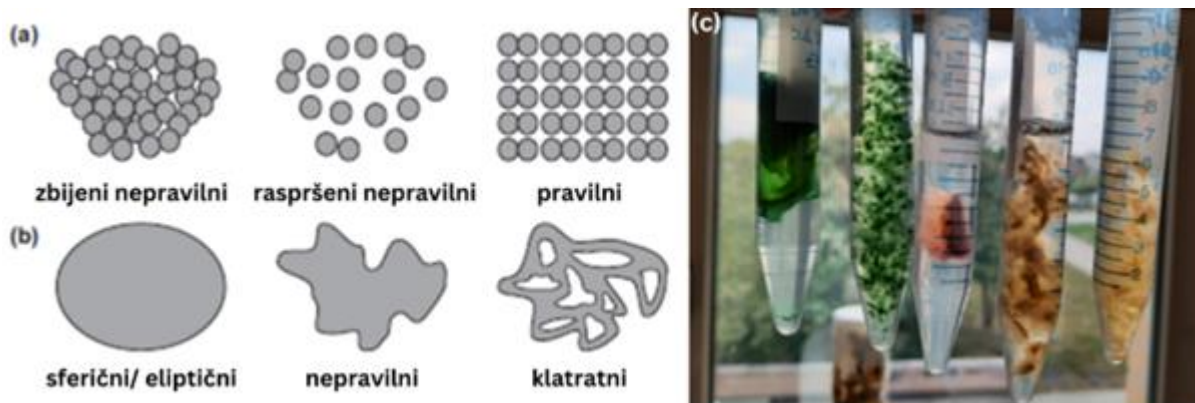
Jedno do najpoznatijih svojstava cijanobakterija je sposobnost nekih rodova da fiksiraju dušik. Ova sposobnost cijanobakterija presudna je za živi svijet jer omogućuje pretvorbu anorganskih oblika dušika u organske koji su dostupni eukariotima, a time i njegovo stalno kruženje u prirodi. Fiksaciju dušika cijanobakterijama omogućuju posebne stanice – heterocite. Heterocite se mogu razviti iz vegetativnih stanica u nitastim cijanobakterijama pri manjku otopljenog anorganskog dušika u okolišu (Neilson i sur., 1971). Pri diferencijaciji vegetativna stanica gubi fotosustav II, što onemogućuje nastajanje kisika kao nusproizvoda fotosinteze. Ovo je nužna prilagodba jer je kisik inhibitor nitrogenaze, enzima za fiksaciju dušika. Vegetativne stanice proizvode glukozu koju koriste heterocite, a heterocite proizvode glutamin, organski izvor dušika, potreban vegetativnim stanicama (Lea, 1997). Zbog opisane diferencijacije stanica, za koju je potrebna međustanična komunikacija, te izmjene

metabolita, neki autori smatraju nitaste cijanobakterije s heterocitama jednostavnim oblicima višestaničnih organizama (Herrero i sur., 2016). Neki rodovi cijanobakterija, kao što su *Gloeotheca*, *Cyanotheca* i *Lyngbya* ne posjeduju heterocite, ali imaju mogućnost fiksacije dušika. Fiksacija dušika i fotosinteza u njihovim su stanicama vremenski odijeljene, kako ne bi došlo do inhibicije nitrogenaze kisikom (Issa i sur., 2014). Ovoj skupini pripadaju i morske cijanobakterije roda *Trichodesmium* koje su odgovorne za oko 42 % ukupne fiksacije dušika na Zemlji (Berman-Frank i sur., 2003). Neke vrste cijanobakterija žive u komenzalnoj simbiozi s dijatomejama i kopnenim biljkama, gdje dijatomeje/ biljke opskrbljuju cijanobakterije ugljikovodicima, a cijanobakterije opskrbljuju dijatomeje/ biljke organskim dušikom (Foster i sur., 2022).

Cijanobakterije imaju veliki biotehnološki potencijal za primjenu u različite svrhe kao što je prehrana zbog velikog udjela proteina u njihovim stanicama (Haberle i sur., 2020). Vrsta *Arthrospira platensis* Gomont 1892 već se dugi niz godina prodaje kao prehrambeni proizvod, pod njenim starim imenom "Spirulina". Cijanobakterije se također intenzivno proučavaju kao potencijalni obnovljivi izvor energije. Naime, trenutno se za proizvodnju bioplastike i biogoriva koriste neke vrste kopnenih biljaka, ali smatra se da bi tu ulogu mogle preuzeti cijanobakterije zbog manjih troškova ulaganja u uzgoj (Agarwal i sur., 2022). Cijanobakterije se koriste i u remedijaciji kopnenih voda (Papadopoulos i sur., 2020; De Souza i sur., 2022) zbog tolerancije na velike koncentracije amonijaka (Haberle i sur., 2020).

## 1.2. Morfologija cijanobakterija

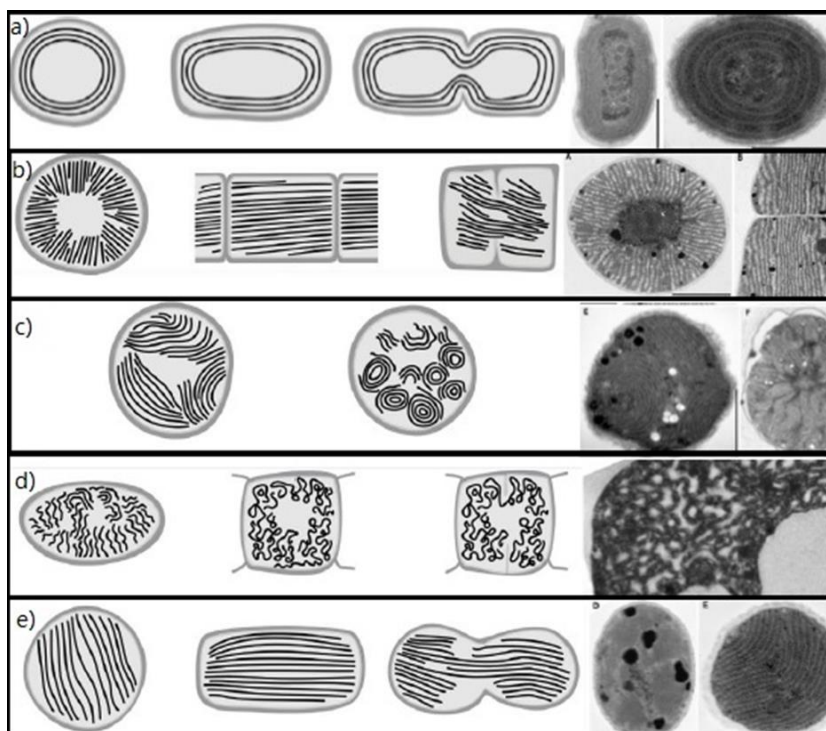
Cijanobakterije mogu biti pojedinačne stanice ili su stanice uronjene u zajednički polisaharidni matriks te se nazivaju kolonijama. Veličina stanica kokoidnih rodova varira između 0,2  $\mu\text{m}$  i 40  $\mu\text{m}$  (Vidal i sur., 2021), a najveća zabilježena veličina pripada nitastom rodu *Oscillatoria* te iznosi 100  $\mu\text{m}$  (Schulz-Vogt i sur., 2007; Vidal i sur., 2021). Osnovna je podjela cijanobakterija na kokoidne i filamentne oblike koji su organizirani u različite tipove kolonija (Slika 1.). Izraz filament označuje jedan do više trihoma koji dijele isti polisaharidni matriks. Kolonije mogu biti različitih oblika i veličina od nekoliko do nekoliko tisuća stanica, a u nekim slučajevima dovoljno velike (na razini milimetra) da postaju vidljive golim okom. Za karakterističnu modrozelenu boju stanica cijanobakterija zaslužni su plavi pigmenti fikocijanin i alofikocijanin, kao i zeleni klorofil *a*, međutim povećanjem količine drugih pigmenata nakupine cijanobakterija mogu postati crvene, smeđe, žute ili čak crne (Slika 1.). Boja obraštaja ovisi i o skupini pigmenata u polisaharidnom matriksu, koji štite stanice od svjetlosnog zasićenja ili štetnog UV-zračenja. Pigmenti prisutni u matriksu su scitonemin, gleokapsin te sekundarni karotenoidi (Komárek i Johansen, 2015a).



Slika 1. Raznolikost kolonija cijanobakterija: (a) raznolikost u rasporedu stanica u koloniji (preuzeto iz: Vidal i sur., 2021), (b) raznolikost u oblicima kolonija (preuzeto iz: Vidal i sur., 2021), (c) raznolikost u boji kolonija.

Važno obilježje u određivanju kokoidnih cijanobakterija je izopolarnost, odnosno heteropolarnost stanica. Heteropolarne stanice razlikuju se u bazalnom i apikalnom dijelu, a nastaju posebnim načinima diobe (na primjer nesimetričnom diobom). Oblici izopolarnih stanica mogu se jako razlikovati između rodova. Uz navedeno, polisaharidne ovojnice koje kokoidne stanice izlučuju mogu se veoma razlikovati između pojedinih rodova te služe kao determinacijsko svojstvo. Glavna tri tipa su difuzna, amorfna, hijalina masa, difuzni ili tanki omotači te čvrste i/ili strukturirane ovojnice (Komárek i Johansen, 2015a).

Građa stanice filamentnih cijanobakterija ne razlikuje se mnogo od građe kokoidnih, osim u rasporedu tilakoidnih membrana (Komárek i Johansen, 2015b). Razlikujemo pet glavnih tipova rasporeda tilakoida (Slika 2.): parijetalni - koncentrično položene tilakoidne membrane usporedne a uzdužnom osi stanice, radijalni - usporedne tilakoidne membrane okomite na staničnu membranu, fascikularni - tilakoidne membrane međusobno se paralelno grupiraju u valovite, polukružne ili kružne nakupine, nepravilni - tilakoidne membrane se grupiraju, ali nisu postavljene paralelno i paralelni - paralelne tilakoidne membrane ispunjavaju cijelu stanicu. Svaki od osnovnih tipova može se pojaviti s određenim preinakama (Mareš i sur., 2019).



Slika 2. Glavni tipovi rasporeda tilakoida: (a) parijetalni, (b) radijalni, (c) fascikularni, (d) nepravilni, e) paralelni (preuzeto iz: Mareš i sur., 2019).

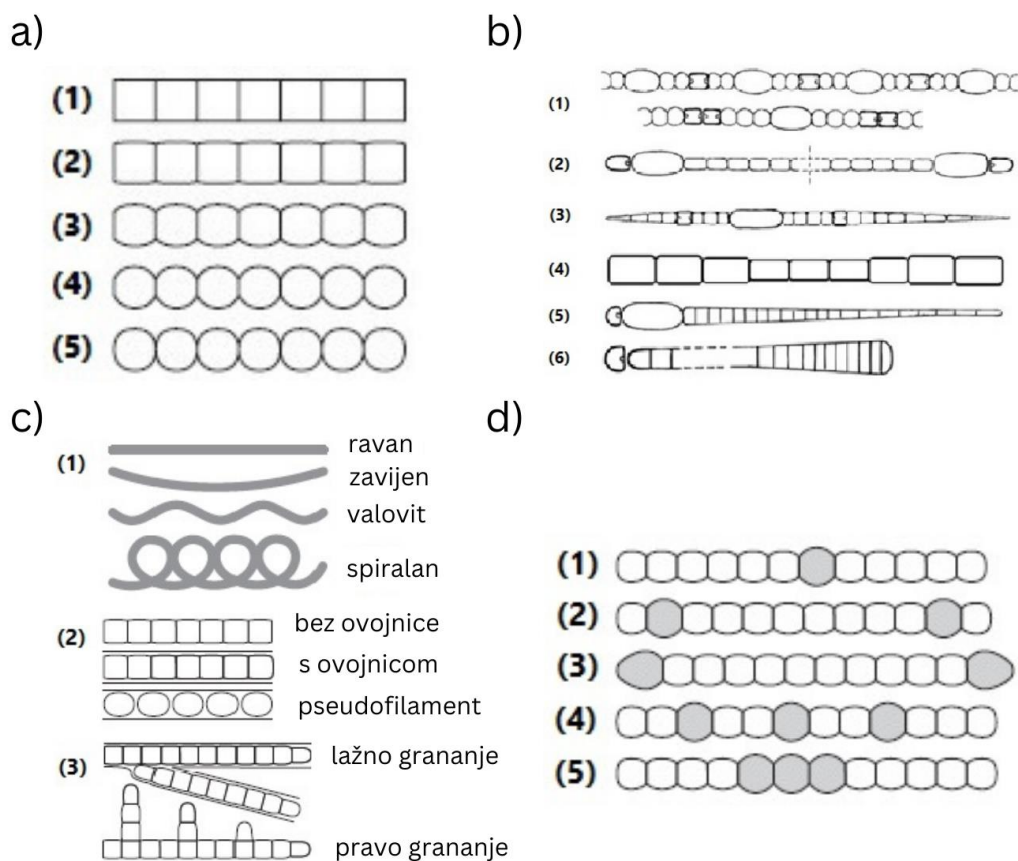
Heteropolarne stanice grade kolonije s izraženo različitim krajevima. Oblik kolonija ovisi o rasporedu stanica te osima diobe. Stanice filamentnih cijanobakterija spojene su u nizove – trihome (Slika 3.). Stanice u trihomu dijele peptidoglikanski omotač i vanjsku membranu stanične stijenke. Septalni spojevi proteinski su kompleksi koji prolaze kroz peptidoglikanski omotač te spajaju dvije susjedne stanice. Septalni spojevi završavaju nanoporama, otvorima u staničnim membranama stanica koji ih spajaju, a koje ovisno o uvjetima u okolišu mogu biti otvorene ili zatvorene (Kieninger i Maldener, 2021). Kroz ove komplekse slobodno prolazi citoplazma s metabolitima i signalnim molekulama pomoću kojih stanice komuniciraju (Mullineaux i sur., 2008). Prema smjeru diobe stanica, razlikujemo uniserijatne trihome u kojima se stanice dijele samo okomito na udužnu os trihoma, a imaju oblik linije, te multiserijatne u kojima se stanice dijele okomito i paralelno s uzdužnom osi, ali i u drugim smjerovima (Slika 3.). Trihomi većine filamentnih rodova okruženi su sluzavim polisaharidnim matriksom. Polisaharidne ovojnice mogu biti veoma raznolike strukture i oblika (Komárek i Johansen, 2015b). Uniserijatni trihomi nekih rodova lome se i izbijaju iz polisaharidne ovojnice u više smjerova te liče na multiserijatne – ova pojava naziva se lažno grananje (Slika 3.). Sukladno tome, stanična dioba u više smjerova kod multiserijatnih trihoma naziva se pravo grananje (Slika 3.), a važna je razlika u tome što kod pravog grananja ne dolazi do pucanja izvornog trihoma, te lateralni trihom ostaje vezan za izvorni. Stanice nekih kokoidnih rodova mogu se dijeliti samo u jednom smjeru pri čemu nastaje pseudofilament (Slika 3.), kolonija koja liči na trihom (Vidal i sur., 2021).

Većina morfoloških determinacijski važnih značajki filamentnih cijanobakterija promatra se na razini jednog trihoma. Oblik stanica u trihomima može se značajno razlikovati između rodova u rasponu

od sferičnog do štapićastog. Na oblik stanice ne utječe samo genotip, već i svjetlost kojoj su stanice izložene (Montgomery, 2015). Oblik ruba trihoma ovisi o obliku stanica. Tako na prijelazu dviju stanica s ravnim rubovima neće nastati velika udubina te će se rub trihoma činiti ravnim. S druge strane, na prijelazu dviju okruglastih stanica udubina će biti izražena te će trihom podsjećati na niz perli ovješanih o konac. Ovo svojstvo nazivamo konstrikcijom, ona je manja kod trihoma s cilindričnim, a veća kod trihoma sa sferičnim stanicama (Slika 3.). Jedna ili nekoliko apikalnih stanica (stanice na polovima trihoma) nekih rodova mogu poprimiti drugačiji oblik ili su drugačije veličine od ostalih u trihomu, primjerice mogu biti uže ili šire, kao i produljene ili zašiljene. Ovo predstavlja važno determinacijsko svojstvo za te rodove (Komárek i Johansen, 2015b). Kod nekih rodova ispred apikalne stanice nalazi se sluzavi pokrovni omotač kojeg nazivamo kaliptra (Vidal i sur., 2021). Filamentne cijanobakterije mogu se morfološki podijeliti na izocitne, u kojih su sve stanice istog oblika ili heterocitne, u kojih se na trihomima razvijaju heterocite i/ili akinete, kao što je monofiletski red Nostocales (Mareš, 2018). Heterocite mogu biti interkalarne ili terminalne (Slika 3.) Trihomi izocitnih redova obično su izopolarni te su oba kraja trihoma jednakog izgleda, iako postoje iznimke kao što je rod *Homoeothrix* iz reda Oscillatoriales. Trihomi heterocitnih redova (Slika 3.) mogu biti izopolarni i heteropolarni, s obzirom da li su krajevi trihoma isti ili se razlikuju (Komárek i Anagnostidis, 1989; Komárek i Johansen, 2015b). Izopolarni trihomi dijele se na metamerične, simetrične i subsimetrične, a mogu biti i suženi u središnjem dijelu (Slika 3.). Heteropolarni trihomi dijele se na one sužene ili proširene prema terminalnom kraju (Komárek i Anagnostidis, 1989). Osim po obliku stanice, vrste različitih rodova se mogu međusobno razlikovati i u veličini stanica te omjeru njihove duljine i širine, a kod izodijamernih stanica, ove su mjere jednake (Velichko i sur., 2018).

Filamentne cijanobakterije stvaraju nekoliko tvorbi čija prisutnost, odnosno odsutnost, može poslužiti kao determinacijsko svojstvo. Te tvorbe su hormogoniji, akinete, nekridije i aerotopi. Hormogoniji su manji dijelovi trihoma koji se od njega odvajaju (Slika 4.), a nastaju stvaranjem sluzavog sloja između susjednih vegetativnih stanica ili odumiranjem stanica na dva mjesta u trihomu (Komárek i Johansen, 2015b). Ti se dijelovi mogu kretati klizanjem te pokazuju pozitivnu fototaksiju pa služe za vegetativno razmnožavanje i rasprostranjivanje (Campbell i sur., 2015). Nekridije su odumrle stanice u trihomu. Stanična smrt kod cijanobakterija može biti slučajna ili genetski regulirana (Aguilera i sur., 2021). Do regulirane stanične smrti dolazi pri pojavi nepovoljnih okolišnih uvjeta (Ross i sur., 2006) ili pri ulasku trihoma u određeni životni stadij, na primjer pri stvaranju hormogonija ili heterocita (Hochman, 1997; Adamec i sur., 2005). Odumiranje cijanobakterijskih stanica može imati veliki značaj za mikrobnu zajednicu nekog staništa, na primjer ako se dogodi tijekom cijanobakterijskog cvjetanja pri čemu dolazi do naglog otpuštanja toksina u stanište (Ross i sur., 2006). U procesu odumiranja vegetativne stanice dolazi do raspadanja tilakoida i stanične membrane, fragmentacije DNA, povećanja stope razgradnje proteina te posljedičnog smanjivanja volumena stanice (Ding i sur., 2012). Akinete su specijalizirane stanice koje služe za preživljavanje nepovoljnih uvjeta. Do diferencijacije vegetativnih stanica u akinete dolazi pri pogoršanju okolišnih uvjeta, na primjer pri nedostatku hranjivih

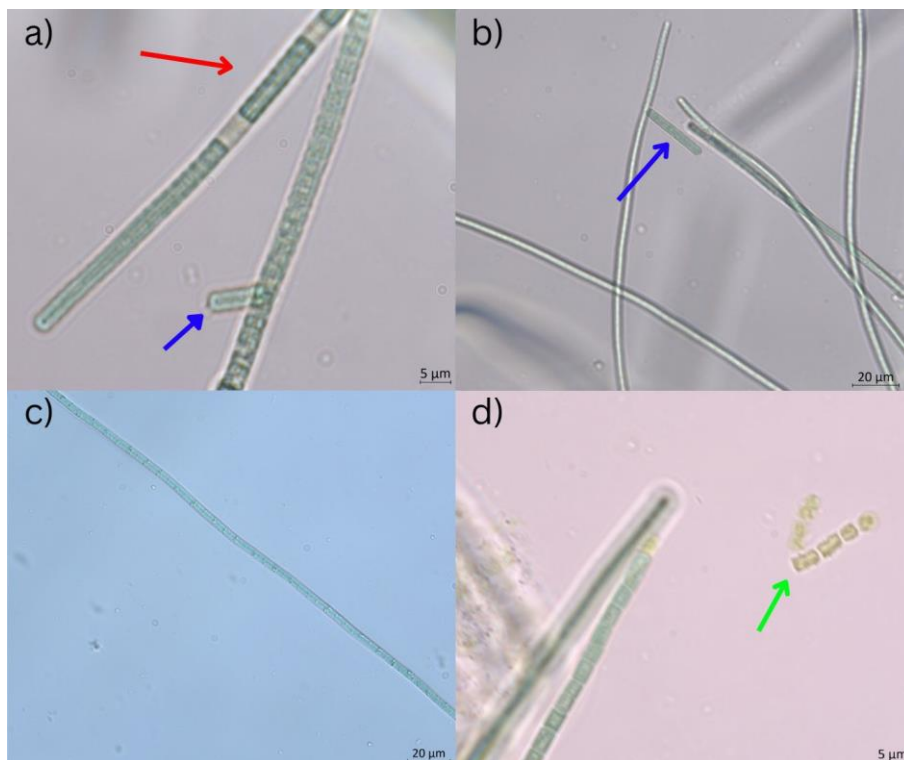
tvori ili niskim temperaturama (Garg i Maldener, 2021). Akinete imaju deblju staničnu stijenku od vegetativnih stanica te višeslojnu ovojnica. Ovojnica se sastoji od vanjskog homogenog polisaharidnog sloja, središnjeg polisaharidnog sloja te unutrašnjeg glikolipidnog sloja, prisutnog samo kod akineta i heterocita (Perez i sur., 2018). Akinete mogu biti mnogo veće od vegetativnih stanica te je zabilježeno deseterostruko povećanje volumena tijekom diferencijacije vegetativne stanice u akinetu (Fay, 1969). Tijekom procesa diferencijacije u vegetativnoj stanici se nakuplja glikogen, globule cijanoficina te aminokiseline, a metabolizam joj se drastično smanjuje (Perez i sur., 2016). Pri povratku povoljnih okolišnih uvjeta u akinetama započinje proces germinacije koji završava probijanjem novonastalog trihoma kroz njezinu ovojnica. Kod nekih vrsta, npr. *Nostoc punctiforme* (Kützing 1841) Hariot 1891 sama se akineta dijeli te iz nje nastaje novi trihom (Perez i sur., 2018). Aerotopi su nakupine proteina ispunjene zrakom koje smanjuju gustoću stanica i omogućuju njihovo plutanje ili dizanje na površinu (Slika 4). Njihov raspored u stanici je karakterističan za neke rodove te može poslužiti u determinaciji (Vidal i sur., 2021).



Slika 3. Morfološka svojstva trihoma važna za identifikaciju: (a) različiti oblici stanica i ruba trihoma, (b) oblici izopolarnih i heteropolarnih trihoma, (c) opća morfologija trihoma, (d) položaji heterocita u trihomu (preuzeto iz: Vidal i sur., 2021).



Kod planktonskih filamentnih vrsta trihomi se nakupljaju u snopove ili grozdaste te okrugle nakupine (Komárek i Johansen, 2015a). Filamenti u kolonijama bentičkih vrsta mogu imati različit raspored, što ovisi o vrsti sluzavog omotača (Komárek i Johansen, 2015b). Važno determinacijsko svojstvo filamentnih cijanobakterija je također i njihova pokretljivost. Filamenti koje čini jedan trihom imaju sposobnost kretanja klizanjem po podlozi (Komárek i Johansen, 2015b). Kretanje je uvijek popraćeno sekrecijom sluzavog materijala koji ostavlja trag iza trihoma. Sekreciju omogućuju posebne stanične strukture prisutne samo kod motilnih vrsta (Khayatan i sur., 2015), a stanice se kreću micanjem proteinskih fibrila na svojoj površini (Adams i sur., 1999). Cijanobakterije se kreću pod utjecajem brojnih okolišnih čimbenika, od kojih se svjetlost smatra najvažnijim (Tamulonis i sur., 2011).



Slika 4. Strukture filamentnih cijanobakterija važne za determinaciju: (a) i (b) hormogoniji, (c) aerotopi i (d) nekridije. Crvenom strelicom označeno je nastajanje hormogonija u trihomu, a plavim strelicama već odvojeni hormogoniji. Zelenom strelicom označene su nekridije.

### 1.3. Bentičke cijanobakterije u Jadranskom moru

Bentičke cijanobakterije dio su perifitona, zajednice mikroorganizama koju tvore razni fotoautotrofni i heterotrofni prokarioti te mikroeuکاریoti unutar polisaharidnog matriksa te stvaraju stratificirane obraštaje na stalno ili povremeno potopljenim površinama. U istom sloju obraštaja prisutne su različite vrste cijanobakterija, na čiji sastav utječu abiotički ekološki čimbenici poput vrste podloge, svjetlosti (Ford i sur., 2021), temperature (Monteagudo i Moreno, 2016), količine hranjivih tvari (Bauer i sur., 2023). Mikroorganizmi u obraštaju znatno ovise o fotosintetskoj aktivnosti cijanobakterija (Stal, 2012). Bentičke cijanobakterije nastanjuju dijelove morskog litorala te slatkovodnih staništa do kojih dopire dovoljno svjetlosti. Dije se prema tipovima površina koje nastanjuju, a te površine mogu biti čvrste ili sedimentne, prirodne ili umjetne, kao i biljni i životinjski makroorganizmi (He i sur., 2017; Ford i sur., 2021).

Cijanobakterije se ne mogu strogo podijeliti na bentičke i planktonske, jer postoje rodovi u kojima se mogu naći vrste oba tipa, kao što je *Planktothrix* (Pancrace i sur., 2017). Wood i suradnici (2020) opisali su model životnog ciklusa bentičkih cijanobakterija temeljen na saznanjima o slatkovodnom rodu *Phormidium* i vrsti *Phormidium autumnale* Gomont 1892, te se u modelu razlikuju razdoblja kolonizacije te rasta. Kolonizacija započinje kada filamenti neke vrste zauzmu novu površinu, a slijedi ju razmnožavanje stanica i filamenata te širenje polisaharidnog omotača. Nakon dugog razdoblja rasta, obraštaji postaju vidljivi na makroskopskoj razini. U stanicama tada nastaju aerotopi te se dio obraštaja izdiže i odvaja djelovanjem uzgona ili toka tekućica. Odvajanje može izazvati i sediment nakupljen u obraštaju ili pomicanje sedimenta pod utjecajem toka. Ovaj se dio obraštaja prenosi i kolonizira drugi dio litorala.

Bentičke cijanobakterije u Jadranskom su moru uglavnom istraživane u kontekstu antropogenog utjecaja (Franzo i sur., 2014; Accoroni i sur., 2016; Malone i Newton, 2020), utjecaja njihove proliferacije na ekosustav ili korištenja za ljudske potrebe (Haberle i sur., 2020). Istraživanja sastava mikrofitobentosa Sjevernog Jadrana uglavnom su orijentirana na alge kremenjašice (Cibic i sur., 2012; 2022; Franzo i sur., 2014), a o bentičkim cijanobakterijama zabilježeni su samo podaci o njihovoj prisutnosti, biomasi ili brojnosti. Na primjer, u petogodišnjem istraživanju mikrofitobentičke zajednice Tršćanskog zaljeva, zabilježeno je da su cijanobakterije činile u prosjeku 2 % zajednice (Cibic i sur., 2022), a u istraživanju provedenom blizu Rovinja primijećeno je da su cijanobakterije bile jedne od prvih kolonizatora umjetne površine postavljene u more (Mejdandžić i sur., 2015).

Prva dva epilitska roda cijanobakterija Jadranskog mora, te dvije vrste unutar njih, opisani su još 1927. godine iz uzoraka mediolitorala istočnog Jadrana (Ercegović, 1927). Ercegović 1931. godine (Ercegović, 1931) opisuje nove rodove *Podocapsa* i *Brachynema* (kasnije preimenovan u *Ercegovicia*) te njihove dvije vrste, a 1932. još dvije vrste (Ercegović, 1932; Tablica 1.). Tijekom godina opisano je i nekoliko endemskih vrsta Jadranskog mora, na primjer *Adrianema adriaticum* (Ercegović) G.De Toni 1936, *Dalmatella* spp. i *Voukiella rupestris* Ercegović 1925. U zadnjih desetak godina provedeno je

nekoliko istraživanja usmjerenih na bentičke cijanobakterije Jadrana. Metabarkodiranjem uzoraka sedimenta središnjeg i južnog Jadrana 2020. godine zabilježene su dvije do tada nekultivirane grupe cijanobakterija te 13 većinom bentičkih rodova, pri čemu su rodovi *Xenococcus* (filamentni) i *Pleurocapsa* (kokoidni) bili prisutni u gotovo svim uzorcima (Kolda i sur., 2020). Rezultati analize baterijskih zajednica obraštaja na i u stijinama s plaže Sakarun na Dugom otoku (središnji Jadran) pomoću metode 16S RNA amplikonskog profiliranja te dodatne morfološke analize svjetlosnim mikroskopiranjem (Palinska i sur., 2017) ukazali su kako je 42 % sekvenci pripadalo cijanobakterijama, a najveći postotak zauzimale su u donjem mediolitoralu. Red Pleurocapsales bio je dominantan među sekvencama cijanobakterija, a uglavnom se pojavljivao u epilitskim i endolitskim uzorcima supralitorala. Samo oko 2 % sekvenci pripadalo je redovima Oscillatoriales i Nostocales, a oni su prodirali dublje u stijene u mediolitoralnoj zoni. Zabilježeno je 11 rodova cijanobakterija, a 12 morfotipova uspješno je determinirano do razine vrste (Palinska i sur., 2017). Na istoj je lokaciji 2015. godine napravljeno detaljno istraživanje bioraznolikosti cijanobakterija molekularnim i morfološkim analizama u udubinama supralitorala povremeno ispunjenih slanom vodom, pri čemu je zabilježeno ukupno 29 rodova te 12 vrsta (Brandes i sur., 2015).

Morfološkom analizom epilitske zajednice supralitoralne zone otoka Veruda (sjeverni Jadran) i Ugljan (središnji Jadran) određene su čak 42 vrste (Vondrášková, 2017). Rod *Hyella* i vrsta *Gloeocapsopsis crepidinum* (Thuret 1854) Geither ex Komárek 1993 pronađene su u najvećem broju uzoraka s oba otoka, a druge vrste prisutne u većini uzoraka bile su *Solentia* spp., *Kyrtuthrix dalmatica* Ercegovic 1929 i *Mastigocoleus testarum* Lagerheim ex Bornet i Flahault 1886.

U Sjevernome Jadranu proučavan je utjecaj proliferacije bentičke vrste dinoflagelata *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo, 1981 na epifitski i epilitski mikrofitobentos na dubini oko 0,5 metara (Accoroni i sur., 2016). Zabilježene cijanobakterije, pripadnici reda Oscillatoriales i vrsta *Spirulina* sp., imale su najveću brojnost od svih proučavanih skupina tijekom ljetnih mjeseci, uključujući za vrijeme proliferacije dinoflagelata, dok su ostatak godine dominirale dijatomeje (Accoroni i sur., 2016). Iz površinskih uzoraka uzetih s mjesta ispuštanja otpadnih voda rafinerije nafte kod Urinja izolirane su vrste *Phormidium lucidum* Kützing ex Gomont 1892, *Spirulina subsalsa* Oersted ex Gomont 1892 te rodovi *Neolyngbya* i *Pseudoanabaena* (Haberle i sur., 2020).

Pregledom prijašnjih istraživanja bentičkih cijanobakterija Jadranskog mora može se zaključiti da je sastav zajednica cijelog područja još uvijek nedovoljno istražen, a posebice nedostaju podaci dobiveni korištenjem polifaznog pristupa koji uključuje morfološku i molekularnu karakterizaciju.

Tablica 1. Rodovi i vrste otkriveni na području Jadranskog mora. Za svako je istraživanje navedena korištena metodologija i područje istraživanja. Rodovi označeni zvjezdicom (\*) predstavljaju endeme Jadrana

| rodovi/ vrste   | područje  | metodologija  | izvor                    |
|---|---|---|--------------------------|
| <i>Solentia intricata</i> Ercegovic 1927; <i>Solentia stratosa</i> Ercegovic 1927   | otoci Sulet, Čiovo te Sv. Arandjel ( <i>Solentia</i> ); okolica Splita ( <i>Aspalatia</i> ) | morfološki opis obraštaja   | Ercegović, 1927          |
| <i>Ercegovicia</i> ; <i>Ercegovicia litoralis</i> (Ercegović) De Toni 1936; <i>Hydropodocapsa pedicellata</i> (Ercegović) Molinari i Guiry 2021; <i>Podocapsa</i>   | Dalmacija   | morfološki opis obraštaja   | Ercegović, 1931          |
| <i>Aphanothece marina</i> (Ercegovic 1932) Komárek i Anagnostidis 1995; <i>Saxicolea adriatica</i> (Ercegović) Molinari i Sánchez Ocharan 2021  | Dalmacija   | morfološki opis obraštaja   | Ercegović, 1932          |
| <i>Arthrospira</i> , <i>Chroococciopsis</i> , <i>Cyanobacterium</i> , <i>Geminocystis</i> , <i>Hormoscilla</i> , <i>Pleurocapsa</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Xenococcus</i>  | središnji i južni Jadran  | metabarkodiranje  | Kolda i sur., 2020       |
| <i>Chroococciopsis</i> , <i>Hormathonema</i> , <i>Hyella</i> , <i>Kyrtuthrix</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Mastigocoleus</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Solentia</i>   | Sakarun, Dugi otok  | polifazni pristup (morfološka determinacija i pirosekvenciranje gena za 16S rRNA)       | Palinska i sur., 2017    |
| <i>Aphanocapsa</i> , <i>Aphanothece</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Chroococciopsis</i> , <i>Chroococcus</i> , <i>Dermocarpella</i> , <i>Entophysalis</i> , <i>Gloeobacter</i> , <i>Gloeocapsa</i> , <i>Gloeothece</i> , <i>Halomicronema</i> , <i>Halothece</i> , <i>Hormathonema</i> , <i>Hyella</i> , <i>Kyrtuthrix</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Mastigocoleus</i> , <i>Myxosarcina</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Pleurocapsa</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Rivularia</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Solentia</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Xenococcus</i> | Sakarun, Dugi otok  | polifazni pristup (morfološka determinacija i pirosekvenciranje gena za 16S rRNA)       | Brandes i sur., 2015     |
| pripadnici reda Oscillatoriales, <i>Spirulina</i> sp.   | Portonovo, Italija  | morfološka determinacija  | Accoroni i sur., 2016    |
| <i>Neolyngbya</i> , <i>Phormidium lucidum</i> Kützing ex Gomont 1892, <i>Pseudoanabaena</i> , <i>Spirulina subsalsa</i> Oersted ex Gomont, 1892   | Kostrena (Rijeka)   | polifazni pristup (morfološka determinacija i sekvenciranje gena 16S rRNA i regije ITS) | Haberle i sur., 2020     |
| <i>Aphanocapsa</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Chlorogloea</i> , <i>Chroococciopsis</i> , <i>Chroococcus</i> , <i>Cyanosaccus</i> , <i>Cyanosarcina</i> , <i>Cyanostylon</i> , <i>Entophysalis</i> , <i>Geitlerinema</i> , <i>Gloeocapsa</i> , <i>Gloeocapsopsis</i> , <i>Hyella</i> , <i>Kyrtuthrix</i> , <i>Leibleinia</i> , <i>Mastigocoleus</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Pleurocapsa</i> , <i>Podocapsa</i> , <i>Pseudocapsa</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Solentia</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Tapinothrix</i> , <i>Trypanema endolithicum</i> *                            | Verudela i Ugljan   | morfološka determinacija  | Vondrášková i sur., 2017 |
| <i>Aphanothece</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Rivularia</i>   | Ugljan  |   |                          |
| <i>Scytonematopsis</i>  | Verudela  |   |                          |

#### 1.4. Cijanobakterije u epizoičkim zajednicama biofilma morskih kornjača

Mikrobiom je naziv za zajednicu mikroorganizama povezanih s organizmom domaćinom, uključujući njihove genome i metaboličke aktivnosti (Berg i sur., 2020). Mikrobiom koji nastanjuje površinu drugog organizma ili bazibionta naziva se mikroepibiom. Epibiont je pripadnik epibioma (Downes i sur., 2023). Cijanobakterije su poznate sastavnice epibioma životinja (epizoičke cijanobakterije) i biljaka (epifitske cijanobakterije).

Sastav epizoičkih zajednica morskih kralježnjaka ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su vrsta i stanište domaćina te njegove biološke značajke (Ross i sur., 2019). Mikrobiom se može znatno razlikovati među pojedinim pripadnicima iste taksonomske skupine, ali je podudarnost između vrste domaćina i sastava epibioma zabilježena u različitim razreda kralježnjaka, na primjer kod sisavaca (Apprill i sur., 2014), gmazova (Robinson i sur., 2016) i vodozemaca (Jani i sur., 2021). Dio epibioma koji je zajednički svim pripadnicima neke vrste nazivamo jezgrenom svojtama (eng. *core taxa*).

Istraživanje mikrobioma kralježnjaka unaprijeđeno je razvojem molekularnih metoda pomoću kojih je moguće mnogo brže inventarizirati svoje mikroorganizama. Kod morskih kornjača najviše je istraživani mikrobiom gastrointestinalnog trakta (Kuschke, 2022). U istraživanjima epibioma naglasak je na dijatomejama, dok su cijele zajednice ili druge sastavnice veoma rijetko proučavane. Epizoičke cijanobakterije kornjača Sredozemnog mora istraživane su uglavnom kao dio cjelokupne proučavane mikrobne zajednice. Alduina i suradnici (2020) analizirali su zajednicu bakterija na koži glavatih želvi nasukanih na obali Sicilije metodama sekvenciranja 16S rRNA gena te biokemijskim testovima, pri čemu su zabilježili pripadnika rodove *Aeromonas* i *Klebsiella*. Kanjer i suradnici (2022) istražili su cjelokupni sastav epizoičke zajednice kože i karapaksa glavatih želvi Mediteranskog mora sekvenciranjem gena za 16S i 18S rRNA te utvrdili da se epibiom različitih dijelova tijela kornjača razlikuje. Najbrojniji zabilježeni razredi heterotrofnih bakterija bili Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria i Bacteroidia, a porodice *Rhodobacteraceae*, *Moraxellaceae* i *Pseudoalteromonadaceae*. Razredi Gammaproteobacteria i Oligoflexia s porodicama *Sedimenticolaceae* i *Saccharospirillaceae* činili su jezgrene svoje. Najbrojnije cijanobakterije bile su *Phormidesmiaceae* i *Paraspirulinaceae*. Blasi i sur. (2021) koristili su kombinaciju morfološke determinacije i NGS-a (*next generation sequencing*) za inventarizaciju i analizu rasporeda epibiotičkih organizama na karapaksu glavatih želvi Tirenskog mora. Najbrojnija je bila epizoička crvena alga roda *Polysiphonia*, a pronađene su i tri vrste cijanobakterija: *Scytonematopsis crustacea* (Thuret ex Bornet i Flahault) Kováčlik i Komárek 1988, *Leibleinia gracilis* (Rabenhorst ex Gomont 1892) Anagnostidis i Komárek 1988 te *Lyngbya sordida* Gomont 1892.

Kanjer i sur. (2024) donose pregled epizoičkih cijanobakterija karapaksa 28 nasukanih ili ozlijeđenih glavatih želvi različitih dobnih skupina (od juvenilnih do odraslih jedinki) s područja istočne obale Jadranskog mora. Uzorci s većine jedinki kornjača uzeti su pri dolasku u prihvatilište, a s tri jedinke uzorci su uzeti odmah na mjestu njihova pronalaska. Uzorkovani su i obraštaji u bazenima s

kornjačama i s potopljenih kamenitih površina blizu prihvatilišta kornjača u Puli kako bi se njihov sastav usporedio s epibiomom kornjača. Sekvenciranjem gena za 16S rRNA iz uzoraka i uspoređivanjem dobivenih sekvenci s bazom podataka CyanoSeq (Lefler i sur., 2023), dobiven je popis vrsta prisutnih na karapaksu te je podijeljen prema dobnim skupinama. Redovi Nodosilineales, Prochlorotrichales i Chroococcales te rodovi *Rhodoploca*, *Leptothoe* i *Cymatolege* bili su zastupljeni s najvećim brojem sekvenci kada su se gledali svi uzorci zajedno. Sastav cijanobakterijske zajednice adultnih i subadultnih jedinki statistički se značajno razlikovao od zajednice juvenilnih jedinki te je njegova raznolikost bila veća. Autori rada iz dobivenih su podataka zaključili da proučena zajednica cijanobakterija nije specifična za glavate želve te da postoji velika vjerojatnost da se njezini pripadnici mogu naći i u ostalim morskim bentičkim staništima.

Tablica 2. Rodovi i vrste otkriveni na morskim kornjačama Sredozemnog mora. Za svako su istraživanje navedene informacije o kornjačama (ako su bile dostupne), lokacije pronalaska kornjača te korištena metodologija. Važne napomene iz rada označene su zvjezdicama.

| svojte cijanobakterija   | dob kornjače | dio tijela kornjače | lokacije pronalaska kornjače                              | metoda određivanja cijanobakterija                        | izvor               |
|--|--------------|---------------------|---|---|---------------------|
| rodovi: <i>Arthrospira</i> , <i>Chroococcidiopsis</i> , <i>Geitlerinema</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Limnothrix</i> , <i>Phormidesmis</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Pleurocapsa</i> , <i>Sericytochromatia</i>  | N.A.         | karapaks i koža     | Jadransko more, Jonsko more, Egejsko more i Tirensko more | sekvenciranje gena za 16S rRNA                            | Kanjer i sur., 2022 |
| vrste: <i>Scytonematopsis crustacea</i> (Thuret ex Bornet i Flahault) Koválik i Komárek 1988; <i>Leibleinia gracilis</i> (Rabenhorst ex Gomont 1892) Anagnostidis i Komárek 1988; <i>Lyngbya sordida</i> Gomont 1892<br>redovi: Stigonematales, Pseudanabaenales | N.A.         | karapaks            | Liparski otoci, Tirensko more                             | morfološka determinacija i sekvenciranje gena za 16S rRNA | Blasi i sur., 2021  |
| Oscillatoriales, Spirulinales, Nodosilineales/Leptolyngbyales/Oculatellales*; Pseudanabenaes/ Prochlorotrichales*  | subadultna   | karapaks            | istočna obala Jadranskog mora                             | morfološka determinacija                                  | Kanjer i sur., 2024 |
| rodovi**: <i>Rhodoploca</i> , <i>Salileptolyngbya</i> , <i>Picosynechococcus</i> , <i>Odorella</i> , <i>Leptothoe</i> , <i>Cymatolege</i> , <i>Myxosarcina</i><br>porodice: Nodosilineaceae**, Prochlorotrichaceae, Pleurocapsaceae                              | adultne      | karapaks            | istočna obala Jadranskog mora                             | sekvenciranje gena za 16S rRNA                            | Kanjer i sur., 2024 |
| rodovi: <i>Rhodoploca</i> **, <i>Leptothoe</i> , <i>Cymatolege</i> , <i>Salileptolyngbya</i> , <i>Picosynechococcus</i> , <i>Odorella</i> , <i>Myxosarcina</i><br>porodice: Nodosilineaceae**, Prochlorotrichaceae, Pleurocapsaceae                              | juvenilne    | karapaks            | istočna obala Jadranskog mora                             | sekvenciranje gena za 16S rRNA                            | Kanjer i sur., 2024 |
| rodovi***: <i>Rhodoploca</i> , <i>Salileptolyngbya</i> , <i>Odorella</i> , <i>Leptothoe</i> , <i>Cymatolege</i> , <i>Picosynechococcus</i> , <i>Odorella</i> , <i>Myxosarcina</i><br>porodice: Nodosilineaceae***, Prochlorotrichaceae, Pleurocapsaceae          | subadultne   | karapaks            | istočna obala Jadranskog mora                             | sekvenciranje gena za 16S rRNA                            | Kanjer i sur., 2024 |

\* nije bilo moguće odrediti red pomoću morfologije

\*\* jezgrene svojte

\*\*\* svojte prisutne kod 80% uzoraka

## 1.5. Evolucija i filogenija cijanobakterija

Cijanobakterije spadaju među najstarije organizme na Zemlji. Procjene pojave prvih oblika fotolitoautotrofnih cijanobakterija (odvajanja od sestrinske skupine Vampirovibrionia), temeljene na molekularnom satu, variraju između 3.3 – 3.6 (Boden i sur., 2021) te 2.5 milijardi godina starosti (Shih i sur., 2017). U tom dugom razdoblju postojanja nastanile su veoma različita staništa kojima su se morale prilagoditi, čime su razvile veliki broj raznolikih evolucijskih linija (Komárek, 2016).

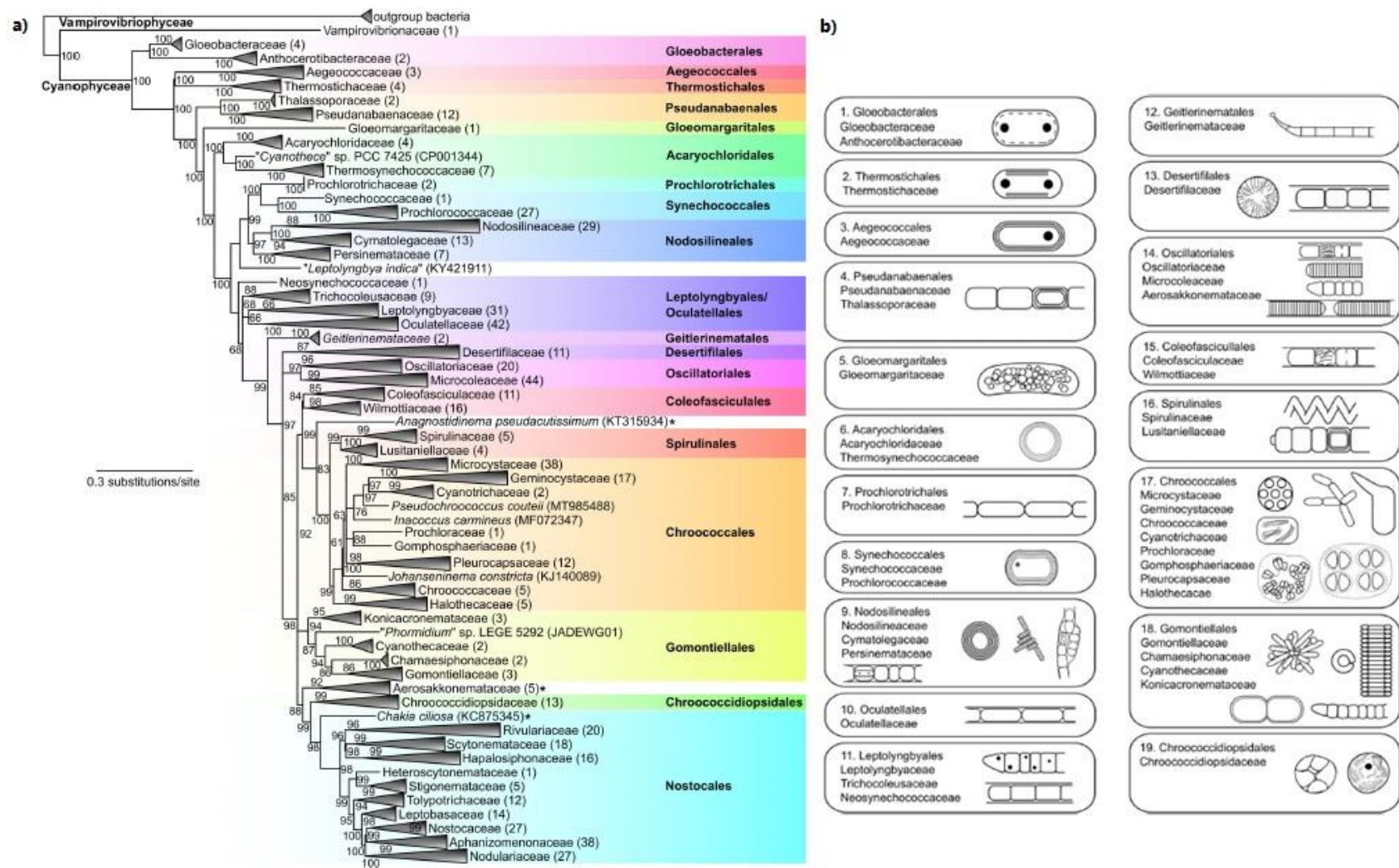
Prvi pokušaji klasifikacije cijanobakterija datiraju još iz kraja 19. stoljeća (Bornet i Flahault, 1886; Gomont, 1893). Geitler (1925) je predložio podjelu na sedam redova: Chroococcales, Entophysalidales, Pleurocapsales, Dermocarpales, Siphononematales, Nostocales i Stigonematales. Ovaj je sustav modificirao nekoliko puta u sljedećih 17 godina te se naposljetku 1942. godine odlučio za četiri reda: Chroococcales, Dermocarpales, Pleurocapsales i Hormogonales (Komárek i sur., 2014). Geitlerovi sustavi predmet su revizija drugih autora do današnjeg dana (Komárek i sur., 2014; Strunecký i sur., 2023). Rippka i suradnici (1979) predlažu podjelu cijanobakterija prema njihovoj morfologiji i životnom ciklusu koja nije u suglasju s tadašnjom taksonomijom pa redove zamjenjuju podsekcijama. Podsekcije I i II predstavljaju jednostanične vrste cijanobakterija. Podsekcija I sastoji se od jednostaničnih vrsta sferičnog, cilindričnog ili ovalnog oblika koje se razmnožavaju uobičajenom staničnom diobom. Podsekcija II obuhvaća rodove koji se razmnožavaju ili isključivo višestrukim diobom ili kombinacijom binarne i višestruke diobe. Svi pripadnici ove skupine imaju dodatni sloj oko vanjske stanične membrane, a stanice ga mogu dobiti tokom višestruke diobe, pri čemu nastaju nepokretne beocite, ili nakon višestruke diobe, pri čemu su beocite koje nastaju pokretne do njegove pojave. Podsekcije III, IV i V predstavljaju filamentne cijanobakterije, a glavne odlike na kojima se temelji njihova podjela su razvoj heterocita i akineta u trihomu, koje se pojavljuju samo u podsekcijama IV i V, te broj ravnina u kojima se zbiva dioba. Stanična dioba u podsekcijama III i IV odvija se isključivo paralelno s uzdužnom osi trihoma te su trihomi uvijek uniserijadni, dok se u podsekciji V dioba može odvijati u više ravnina te primarni trihom može postati multiserijatan. Isto tako, akinete podsekcije IV kličaju u jedan trihom bez grananja, dok akinete podsekcije V mogu kličati u više trihoma različitih smjerova rasta. U sve tri podsekcije pojavljuje se lažno grananje, a u podsekciji V kod većine je predstavnika prisutno pravo grananje. Sve tri podsekcije razmnožavaju se razvitkom hormogonija. Ovaj je sustav klasifikacije uvršten u Bergeyjev priručnik (Castenholz i sur., 2001).

Korištenjem opisanog sistema u znanstvenoj literaturi došlo je do potrebe za njegovim usklađivanjem sa klasičnom taksonomijom i Međunarodnim kodeksom nomenklature algi, gljiva i biljaka, pri čemu je prve tri podsekcije polifiletskog podrijetla potrebno revidirati u monofiletske skupine. Uz navedeno, razvoj molekularnih metoda omogućio je otkrivanje brojnih novih rodova i vrsti cijanobakterija te dolazak do novih spoznaja o već poznatim svojstama, što također zahtjeva reklasifikaciju. Navedenim je analizama u nekih svojti i filogenetski potvrđeno prema morfologiji pretpostavljeno monofiletsko podrijetlo (Orcutt i sur., 2002), a za neke je otkriveno da su polifiletske



(Gugger i Hoffmann, 2004). Hoffmann i suradnici (2005) pokušavaju uskladiti morfologiju, citologiju i filogeniju u jednu klasifikaciju pri čemu donose nekoliko važnih zaključaka. Prvo, tradicionalnu podjelu svih cijanobakterija na kokoidne i filamentne zamjenjuju podjelom prema rasporedu tilakoida u četiri podsekcije: Synechococcophycidae i Oscillatriophycidae, koje se sastoje od filamentnih i kokoidnih vrsta i polifiletskog su podrijetla, te Gloeobacteriophycidae i Nostochophycidae koje su monofiletskog podrijetla. Nadalje, potvrđuju monofiletsko podrijetlo heterocitnih cijanobakterija, ali otkrivaju polifiletsko podrijetlo podsekcija IV i V. Rod *Scytonema* iz podsekcije V zato pridružuju rodu Nostocales iz podsekcije IV kako bi stvorili monofiletsku skupinu.

Sljedeća značajna filogenetska revizija klasifikacije je ona Komáreka i suradnika (2014), u kojoj dodaju nove rodove i vrste. Njihovo filogenetsko stablo proizlazi iz sekvenci 31 proteina te na njemu određuju nove redove koje pokušavaju prikazati i morfološki. U ovom radu nije riješeno pitanje polifiletskih skupina Synechococcales i Oscillatoriales. Sekvenciranjem gena za 16S rRNA i upotrebom polifaznog pristupa u pokušajima klasifikacije cijanobakterija u razdoblju od 2014. do 2021. godine otkriveno je više od 80 novih rodova, pri čemu je utvrđeno kako je sistematika cijanobakterija prema rasporedu tilakoida potpuno usklađena s filogenijom samo u skupina Gloeobacterales i Geminocystaceae te da je raspored tilakoida homoplazija (Dvořák i sur., 2014). Ove su probleme pokušali riješiti Strunecký i sur. (2023) te su predstavili najnoviju i trenutno važeću klasifikaciju temeljenu na sekvencama gena za 16S rRNA te dopunjenu morfološkim značajkama (Slika 5.) Za predstavnike svojti uzeti su referentni sojevi gdje god je to bilo moguće, kako bi se u filogeniju mogla integrirati i tradicionalna podjela te podaci dobiveni polifaznim pristupom. Koljenu Cyanophyta dodaju razred nefotosintetskih bakterija Vampirovibriophyceae. Također razmještaju i djelomično rješavaju pitanje problematičnih polifiletskih skupina (na primjer skupine Synechococcales).



Slika 5. Trenutno važeća klasifikacija koju su opisali Strunecký i suradnici (2023) polifaznim pristupom: (a) filogenetsko stablo sa sekvencama gena za 16S rRNA, (b) morfološke značajke pripisane izdvojenim porodicama i rodovima (preuzeto iz: Strunecký i sur., 2023).

## 1.6. Usklađivanje tradicionalnog klasifikacijskog pristupa i filogenije

Tradicionalna klasifikacija cijanobakterija bila je zasnovana na jednostavnom principu da su predstavnici sličnih morfoloških obilježja grupirani zajedno. Tako su, na primjer, nastali redovi Chroococcales i Oscillatoriales koji su predstavljali sve kokoidne cijanobakterije, odnosno filamentne cijanobakterije bez mogućnosti stvaranja heterocita (Castenholz i sur., 2001). Takvi sustavi predstavljali su hijerarhiju podržanu različitim evolucijskim teorijama, ali njihovi su autori samo pretpostavljali monofiletsko podrijetlo redova. Razvitkom molekularnih metoda prvi se put pojavljuje mogućnost analize genetskog materijala te iščitavanja evolucijske povijesti taksona iz njega. Tada počinje prevladavati mišljenje da bi se klasifikacijski sustavi trebali temeljiti na evolucijskim linijama (Komárek i sur., 2014). Do danas nastaju brojni pokušaji da se ova dva sustava usklade, uz prethodno navedene (Komárek i Anagnostidis, 1986; 1989; Moreira i sur., 2017). Revizija nastalih morfoloških podjela korištenjem modernih metoda otkrila je polifiletsko podrijetlo brojnih skupina (Ishida i sur., 2001; Yu i sur., 2015; Raabová i sur., 2019), kao i da je veliki dio morfoloških značajki na kojima su se podjele temeljile homoplazije ili su nastale horizontalnim prijenosom gena (Schirrmeyer i sur., 2011; Dvořák i sur., 2014). Primjeri homoplazija korištenih u morfološkim klasifikacijama su parijetalni raspored tilakoida (Mareš i sur., 2019) i pravo grananje (Gugger i Hoffmann, 2004).

Polifazna karakterizacija u opisivanje svojiti cijanobakterija uključuje više metoda te sve raspoložive kriterije, a konačan opis kombinacija je filogenije, morfologije, fiziologije i ekologije te svojite (Komárek, 2016). Danas se smatra najboljim pristupom pri klasifikaciji nekog novootkrivenog predstavnika cijanobakterija ili reviziji već postojećih skupina (Komárek, 2016; 2020; Roncero-Ramos i sur., 2019; Ford i sur., 2021; Strunecký i sur., 2023). Glavna je prednost ovog pristupa mogućnost dodatnog utvrđivanja filogenetskih odnosa pridruživanjem većeg broja detaljnih i specifičnih značajki vžanih za sistematiku pojedinih taksona, čime se olakšava determinacija i klasifikacija izolata iz prirode (Gaget i sur., 2015; Strunecký i sur., 2023).

Potreba za korištenjem više tipova svojstava pri klasifikaciji cijanobakterija proizlazi iz osobine brojnih vrsta ove skupine da se razlike u njihovu genotipu ne očituju u morfologiji, a takve se vrste nazivaju kriptičnima. Situacija može biti i obrnuta te različite populacije iste vrste mogu morfološki izgledati dovoljno različito da ih se odvoji u nove vrste, a takve populacije nazivamo morfoskupinama ili ekoskupinama. Slična morfologija različitih vrsta posljedica je njihove prilagodbe na slične okolišne uvjete, a različita morfologija ili ekologija populacija iste vrste posljedica je prilagodbe na različite okolišne uvjete. Primjeri kriptičnih rodova su *Synechococcus*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Anabaena* (Komárek, 2016).

Kako bi se mogla ispitati morfološka, ekološka, citološka, biokemijska i fiziološka svojstva sojeva cijanobakterija, kao i izolirati potreban genetski materijal za filogenetsku analizu, nužno je pristupiti izolaciji i kultivaciji laboratorijskih sojeva (Temraleeva i sur., 2016).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je bio proširiti postojeće znanje o bentičkim (epilitskim svojama iz zone supralitorala i mediolitorala) i epibiotskim cijanobakterijama istočnog Jadranskog mora koristeći polifazni pristup te izolaciju laboratorijskih kultura.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1) Uspostavom monoklonalnih kultura proširiti postojeće znanje o morfologiji, ekologiji i filogeniji epilitskih cijanobakterija supralitorala i mediolitorala Jadranskog mora te epizoičkih cijanobakterija koje nastanjuju karapakse glavatih želvi Mediteranskog mora.

2) Doprinijeti upotpunjavanju referentnih baza sekvenci gena za 16S rRNA i ITS regije cijanobakterija radi preciznije determinacije sojeva izoliranih iz prirode.

3) Proširiti postojeće znanje o izolaciji i kultiviranju sojeva cijanobakterija.

Postavljene su tri hipoteze koje odgovaraju predloženim ciljevima istraživanja:

1) U zoni supralitorala i mediolitorala Jadranskog mora s područja otoka Malog Lošinja bit će određene još nezabilježene svojte cijanobakterija.

2) Potvrdit će se prisutnost svojti cijanobakterija u supralitoralu i mediolitoralu i na karapaksu glavatih želvi Mediteranskog mora zabilježenih u prijašnjim istraživanjima.

3) Kulture cijanobakterija iz supralitorala i mediolitorala razlikovat će se po morfologiji i taksonomskoj pripadnosti od onih uzgojenih iz epizoičkih obraštaja glavatih želvi.

### 3. MATERIJALI I METODE

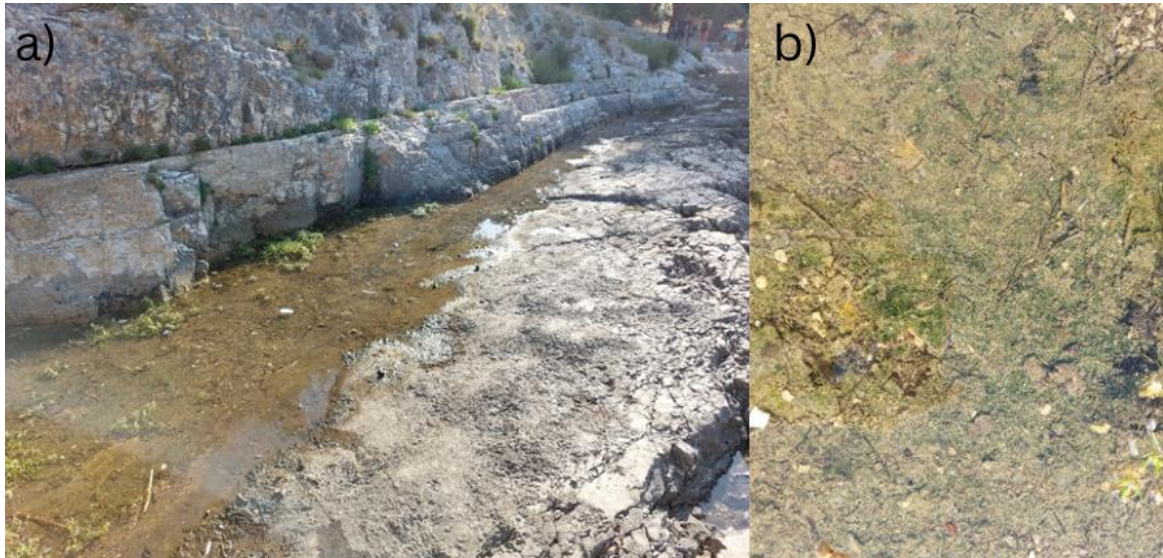
#### 3.1. Uzorkovanje

Za ovo je istraživanje sakupljeno ukupno 16 uzoraka fotosintetskog biofilma u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost Mikrobiom glavate želve (*Caretta caretta*): uvid u epizoičke i endozoičke zajednice – TurtleBIOME (UIP-2017-05-5635). Ukupno 8 uzoraka prikupljeno je s različitih podloga iz supralitoralne ili mediolitoralne zone otoka Malog Lošinja kao lako dostupnog, a u ovom smislu neistraženog područja, te 8 uzoraka s oklopa glavatih želvi nađenih u Jadranskom moru (Tablica 3.). Svi su uzorci pohranjeni u plastične posudice volumena 50 mL s filtriranom morskom vodom te čuvani izvan direktnog svjetla na sobnoj temperaturi do obrade i izolacije u laboratoriju.

Tablica 3. Tablica s oznakama i opisima uzoraka te datumima uzorkovanja. Za epilitske je uzorke navedena lokacija s koje su uzeti, a za epizoičke lokacija pronalaska kornjače s koje su uzeti. Navedena je duljina oklopa svake kornjače. CCL = *curved carapace length* (duljina karapaksa).

| oznaka uzorka | Tip staništa | lokacija uzorkovanja/<br>lokacija pronalaska      | datum uzorkovanja | detaljni opis uzorka/životinje                               |
|---------------|--------------|---|-------------------|--|
| ML1           | epilitski    | uvala Valdarke, Mali Lošinj, 44.527201, 14.480291 | 11.7.2023.        | crni obraštaj  |
| ML2           | epilitski    | uvala Valdarke, Mali Lošinj, 44.527201, 14.480291 | 11.7.2023.        | kamen sa zelenim obraštajem                                  |
| ML3           | epilitski    | uvala Valdarke, Mali Lošinj, 44.527201, 14.480291 | 11.7.2023.        | kamen sa zelenim obraštajem                                  |
| ML4           | epilitski    | uvala Valdarke, Mali Lošinj, 44.527201, 14.480291 | 11.7.2023.        | mulj sa zelenim obraštajem u supralitoralnoj lokvi           |
| ML5           | epilitski    | uvala Valdarke, Mali Lošinj, 44.527201, 14.480291 | 11.7.2023.        | obraštaj na stijeni  |
| ML6           | epilitski    | uvala Valdarke, Mali Lošinj, 44.527201, 14.480291 | 11.7.2023.        | obraštaj na stepenicama                                      |
| ML7           | epilitski    | uvala Valdarke, Mali Lošinj, 44.527201, 14.480291 | 11.7.2023.        | kamen sa zelenim obraštajem                                  |
| ML8           | epilitski    | uvala Veli Žal, Mali Lošinj, 44.524303, 14.457900 | 12.7.2023.        | obraštaj na stijeni  |
| TB245         | epizoički    | Ližnjan, Istarska županija                        | 3.4.2023.         | glavata želva Silvia (ID132), duljina oklopa CCL = 27 cm     |
| TB241         | epizoički    | luka Sv. Martin, Mali Lošinj                      | 3.4.2023.         | glavata želva Anika/ ID130, duljina oklopa CCL = 60 cm       |
| TB243         | epizoički    | Mali Lošinj                                       | 3.4.2023.         | glavata želva Tin/ ID131, duljina oklopa CCL = 39 cm         |
| TB249         | epizoički    | Šišan, Svetica, Istarska županija                 | 3.4.2023.         | glavata želva Claudio/ ID134, duljina oklopa CCL = 35 cm     |
| TB237         | epizoički    | Rovinj  | 3.4.2023.         | glavata želva Karlo Heinz/ ID128, duljina oklopa CCL = 38 cm |
| TB239         | epizoički    | Mali Lošinj                                       | 3.4.2023.         | glavata želva Otto/ ID129, duljina oklopa CCL = 50 cm        |
| TB247         | epizoički    | Park prirode Telašćica                            | 3.4.2023.         | glavata želva Jerko/ ID133, duljina oklopa CCL = 31,5        |
| TB251         | epizoički    | luka Sv. Martin, Mali Lošinj                      | 3.5.2023.         | glavata želva CC Lošinj 2305, nepoznata duljina oklopa       |

Uzorci iz supralitorala i mediolitorala sakupljeni su s čvrstih kamenih podloga gdje je dio mikrobnih obraštaja sastrugan džepnim nožićem ili je prikupljen kamenčić s obraštajem. S pomičnih podloga je sakupljen dio mulja s vidljivim zelenim obraštajem (Slika 6., Tablica 3.).



Slika 6. Stanište (a) s kojeg je uzorkovan uzorak ML4 (Uvala Valdarke, Mali Lošinj) i (b) detalj zelenog obraštaja supralitoralnih stijena.

Epizoički uzorci su prikupljeni sa sedam jedinki glavatih želvi smještenih u Centru za oporavak morskih kornjača u Akvariju Pula i jedne iz instituta Plavi svijet u Malom Lošinjju. Uzorci biofilma prikupljeni su pomoću četkice za zube s cijele površine karapaksa (

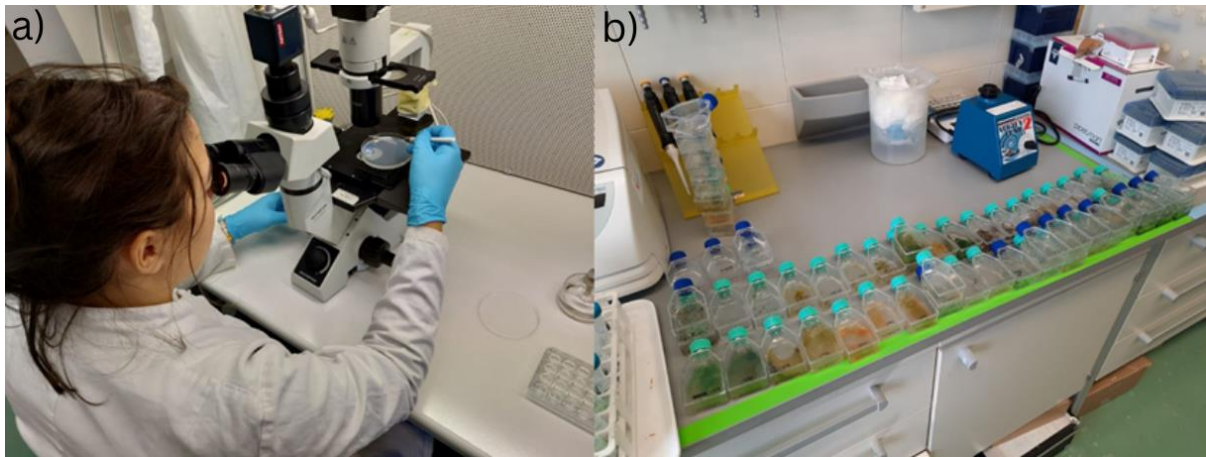
Slika 7., Tablica 3.). Detaljni podaci o individualnim kornjačama za sve jedinke su navedeni u Prilozima, u Tablici S2.



Slika 7. Primjer uzorkovanja mikrobnog obraštaja s karapaksa glavatih želvi pomoću sterilne četkice u sklopu projekta TurtleBIOME.

### 3.2. Izolacija cijanobakterijskih sojeva i uspostavljanje monokultura

Tijekom obrade prikupljenih uzoraka u laboratoriju primijenila sam niz radnji kako bih uspostavila monokulturu određenog cijanobakterijskog soja. Osnovni slijed koraka koje sam primijenila za svaki uzorak je: 1) priprema hranjive podloge za cijanobakterije MN i BG-11/ BG-11<sub>0</sub> (Prilog, Tablica S1.), 2) dodavanje određenog volumena uzorka u hranjivu podlogu, 3) tretiranje uzorka otopinom cikloheksimida za uklanjanje eukariotske kontaminacije (Foster i sur., 2022), 4) inokuliranje dobivene miješane cijanobakterijske kulture na čvrstu podlogu, 5) izolacija jednog filameta u tekuću podlogu te 6) izolacija narasle monokulture u veću bočicu za rast. Sve izolirane kulture držala sam u u komori za rast biljnih kultura na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a, u uvjetima 16 sati svjetla i 8 sati mraka (Lorenz i sur., 2005), na temperaturi od 22 °C, te sam ih pregledavala binokularnim invertnim svjetlosnim mikroskopom Olympus CX41 pod povećanjem od 100× (200× ili 400× u slučaju potrebe za detaljnijim pregledom kulture) svakih 1 do 4 tjedana kako bih pratila njihov rast.



Slika 8. Uspostavljanje monokultura cijanobakterija: (a) izolacija jednog filameta iz miješane kulture na krutoj hranjivoj podlozi, (b) sve uspostavljene monokulture u bočicama za rast

Prvi korak bio je priprema hranjive podloge namijenjene specifično za podržavanje rasta i razvoja cijanobakterija. MN tekuću hranjivu podlogu volumena 1000 mL napravila sam prema standardnom protokolu (Prilog, Tablica S1.; Rippka i sur., 1979). Tekuću hranjivu podlogu BG-11/ BG-11<sub>0</sub> volumena 1000 mL napravila sam prema protokolu također opisanom u Rippke i sur. (1979), uz dodavanje 35 g akvarijske soli (Prilog, Tablica S1.). Pri izradi čvrste podloge finalne koncentracije 1.5 % agara, prvo sam pripremila 2× koncentrirani tekući medij BG-11/ BG-11<sub>0</sub> (500 mL) te 3 %-tnu otopinu agara (7,5 g agara u 250 mL destilirane vode). Nakon autoklaviranja ovih otopina, regulacije njihove pH na neutralnu vrijednost te hlađenja na oko 50 °C, pomiješala sam 250 mL svake (Allen, 1968). Nastalu otopinu izlila sam u sterilne Petrijeve zdjelice promjera 60 mm. Podloge su se hladile u komori s laminarnim strujanjem zraka pod UV svjetlom dok nisu očvrstnule, oko 20 minuta. Pri izradi čvrste podloge s cikloheksimidom, otopinu cikloheksimida koncentracije 20 mg/μL dodala sam nakon miješanja dviju otopina u različitim volumenima.

Drugi korak uspostavljanja laboratorijskih monokultura, obogaćivanje, uključuje prebacivanje manjeg volumena svakog početnog uzorka u MN hranjivu podlogu kako bi se potakao rast stanica te kako bi izrasla miješana kultura. Ovaj korak zasniva se na principu da će prebacivanje okolišnog uzorka u hranjivu podlogu napravljenu za rast upravo cijanobakterija poboljšati rast cijanobakterijskih stanica kako bi njihova izolacija bila olakšana u daljnjim koracima. Pri tome sam napravila šest razrjeđenja uzoraka TB245, TB241, TB243, TB249, TB237, TB239 i TB247, od  $10\times$  do  $10^6\times$ , te dva razrjeđenja uzorka TB251, od  $10\times$  i  $100\times$  (Prilog, Tablica S3., Slika S1.). Naknadno sam manji volumen svakog početnog uzorka prebacila i u tekuće hranjive podloge BG-11/ BG-11<sub>0</sub> kako bih usporedila u kojem će se od svih triju hranjivih podloga razviti najgušće kulture (Tablica 4.; Prilog, Tablica S3., Slika S1.).

Treći korak je uklanjanje kontaminacije u obliku neželjenih mikroeuariotskih organizama kao što su gljivice i heterotrofni flagelati (Prilog, Tablica S3., Slika S1.). Kulture u tekućem mediju u kojima su primijećeni živi eukariotski organizmi tretirala sam cikloheksimidom (Sigma-Aldrich), koji djeluje kao inhibitor sinteze proteina u eukariotskim stanicama, kako bi u njima ostale samo cijanobakterije. Pri tome sam dio kulture presadila u novu tekuću ili čvrstu hranjivu podlogu s različitim koncentracijama cikloheksimida. Isprobane su koncentracije od 0,1 mg/mL do 0,5 mg/mL, a najveći uspjeh pokazivala je primjena otopine najveće koncentracije. Sva sam presađivanja vršila u laminaru prethodno steriliziranom UV svjetlošću (najmanje 15, a najviše 45 minuta) te dezinficiranom 70 %-tnim etanolom (Kawachi i Noël, 2005). Pri presađivanju uzela bih dio dovoljno razvijene kulture sterilnom plastičnom pipetom te ga prebacila u sterilnu jažicu s hranjivom podlogom koja je sadržavala cikloheksimid (Lorenz i sur., 2005).

U četvrtom koraku sakupila sam dio svake izrasle kulture s dna jažice ili Petrijeve zdjelice plastičnom ezom te vrh eze razmazala po krutoj hranjivoj podlozi (Prilog, Tablica S3., Slika S1.; Lorenz i sur., 2005). Cilj ovog koraka je bio dobiti razlučene pojedinačne filamente cijanobakterija na krutoj hranjivoj podlozi.

Peti korak je izolacija pojedinačnog filamenta s krute podloge u tekuću. Nakon umnažanja stanica i razvijanja miješane kulture na krutoj podlozi u njoj je bilo moguće svjetlosnim mikroskopom (Olympus CX41) vidjeti pojedinačne filamente različite debljine (Slika 8.) te izolirati pojedinačni u tekući medij. To je uključivalo pronalaženje što tanjeg i izoliranijeg filamenta te njegovo skupljanje vrhom sterilizirane laboratorijske iglice. Vrh bih prebacila u tekući medij u sterilnoj jažici/ Petrijevoj zdjelici te nekoliko puta lagano istrljala o rub jažice/ zdjelice kako bi filament ispao s njega, a zatim ga sterilizirala nad plamenikom prije sljedeće izolacije (Prilog, Tablica S3., Slika S1.).

Završni korak je izolacija dobivene monokulture u bočicu za stanične kulture većeg volumena za sakupljanje biomase. Kada bi u sterilnoj jažici/ Petrijevoj zdjelici izrasla monokultura prekrila cijelo ili većinu dna jažice/ Petrijeve zdjelice, sterilnom plastičnom pipetom uzela bih oko 2 mL biomase te presadila u bočicu za rast kultura volumena 50 mL, napunjenu s oko 20 mL tekuće hranjive podloge (Slika 8., Tablica 4.; Prilog, Tablica S3., Slika S1.)



Tablica 4. Informacije o uvjetima uzgoja monokultura, sakupljanju biomase, ekstrakciji DNA i sekvenciranju DNA

| ID soja  | uzorak | optimalni medij | datum izolacije monokulture u posudicu za rast | datum sakupljanja biomase | DNA ekstrahirana | datum ekstrakcije DNA | broj dana između izolacije monokulture u bočicu za rast i ekstrakcije DNA | uključene u filogenetsku analizu |
|----------|--------|-----------------|--|---------------------------|------------------|-----------------------|---|----------------------------------|
| PMFCY016 | ML4    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | 22.11.2023.               | +                | 23.11.2023.           | 44  | +                                |
|          |        |                 |  | 19.12.2023.               |                  |                       |   |                                  |
| PMFCY017 | ML4    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | 22.11.2023.               | +                | 23.11.2023.           | 44  | +                                |
| PMFCY018 | ML4    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | 22.11.2023.               | +                | 23.11.2023.           | 44  | +                                |
| PMFCY019 | ML4    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | 19.12.2023.               | +                | 23.11.2023.           | 44  | -                                |
| PMFCY020 | ML4    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | 19.12.2023.               | +                | 23.11.2023.           | 44  | +                                |
| PMFCY021 | ML5    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | 22.11.2023.               | +                | 23.11.2023.           | 44  | +                                |
| PMFCY022 | ML5    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | 22.11.2023.               | +                | 23.11.2023.           | 44  | +                                |
| PMFCY023 | ML5    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | 22.11.2023.               | +                | 23.11.2023.           | 44  | +                                |
| PMFCY024 | ML4    | BG-11M          | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | +                | 6.2.2024.             | 66  | +                                |
| PMFCY025 | ML4    | BG-11M          | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | +                | 6.2.2024.             | 66  | +                                |
|          |        |                 |  | 22.1.2024.                |                  |                       |   |                                  |
| PMFCY026 | ML4    | BG-11M          | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | +                | 6.2.2024.             | 66  | +                                |
|          |        |                 |  | 22.1.2024.                |                  |                       |   |                                  |
| PMFCY027 | ML4    | BG-11M          | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | +                | 6.2.2024.             | 66  | +                                |
| PMFCY028 | ML2    | BG-11M          | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | +                | 6.2.2024.             | 66  | +                                |
|          |        |                 |  | 22.1.2024.                |                  |                       |   |                                  |
| PMFCY029 | ML2    | BG-11M          | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | +                | 6.2.2024.             | 66  | +                                |
|          |        |                 |  | 22.1.2024.                |                  |                       |   |                                  |
| PMFCY030 | ML2    | BG-11M          | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | +                | 6.2.2024.             | 66  | +                                |
|          |        |                 |  | 22.1.2024.                |                  |                       |   |                                  |
| PMFCY031 | ML2    | BG-11M          | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | -                | /                     | /   | -                                |
| PMFCY032 | ML2    | BG-11M          | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | -                | /                     | /   | -                                |
| PMFCY033 | ML6    | BG-110M         | 1.12.2023                                      | 22.1.2024.                | +                | 6.2.2024.             | 66  | +                                |
| PMFCY034 | ML6    | BG-110M         | 1.12.2023                                      | 22.1.2024.                | +                | 6.2.2024.             | 66  | +                                |

Tablica 4. nastavak

| ID soja  | uzorak | optimalni medij | datum izolacije monokulture u posudicu za rast | datum sakupljanja biomase | DNA ekstrahirana | datum ekstrakcije DNA     | broj dana između izolacije soja i ekstrakcije DNA | uključene u filogenetsku analizu |
|----------|--------|-----------------|--|---------------------------|------------------|---------------------------|---|----------------------------------|
| PMFCY035 | ML6    | BG-110M         | 1.12.2023                                      | 19.12.2023.               | +                | 6.2.2024.                 | 66  | +                                |
|          |        |                 |  | 22.1.2024.                |                  |                           |   |                                  |
| PMFCY036 | ML8    | BG-110M         | 1.12.2023                                      | 22.1.2024.                | +                | 6.2.2024.                 | 66  | +                                |
| PMFCY037 | ML8    | BG-110M         | 1.12.2023                                      | /                         | -                | /                         | /   | -                                |
| PMFCY038 | ML4    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | 27.2.2024.                | +                | 28.2.2024.                | 139   | +                                |
| PMFCY039 | ML4    | BG-11M          | 10.10.2023                                     | /                         | -                | /                         | /   | -                                |
| PMFCY040 | ML4    | BG-11M          | 19.12.2023                                     | 22.1.2024.                | +                | 6.2.2024.                 | 48  | +                                |
| PMFCY041 | ML4    | BG-11M          | 19.12.2023                                     | 22.1.2024.                | +                | 6.2.2024.                 | 48  | +                                |
| PMFCY042 | ML4    | BG-11M          | 19.12.2023                                     | 22.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 49  | +                                |
| PMFCY043 | ML1    | BG-11M          | 19.12.2023                                     | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 49  | +                                |
| PMFCY044 | ML1    | BG-11M          | 19.12.2023                                     | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 49  | +                                |
| PMFCY045 | ML1    | BG-11M          | 19.12.2023                                     | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 49  | +                                |
| PMFCY046 | ML5    | BG-11M          | 10.1.2024                                      | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 28  | +                                |
| PMFCY047 | TB245  | BG-11M          | 10.1.2024                                      | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 28  | +                                |
| PMFCY048 | TB245  | BG-11M          | 10.1.2024                                      | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 28  | +                                |
| PMFCY049 | TB251  | BG-11M          | 10.1.2024                                      | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 28  | +                                |
| PMFCY050 | TB251  | BG-11M          | 10.1.2024                                      | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 28  | +                                |
| PMFCY051 | TB251  | BG-11M          | 10.1.2024                                      | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 28  | +                                |
| PMFCY052 | TB251  | BG-11M          | 10.1.2024                                      | 26.1.2024.                | +                | 7.2.2024.                 | 28  | +                                |
| PMFCY053 | ML8    | BG-110M         | 10.1.2024                                      | 12.2.2024.                | +                | 12.2.2024.                | 33  | +                                |
| PMFCY054 | ML8    | BG-110M         | 10.1.2024                                      | 12.2.2024.                | +                | 12.2.2024.                | 33  | +                                |
| PMFCY055 | TB251  | BG-11M          | 7.2.2023                                       | 27.2.2024.                | +                | 28.2.2024.                | 21  | -                                |
| PMFCY056 | TB237  | BG-11M          | 7.2.2023                                       | 12.2.2024.                | +                | 12.2.2024./<br>28.2.2024. | 22  | -                                |
| PMFCY057 | TB251  | BG-11M          | 7.2.2023                                       | 27.2.2024.                | +                | 28.2.2024.                | 22  | -                                |
| PMFCY058 | TB251  | BG-11M          | 7.2.2023                                       | 27.2.2024.                | +                | 28.2.2024.                | 22  | -                                |

### 3.3. Morfološke, molekularne i filogenetske analize izoliranih sojeva

Morfološka analiza monokultura uključivala je njihovo opisivanje i fotografiranje na makroskopskoj i mikroskopskoj razini. Razvijene monokulture u bočicama fotografirala sam pomoću kamere na mobitelu (model Samsung Galaxy A51) te sam zabilježila sljedeća makroskopska svojstva: homogenost obraštaja, vidljivost filamenata u obraštaju, boju i način rasta obraštaja (uz podlogu ili plutajući). Trihome sam promatrala pomoću Zeiss Axio Imager.A2 svjetlosnog mikroskopa i fotografirala kamerom Axiocam 305 i softverom ZEN Blue, na povećanjima od 200×, 400× te 1000×. Zabilježila sam sljedeće značajke trihoma svakog soja ključne za morfološku determinaciju: oblik, homocističnost, simetriju polova, boju, oblik stanica, duljinu i širinu stanica, oblik apikalne stanice, prisutnost nekridija, grananja, heterocista, kaliptre i akineta te raspored tilakoida. Svakom sam soju izmjerila duljinu i širinu 30 stanica, na 5 do 13 različitih trihoma, u softveru ZEN Blue te odredila srednje vrijednosti uzetih mjera u programu Microsoft Excel. Sojevi koji su dijelili iste ili slične određene značajke grupirani su u morfotipove.

Za izolaciju DNA bilo je potrebno sakupiti minimalno 250 mg biomase svake monokulture. Biomasi bih skupila nakon što bi obraštaj pokrio cijelo dno bočice za rast, a prije nego je primijećeno starenje kulture, točnije 21 do 139 dana nakon početne izolacije monokulture u bočicu za rast, ovisno o soju (Tablica 4.). Manji volumen svake kulture prebacila bih u novu bočicu (oko 2 mL materijala u oko 20 mL medija) ili Falcon plastičnu epruvetu (oko 1 mL materijala u oko 7 mL medija), a ostatak bih, dio po dio, sastrugala s dna posudice. Sastrugani bih dio biomase prebacila u Eppendorf mikroeprevetu volumena 2 mL sterilnom plastičnom pipetom te centrifugirala (centrifuga Fisherbrand accuSpin Micro21) 1 minutu na 10 000 g. Nakon centrifugiranja, odbacila bih supernatant iz mikroeprevete, a u slobodan prostor prebacila bih sljedeći sastrugani dio biomase. Opisane sam korake ponavljala dok nisam prikupila svu biomasu iz bočice. Prikupljeni uzorci biomase cijanobakterija pohranjeni su na – 20 °C u Eppendorf epruvetama.

Ukupnu DNA iz uzoraka ekstrahirala sam prema standardnom protokolu proizvođača QIAGEN pomoću DNeasy PowerSoil Kit, s nekoliko modifikacija: centrifugiranje od 30 sekundi produljeno je na 1 minutu, otopina C4 dodana je u mikroeprevetu u dva navrata, prvo 900 µL pa 300 µL, a nakon svakog je odrađen sljedeći korak, te je dodano 50 µL otopine C6 umjesto 100 µL. Pri radu s više od 12 uzoraka vrijeme vorteksiranja mikrotubica u horizontalnom položaju povećala sam na 20 minuta. Ekstrahirana DNA čuvana je na – 20 °C. Detaljnije informacije o prikupljanju biomase i ekstrakciji DNA opisane su u Tablici S2. Datumi ekstrakcije DNA pojedinog soja, kao i sojevi za koje ekstrakcija nije bila moguća, navedeni su u Tablici 4. te u Tablici S3.

Lančanom reakcijom polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) u uređaju Techne Prime Thermo Cycler umnožila sam segment 16S-23S duljine oko 1800 pb koji uključuje dio gena za 16S rDNA te ITS regiju (Ruocco i sur., 2018). U PCR reakcijama koristila sam par početnica 27F i

23S30R. Imena početnica korištenih za PCR, njihove sekvence te dijelovi DNA za koje se vežu navedeni su u Tablici 5.

Tablica 5. Početnice korištene za sekvenciranje DNA, njihove sekvence te brojevi nukleotida u smjeru 5' – 3'na koje vežu.

| ime početnice | sekvenca (5' – 3')     | pozicija na 16S rRNA bakterije <i>E. coli</i> | Literatura             |
|---------------|------------------------|---|------------------------|
| 27F*          | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG   | 8-27  | Casamatta i sur., 2003 |
| 23S30R*       | CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT | 52-30   | Taton i sur., 2003     |
| 359F          | GGGGAATYTTCCGCAATGGG   | 359-378                                       | Nübel i sur. 1997      |
| 979F          | CGATGCAACGCGAAGAAC     | 962 -979                                      | Hrouzek i sur., 2005   |
| 1092R         | GCGCTCGTTGCGGGACTT     | 1109-1092                                     |                        |
| 1492R         | TACCTTGTTACGACTT       | 1507-1492                                     | Muyzer i sur., 1995    |

\*početnice korištene u lančanoj reakciji polimeraze

PCR reakcijska smjesa volumena 50 µL sadržavala je sljedeće volumene reagensa: 22 µL dH<sub>2</sub>O, 0,5 µL otopina početnica koncentracija 0,2 µM, 25 µL Takara Emeraldamp Master Mixa i 2 µL izolirane DNA. Početna denaturacija odvijala se 10 minuta na 94 °C, a umnažanje ciljnog DNA segmenta odvijalo se u 35 ciklusa od kojih se svaki sastojao od sljedećih koraka: 45 sekundi denaturacije DNA na 94 °C, 45 sekundi prijanjanja početnica na 52 °C te 2 minute sinteze novih lanaca DNA na 72 °C. Konačna sinteza, to jest elongacija novih lanaca DNA odvijala se 7 minuta na 72 °C.

Kako bih provjerila uspješnost umnažanja DNA, produkte PCR-a vizualizirala sam u 1 %-tnom agaroznom gelu elektroforezom. Za pripremu gela od 22 jažice, u 35 mL pufera TAE 1× dodala sam 0,35 g agaroze te dobivenu otopinu zagrijavala u mikrovalnoj pećnici dok se agarozna nije otopila, a zatim ostavila u kalupu 20 minuta kako bi se stvrdnula. U svaku sam jažicu dodala 5 µL otopine s PCR produktima. Elektroforeza se odvijala na gelu uronjenom u pufer TAE 1× na 100V 20 minuta. Gel sam nakon elektroforeze na 20 minuta uronila u otopinu Midori Green boje u puferu TAE 1× (60 µL boje u 300 mL pufera). DNA na gelu vizualizirana je pod UV svjetlom.

Uzorke s uspješno amplificiranom DNA pročistila sam pomoću kompleta i prema protokolu Macherey-Nagel NucleoSpin Gel PCR Clean-up, s jednom modifikacijom: za eluciju DNA dodala sam 50 µL pufera NE. U 5 µL pročišćenih PCR produkata uzorka dodala sam 5 µL otopine početnica u koncentracijama od 5 do 10 µM. Svaki je uzorak pomiješan sa svakom početnicom navedenom u Tablici 5. te poslan na Sanger sekvenciranje u komercijalnu tvrtku za usluge sekvenciranja Macrogen.

Dobivene sekvence svakog soja obradila sam u programu Geneious Prime (Graphstats Technologies), a nadalje je opisan proces obrade sekvenci jednog zasebnog soja, u dva koraka. Prvo sam svakoj sekvenci odrezala krajeve s bazama niske kvalitete (nejasnih signala na elektroferogramu). Zatim sam sekvence poredala prema mjestima poklapanja (eng. *assembly*) tako da dobijem skupnu sekvencu (sve sekvence soja koji se obrađuje spojene u jednu) cijele ciljane regije (eng. *contig*). Pri

tome sam pazila da je smjer čitanja svih sekvenci točan. Ciljana regija sastojala se od dva markera – gena za 16S rRNA te regije ITS. Svaka skupna sekvenca podijeljena je na ova dva markera. Drugi korak uključivao je BLAST pretraživanje baze podataka NCBI Gen Bank (*Nucleotide collection*) modelom *Megablast* u programu Geneious Prime. Pretraživala sam koristeći skupnu sekvencu cijele ciljane regije, samo gena za 16S rRNA te samo ITS regije te u svakom pretraživanju dobila deset rezultata.

Nakon dobivanja rezultata pretraživanja, sekvence svih sojeva obrađivala sam zajedno. Prvo sam napravila dvije velike skupine sekvenci: a) skupne sekvence gena za 16S rRNA svih sojeva grupirane sa rezultatima pretraživanja svih sojeva u kojima se koristila ova regija i b) skupne sekvence regije ITS svih sojeva grupirane s rezultatima pretraživanja svih sojeva u kojima se koristila ova regija. Svakoju su od skupina dodane sekvence tipičnih predstavnika različitih rodova cijanobakterija. Zatim sam napravila poravnanje svih sekvenci u skupini, za obje skupine. Za poravnanje sam koristila program Clustal Omega (Madeira i sur., 2024). Iz poravnanja su izrađena ogleđna filogenetska stabla (svako za jednu skupinu) te su ona korištena za daljnju analizu. Napravila sam dva stabla metodom FastTree s modelom supstitucije nukleotida General Time Reversible. Finalno filogenetsko stablo izrađeno je u programu IQTREE2 (Minh i sur., 2020), koristeći metodu najveće sličnosti (ML – maximum likelihood). Supstitucijski model ispitan je programskim dodatkom ModelFinder te je korišten model supstitucije TIM3e+R6. *Ultrafast bootstrap* metoda je korištena sa 1000 ponavljanja (Hoang i sur., 2018). U konačnoj filogenetskoj analizi odlučila sam koristiti samo gen za 16S rRNA zbog bolje podržanosti stabla te nedostatnog broja ITS sekvenci u referentnim bazama podataka.

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Morfološka karakterizacija izoliranih sojeva cijanobakterija**

U ovom radu uspješno su izolirana 34 soja cijanobakterija, 28 iz epilitskih i 6 iz epizoičkih uzoraka. Opisana je morfolologija stanica i kolonija te su svi sojevi fotografirani pod svjetlosnim mikroskopom. Sojevi su grupirani zajedno ako su imali slične morfološke značajke u sljedećim kategorijama: obliku i polarnosti trihoma, boji trihoma, vrstama stanica u trihomu (homocitni ili heterocitni), konstrikciji, veličini i obliku stanica, obliku apikalne stanice, tipu ovojnice, mobilnosti te boji obraštaja. Izdvojena su četiri morfološka tipa koja su izolirana sa sličnih staništa (Tablica 6.). Morfološke skupine u potpunosti se poklapaju s filogenetskim skupinama na dobivenom stablu te je svaka odvojena filogenetska skupina okarakterizirana određenim morfološkim svojstvima.

Tablica 6. Četiri prepoznata morfortipova s opisom zajedničkih značajki.

| Morfortip | Oblik i boja trihoma   | Polarnost trihoma | Prisutnost heterocita               | Konstrikcija | Oblik stanica  | Tip ovojnice   | Mobilnost trihoma   | Boja obraštaja                    | Prirodni okoliš                                     |
|-----------|--|-------------------|-------------------------------------|--------------|--|--|---|-----------------------------------|---|
| 1         | cilindrični, ravni ili blago valoviti, dugački, tamnozeleni  | izopolarni        | ne                                  | blaga        | cilindrične, uglavnom izodijamerne; apikalna stanica hemisferična  | tanka i čvrsta                                       | sporo klizanje (negativna fototaksija) ili originalno stanište lateralno pomicanje vrhova trihoma | tamnozeleno - tirkizna            | epilitske u zoni supralitorala i mediolitorala mora |
| 2         | dugački, veoma tanki, ravni ili zavojiti, tamnozeleni  | izopolarni        | ne                                  | monoliformni | izodijamerne s manjim varijacijama u objema osima, cilindrične zaobljenih polova; apikalne stanice se ne razlikuju od ostalih ili su hemisferične          | široka i čvrsta                                      | nije primijećeno kretanje   | tamnozeleno s tamnijim nakupinama | epilitske u zoni supralitorala i mediolitorala mora |
| 3         | duljina varira, ravni, sužavaju se od bazalnog prema terminalnom s hijalnim nastavkom, tamnozeleni | heteropolarni     | bazalne ili interkalarne, solitarne | izražena     | diskoidne, smanjuju se prema terminalnom kraju; stanice terminalnog kraja cilindrične i izodijamerne; apikalne stanice veće ili se ne razlikuju od ostalih | široka i čvrsta, zaobljena ili otvorena na krajevima | nije primijećeno kretanje   | tamnozeleno                       | epilitske u zoni supralitorala i mediolitorala mora |
| 4         | tanki i dugački, ravni, smečkasto – zelene boje  | izopolarni        | ne                                  | izražena     | cilindrične, izodijamerne do višestruko dulje od široke; apikalne stanice su hemisferične  | tanka i čvrsta                                       | nije primijećeno kretanje   | smečkasto - tamnozeleno           | karapaks glavatih želvi                             |

U Tablici 7. za svaki je soj navedeno kojem morfotipu pripada te koji mu je rod najrodniji prema filogenetskoj i morfološkoj analizi. Također je navedena srednja vrijednost izmjerenih duljina i širina 30 stanica svakog soja.

Tablica 7. Morfološke značajke izoliranih sojeva. Svakom je morfološkom tipu pridodan rod prema filogenetskoj pripadnosti, a svakom soju prosječna duljina i širina stanice. Izmjeren je 30 stanica svakog soja na 5 – 13 različitih trihoma.

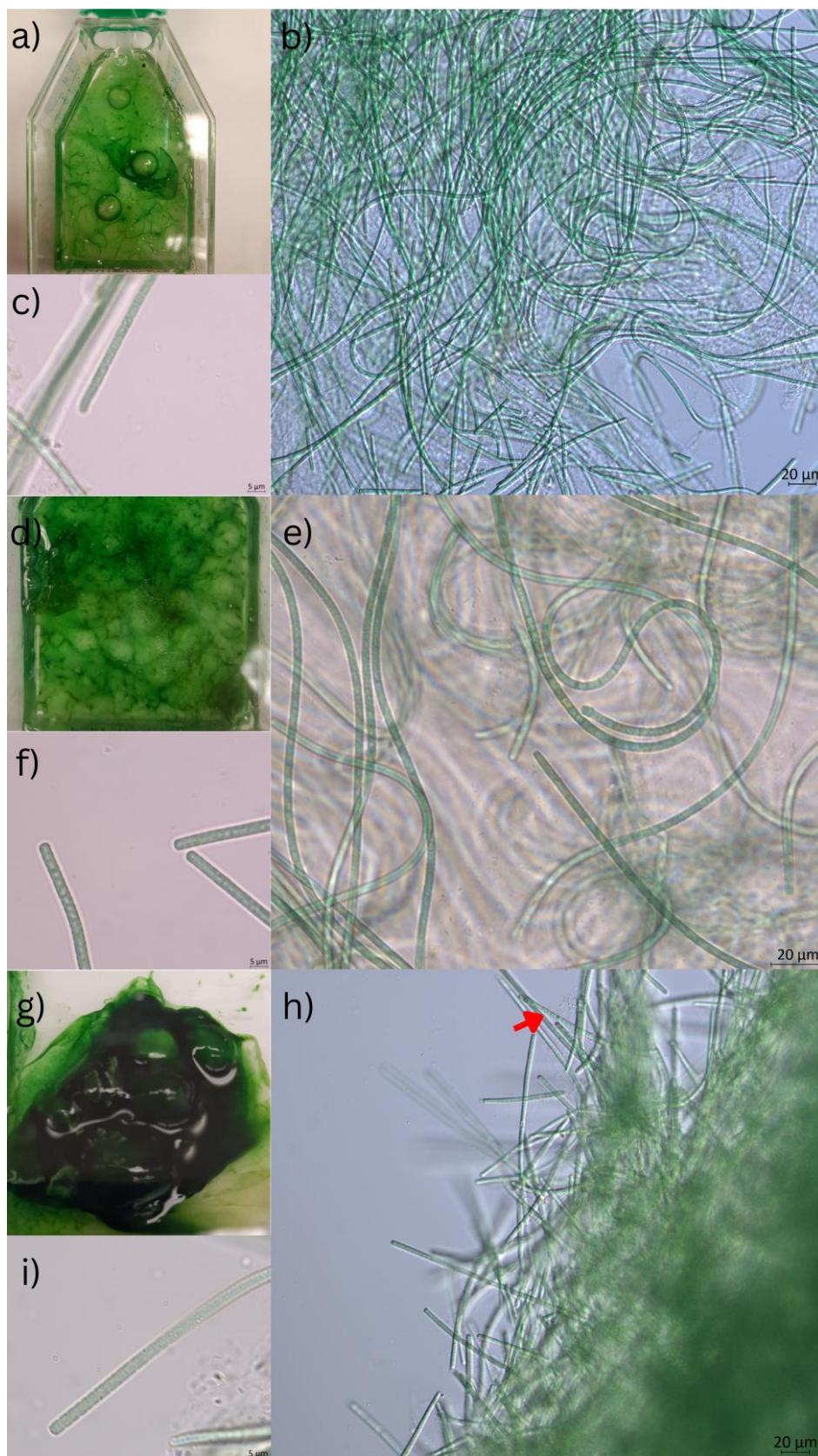
| ID soja  | Duljina ( $\mu\text{m}$ ) | Širina ( $\mu\text{m}$ ) | Morfološki tip | Karakteristični rod prema filogenetskoj klasifikaciji |
|----------|---------------------------|--------------------------|----------------|---|
| PMFCY016 | 2,735                     | 2,679                    | tip 1          | <i>Sodalinema</i>                                     |
| PMFCY017 | 2,376                     | 2,919                    |                |   |
| PMFCY018 | 1,919                     | 2,901                    |                |   |
| PMFCY020 | 3,366                     | 3,262                    |                |   |
| PMFCY024 | 2,375                     | 3,416                    |                |   |
| PMFCY025 | 3,000                     | 3,286                    |                |   |
| PMFCY026 | 2,669                     | 3,311                    |                |   |
| PMFCY027 | 2,411                     | 3,060                    |                |   |
| PMFCY028 | 2,590                     | 2,846                    |                |   |
| PMFCY029 | 3,224                     | 3,367                    |                |   |
| PMFCY030 | 3,281                     | 3,627                    |                |   |
| PMFCY038 | 2,575                     | 2,816                    |                |   |
| PMFCY040 | 2,268                     | 2,818                    |                |   |
| PMFCY041 | 2,658                     | 2,934                    |                |   |
| PMFCY042 | 2,280                     | 2,971                    | tip 2          | <i>Salileptolyngbya</i>                               |
| PMFCY021 | 1,318                     | 1,381                    |                |   |
| PMFCY022 | 1,364                     | 1,035                    |                |   |
| PMFCY023 | 1,212                     | 1,095                    |                |   |
| PMFCY043 | 1,452                     | 1,123                    |                |   |
| PMFCY044 | 1,182                     | 1,003                    |                |   |
| PMFCY045 | 1,652                     | 1,099                    |                |   |
| PMFCY046 | 1,196                     | 0,916                    | tip 3          | <i>Nunduva</i>  |
| PMFCY033 | 3,789                     | 7,014                    |                |   |
| PMFCY034 | 3,145                     | 7,753                    |                |   |
| PMFCY035 | 2,516                     | 7,311                    |                |   |
| PMFCY036 | 3,021                     | 9,989                    |                |   |
| PMFCY053 | 2,387                     | 8,537                    |                |   |
| PMFCY054 | 2,707                     | 9,900                    | tip 4          | <i>Leptotohoe</i>                                     |
| PMFCY047 | 2,452                     | 1,296                    |                |   |
| PMFCY048 | 1,751                     | 1,300                    |                |   |
| PMFCY049 | 3,158                     | 1,558                    |                |   |
| PMFCY050 | 2,264                     | 1,526                    |                |   |
| PMFCY051 | 2,198                     | 1,446                    |                |   |
| PMFCY052 | 3,196                     | 1,336                    |                |   |



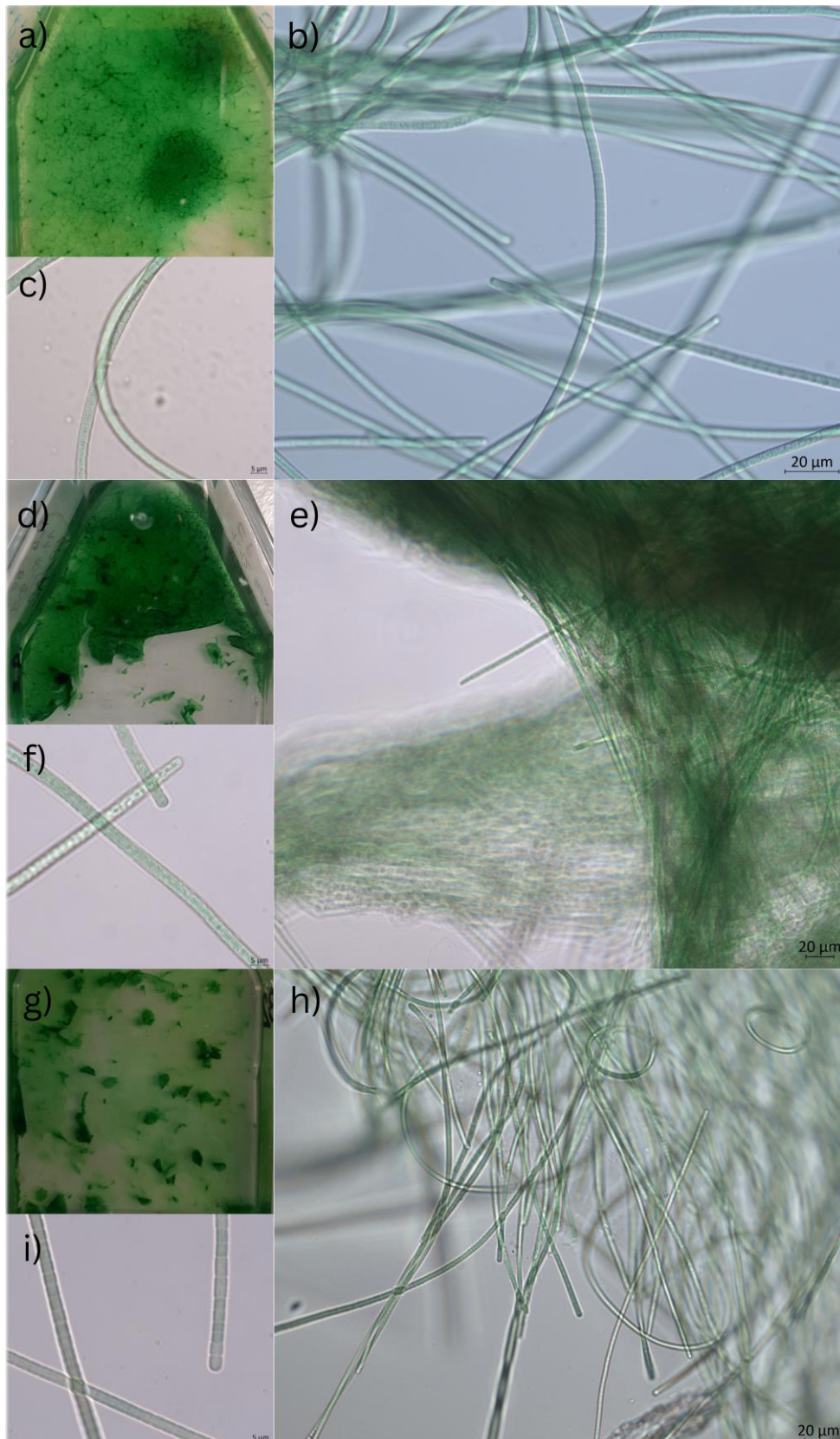
#### 4.1.1. Morfološki tip 1

Morfološkom tipu 1 pripada 15 sojeva (Tablica 7., Slika 9. - 13.). Obrašaji su prikazani na Slikama 9. – 13., pod oznakama a, d i g. Obrašaj morfološkog tipa 1 raste pripijen uz stijenku bočice za rast ili stvarajuće amorfne plutajuće nakupine. Plutajuće nakupine mogu se odvojiti nastankom mjehura u pripijenom obraštaju. Nakupine trihoma vidljive su na obraštaju kao vlakna isprepletana u nepravilnoj mreži ili položena paralelno. Kod nekih sojeva paralelna vlakna stvaraju krugove (Slika 9.d). Na obraštajima su mjestimično vidljive okruglaste nakupine tamnije od okoline. Boja obraštaja varira od svijetlozelene do tamnozeleno, ovisno o gustoći trihoma, a kod nekih je sojeva primijećena tirkizna nijansa.

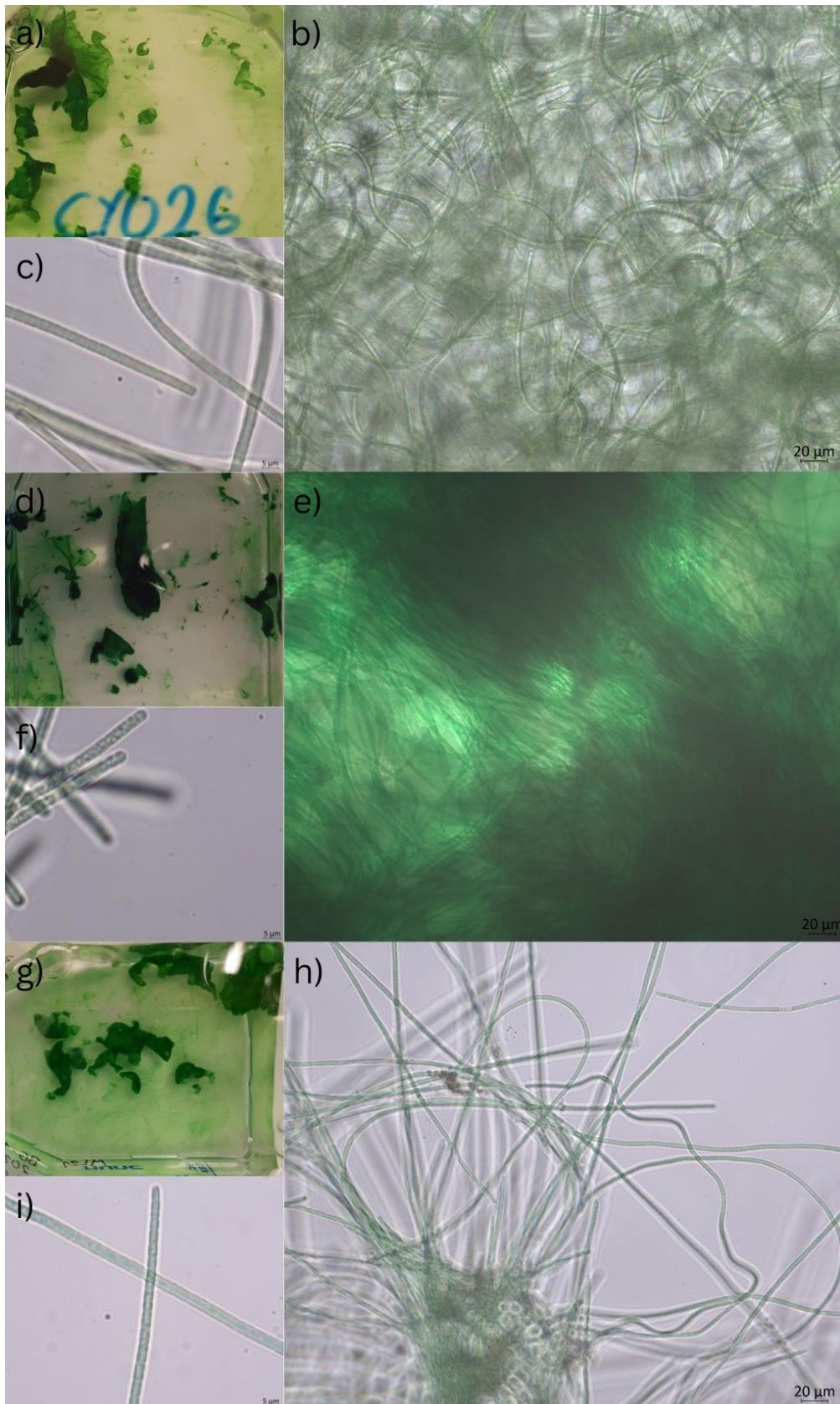
Trihomi morfološkog tipa 1 (Slika 9. - 13.) međusobno su isprepleteni u nepravilne mreže ili su položeni paralelno jedan uz drugog. Svaki je trihom obložen zasebnom tankom i čvrstom ovojnicom te čini filament, a neki se blago sužavaju prema krajevima. U gustim dijelovima nakupina stvaraju lukove, polukružno se zavijaju, a primijećena su i kružna namatanja (Slika 12.e). Trihomi su ravni, a primijećeni su i blago valoviti (Slika 11.h), te cilindričnog oblika, izopolarni i homocistični, tamnozeleno boje s tirkiznom nijansom. Apikalne stanice ne razlikuju se od ostalih po obliku i veličini, ali stanična stijenka na njihovu vrhu je zaobljena (Slika 9.f, 10.i) te je kod nekih trihoma ispod nje primijećen apikalni aerotop. Nisu primijećene kaliptre. Stanice su cilindričnog oblika i uglavnom izodijamerne (mogu se pojaviti oblici nešto širi nego dugački i obrnuto), a kod nekih su primijećene granule na polovima. Konstrikcija je malena pa rubovi trihoma izgledaju ravno. Stanice se mogu razlučiti i na najmanjem povećanju mikroskopa od 1000×, a dobro su vidljive na većim povećanjima. Raspored tilakoida je parijetalan (Slika 9.f). Kod većine sojeva primijećeni su aerotopi (Slika 9.h), kod nekih hormogoniji i nekridije, a niti kod jednog soja nisu primijećene akinete i grananje. Kod većine je sojeva zabilježena negativna fototaksija - sporo klizanje (engl. *gliding*) cijelog trihoma u smjeru suprotnom od izvora svjetlosti. Kod nekih je sojeva zabilježeno i bočno pomicanje vrha trihoma.



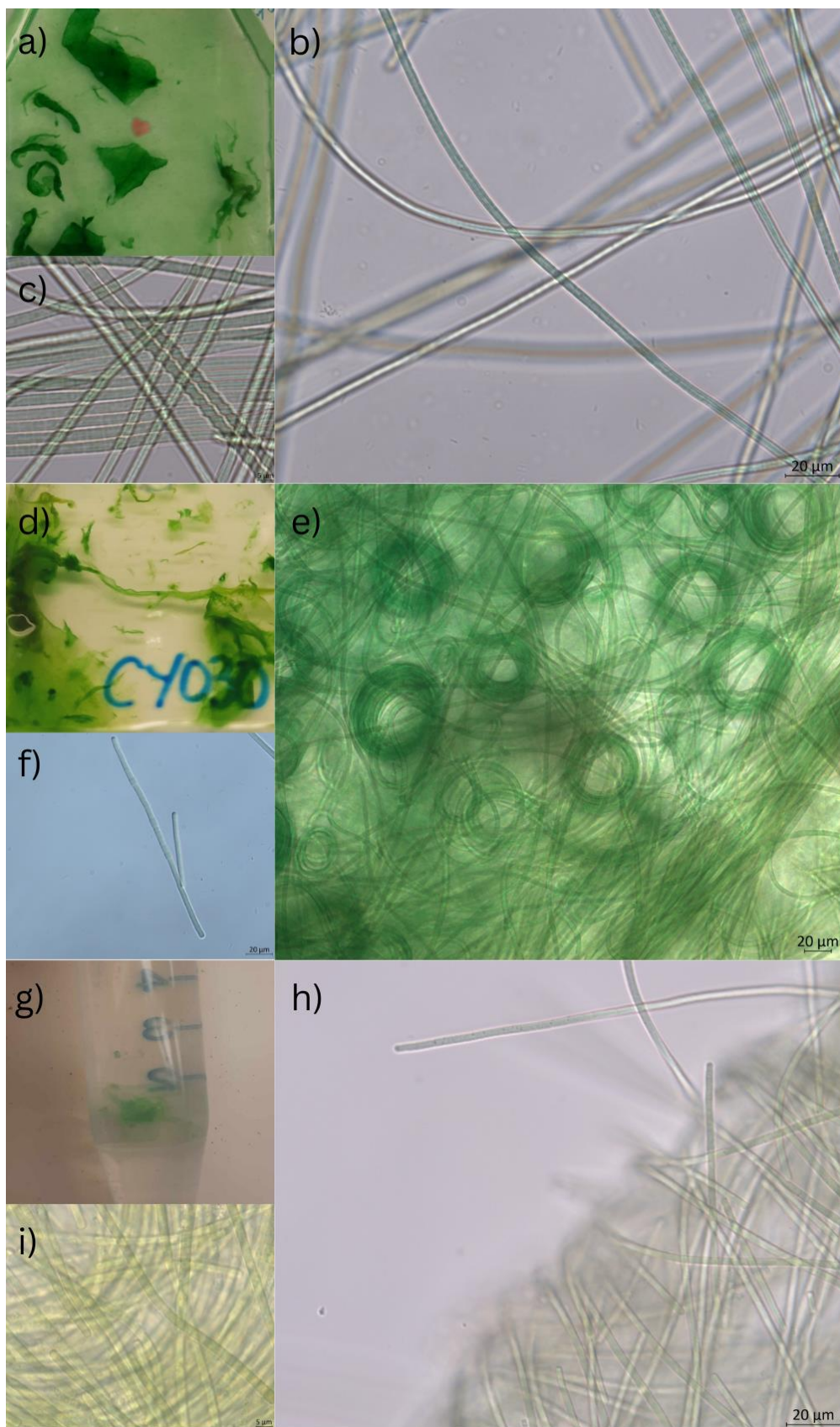
Slika 9. Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY016, (d) PMFCY017, (g) PMFCY018. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b) PMFCY016, (e) PMFCY017, (h) PMFCY018. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (c) PMFCY016, (f) PMFCY017, (i) PMFCY018. Crvenom strelicom na (h) označen je trihom na kojem su vidljivi aerotopi.



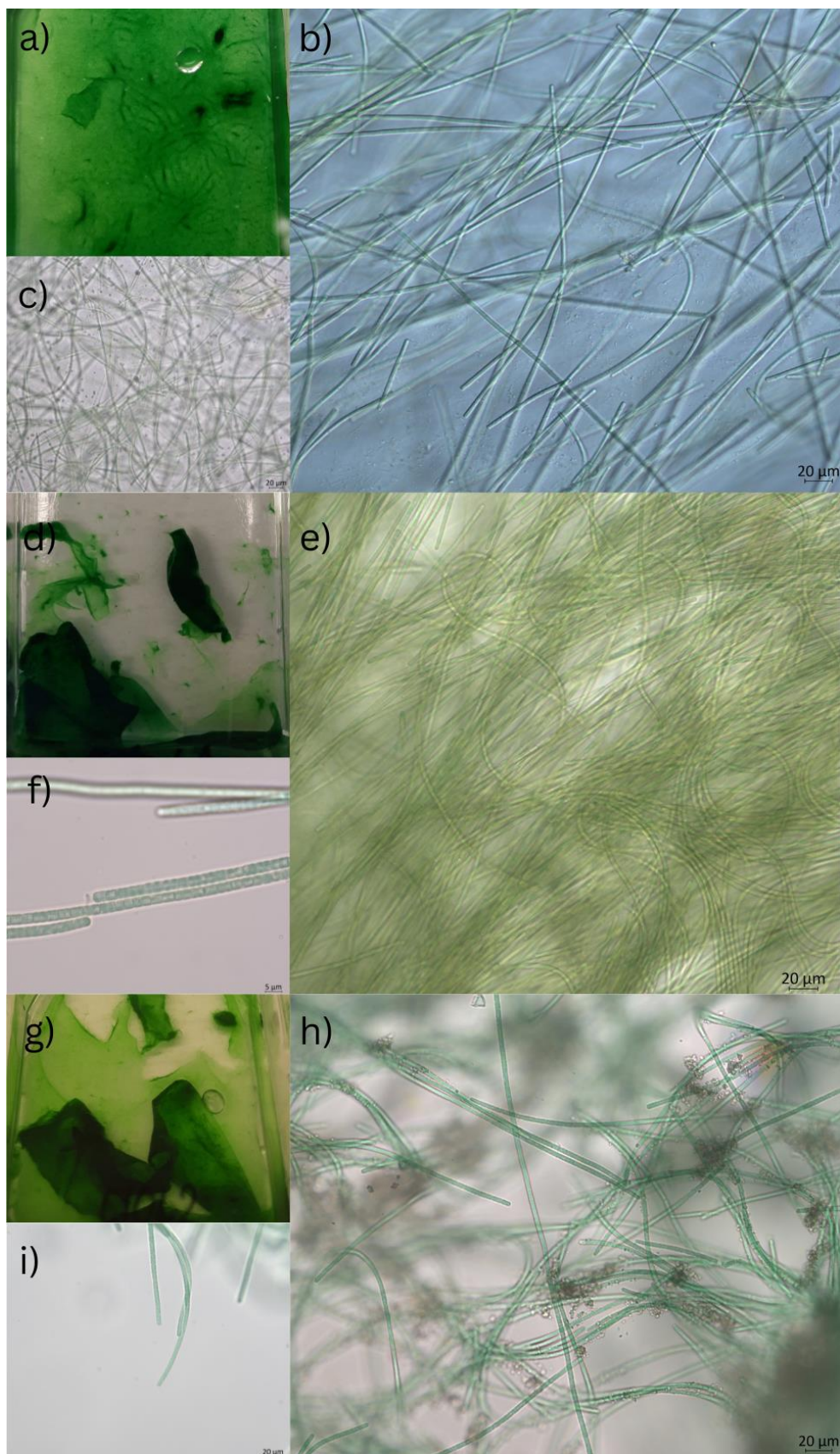
Slika 10. Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY020, (d) PMFCY024, (g) PMFCY025. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b) PMFCY020, (e) PMFCY024, (h) PMFCY025. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (c) PMFCY020, (f) PMFCY024, (i) PMFCY025.



Slika 11. Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY026, (d) PMFCY027, (g) PMFCY028. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b) PMFCY026, (e) PMFCY027, (h) PMFCY028. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (c) PMFCY026, (f) PMFCY027, (i) PMFCY028.



Slika 12. Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY029, (d) PMFCY030, (g) PMFCY038. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b) PMFCY029, (e) i (f) PMFCY030, (h) PMFCY038. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (c) PMFCY029, (i) PMFCY038.

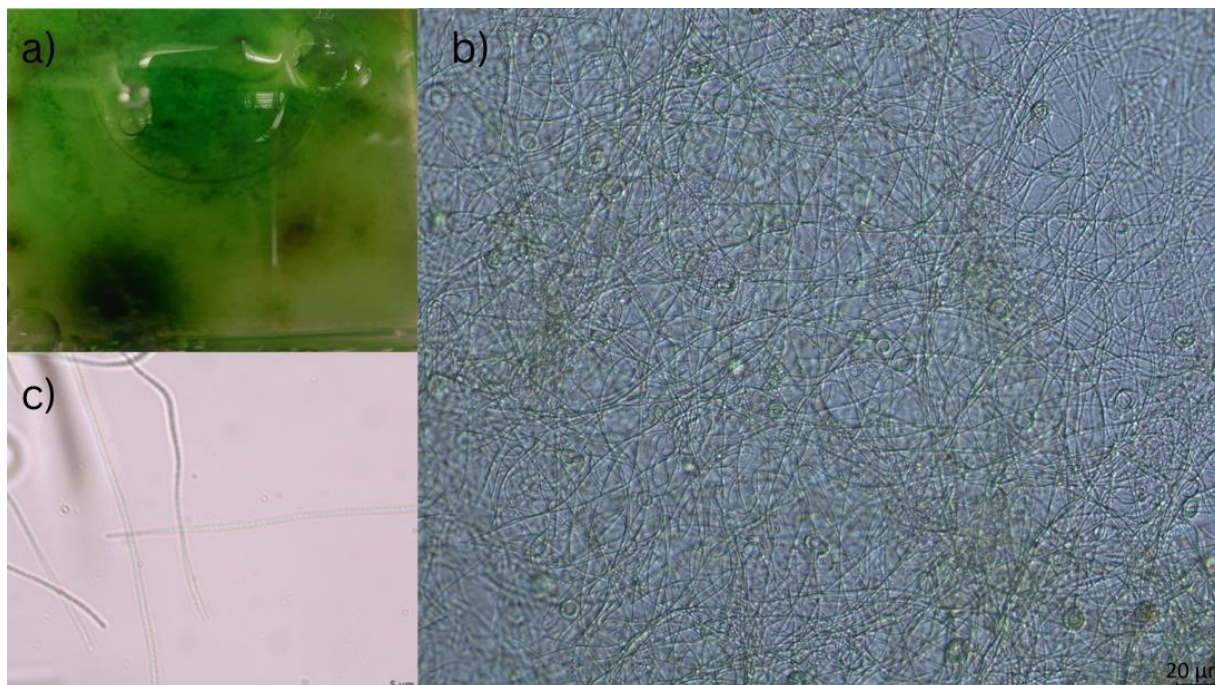


Slika 13. Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY040, (d) PMFCY041, (g) PMFCY042. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b), (c) PMFCY040, (e) PMFCY041, (h) i (i) PMFCY042. Slika trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (f) PMFCY041.

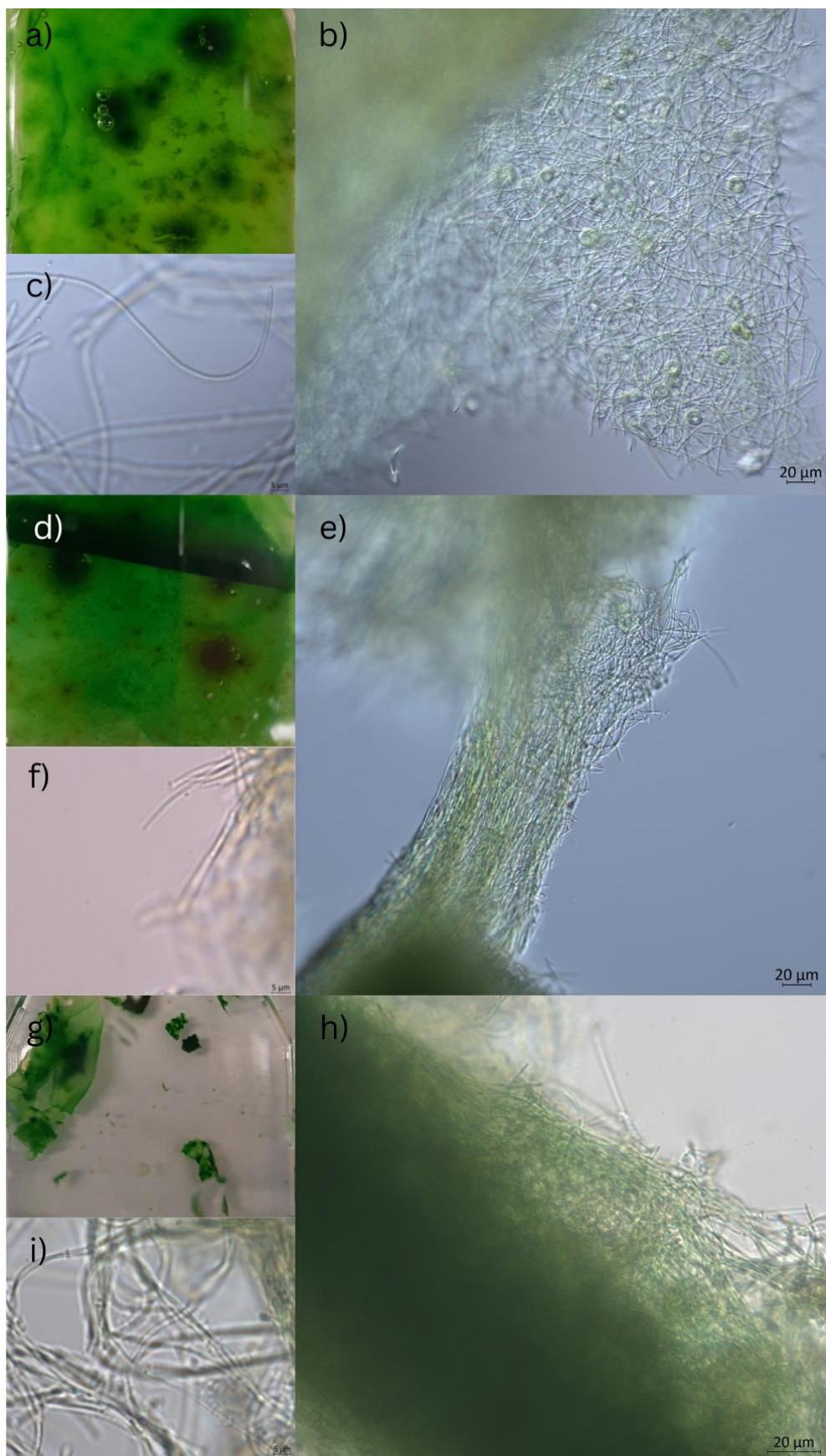
#### 4.1.2. Morfološki tip 2

Morfološkom tipu 2 pripada 7 sojeva (Tablica 7., Slika 14. - 16.). Obraštaji sojeva morfološkog tipa 2 prikazani su na Slikama 14. -16., pod oznakama a, d i g. Obraštaji sojeva ovog morfotipa rastu prijanjajući uz stijenku bočice za rast. Kod nekih se sojeva dio obraštaja izdiže stvarajući mjehurić (Slika 14.a), a kod nekih se primjećuju i plutajuće nakupine (Slika 15.d). Boja obraštaja mijenja se od svjetlozelene do tamnozeleno kako se povećava gustoća trihoma. Guste nakupine okruglastog su oblika, a mogu biti tamnozeleno, smeđe ili crne (Slika 14.a, 15.a). Na obraštaju se može raspoznati nepravilna vlaknasta mreža.

Trihomi sojeva morfološkog tipa 2 prikazani su na Slikama 14. -16., pod oznakama b, c, e, f, h te i, a međusobno su isprepleteni u nepravilne guste smečkasto – zelene mreže (Slika 14.b, 15.b, 16.b, e, h) ili položeni paralelno jedan drugome (Slika 15.e, h). Kod nekih je sojeva primijećeno da se paralelno položeni trihomi zavijaju u krug. Većina trihoma samostalno se pruža ravno ili stvara lukove, a primijećeno je i mnogo zamotanih u krug (Slika 14.b, 15.b). Svaki trihom ima široku i čvrstu ovojniciu te čini jedan filament. Trihomi su dugački i veoma tanki te na najvećem povećanju nalikuju na niti. Izopolarni su i homocitični, tamnozeleno do smeđozeleno boje te monoliformni. Stanice su izodijamerne, nešto dulje od široke ili šire od dugačke, a polovi su im zaobljeni. Apikalne stanice ne razlikuju se od ostalih u trihomu po veličini i obliku (Slika 16.c) ili su hemisferične. Nisu primijećene kaliptre, aerotopi, nekridije, grananje i akinete, kao ni kretanje trihoma.

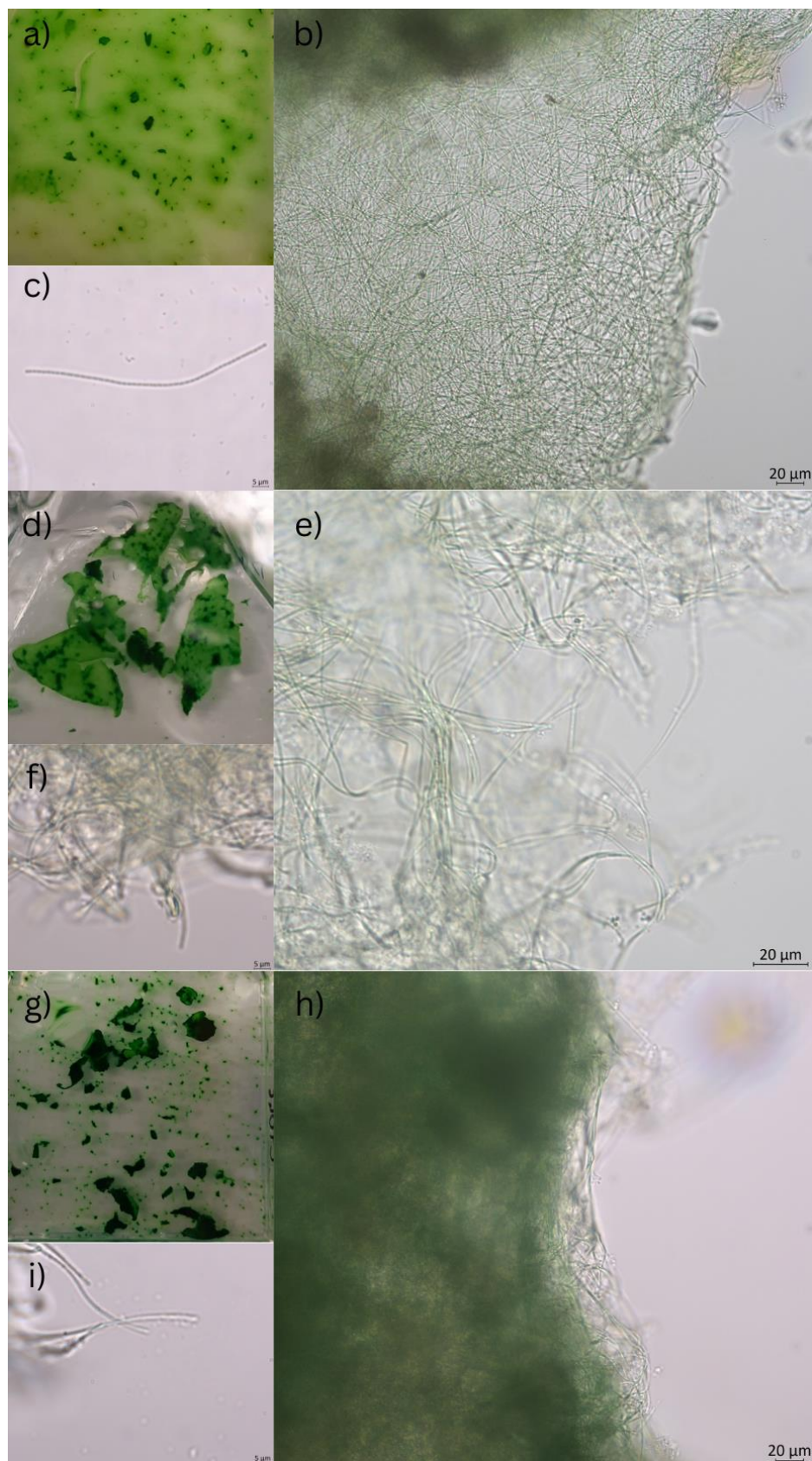


Slika 14. Slike soja PMFCY021: (a) slika makroskopskih svojstava, (b) slika trihoma pri povećanju od 200 $\times$ , (c) slika trihoma pri povećanju od 1000 $\times$ .



Slika 15. Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY022, (d) PMFCY023, (g) PMFCY043. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b) PMFCY022, (e) PMFCY023, (h) PMFCY043. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (c) PMFCY022, (f) PMFCY023, (i) PMFCY043.



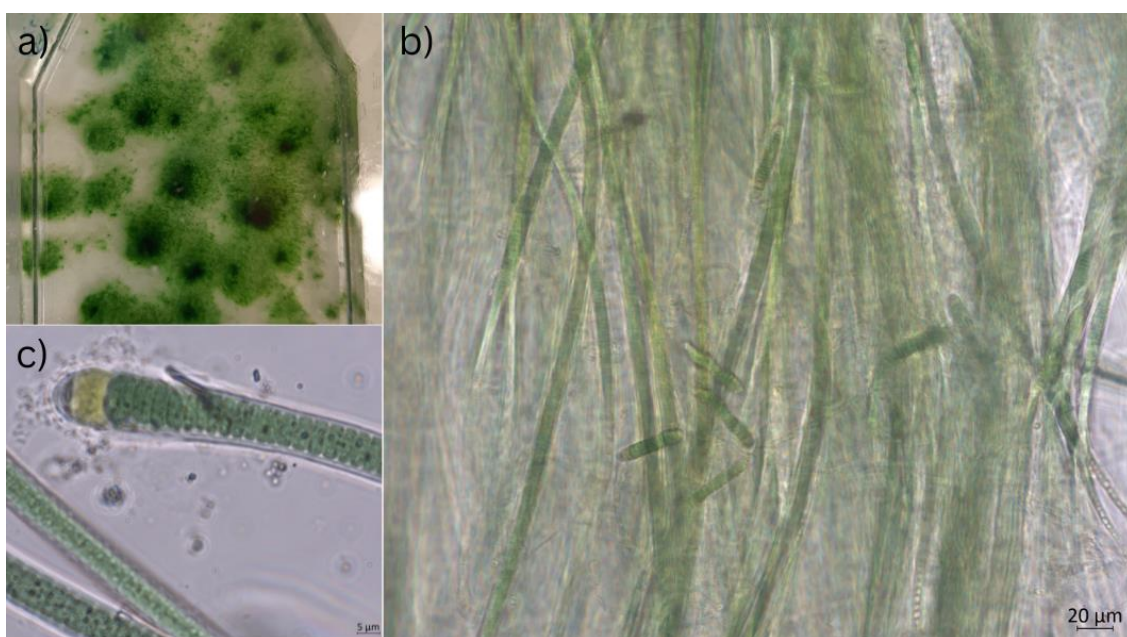


Slika 16: Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY044, (d) PMFCY045, (g) PMFCY046. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b) PMFCY044, (e) PMFCY045, (h) PMFCY046. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (c) PMFCY044, (f) PMFCY045, (i) PMFCY046.

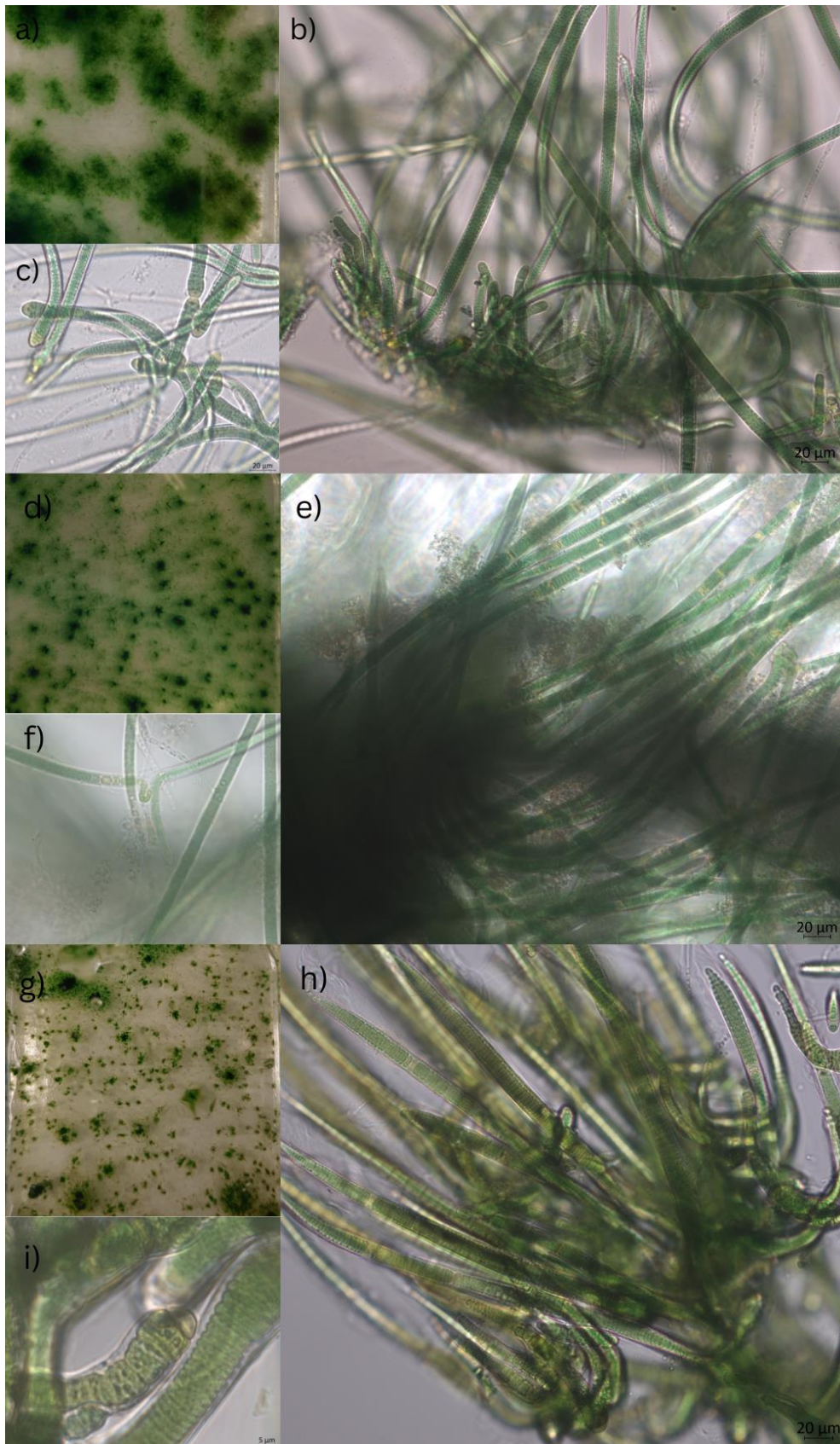
### 4.1.3. Morfološki tip 3

Morfološkom tipu 3 pripada 6 sojeva (Tablica 7., Slika 17. - 19.). Obraštaji sojeva morfološkog tipa 3 prikazani su na Slikama 17. – 19., pod oznakama a, d i g. Obraštaji ovih sojeva rastu pripijeni uz stijenku bočice za rast kultura. Nakupine trihoma okruglastog su oblika tamnozeleno boje. Središta nakupina najtamnija su i cjelovita, dok rubovi poprimaju nepravilan oblik (Slika 17.a, 18.a, 19.a). Najgušće nakupine rastu u visinu pa se mogu raspoznati trodimenzionalne strukture nalik čupercima. Oko nakupina obraštaj je svjetliji te se na njemu može raspoznati nepravilna mreža vlakana.

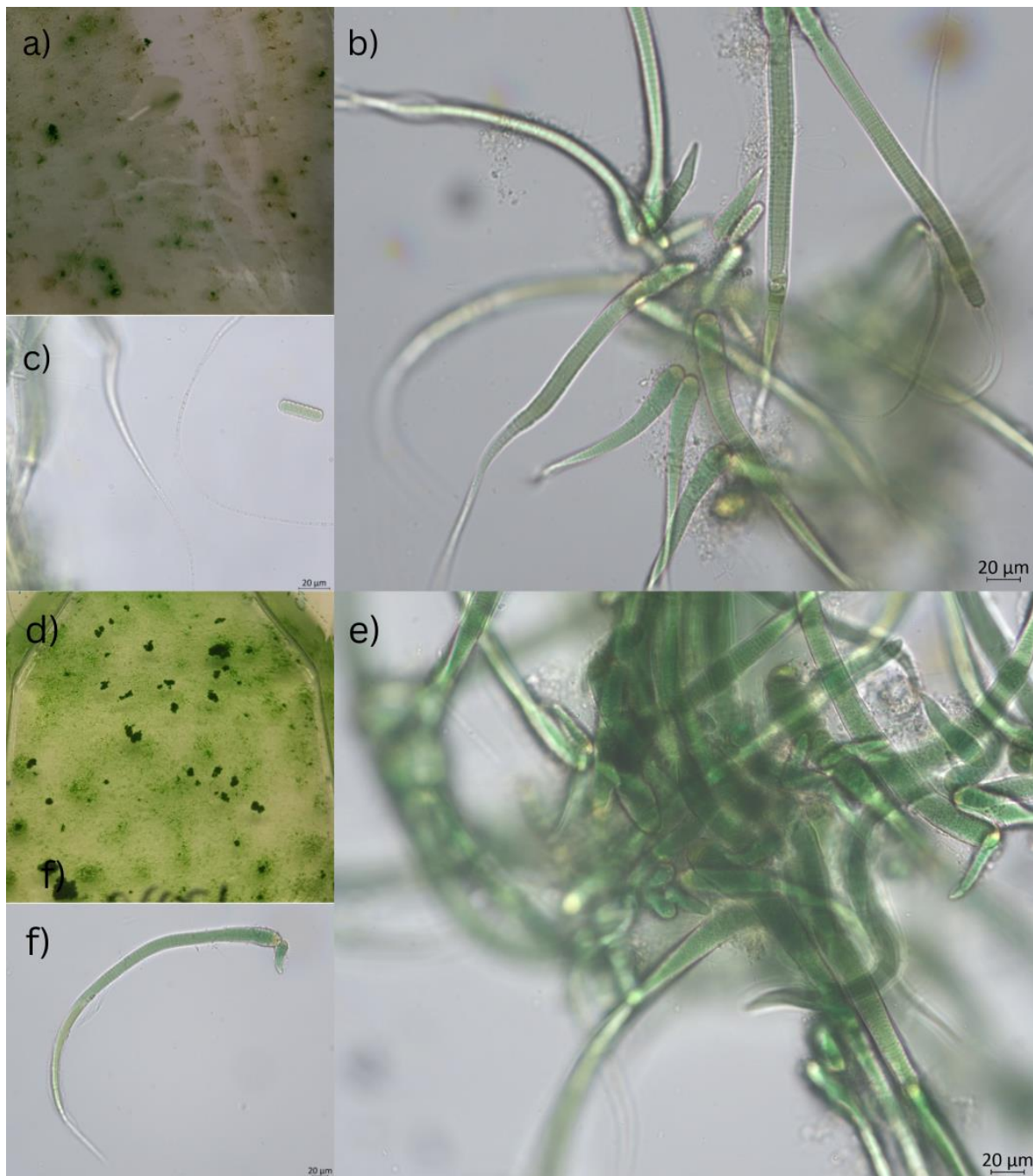
Trihomi morfološkog tipa 3 prikazani su na Slikama 17. – 19., pod oznakama b, c, e, f, h, i, te su tamnozeleno boje i heteropolarni. Bazalni krajevi grupiraju se jedan prema drugome, a zašiljeni terminalni krajevi pružaju se paralelno iza njih u konstrukciji koja liči na komet (Slika 18.h). Ove konstrukcije formiraju veće nakupine ili su izolirane. Trihomi ovog morfološkog tipa najveći su od sva četiri opisana u ovome radu. Trihomi su ravni i postepeno sužavaju od bazalnog prema terminalnom kraju (Slika 19.f), a obavija ih čvrsta i široka ovojnica. Duljina trihoma je promjenjiva, a na terminalni kraj nastavlja se hijalina bezbojna struktura, s poprečnim pregradama (Slika 19.c). Ovojnica može biti zatvorena i zaobljena ili otvorena na oba kraja, kao i otvorena na jednom kraju. Svaki trihom ima bazalnu heterocitu (Slika 17.c, 18.c, i, 19.f), a kod nekih su sojeva primijećene i interkalarne solitarne. Stanice su diskoidne, višestruko šire nego dugačke, a smanjuju se prema zašiljenom kraju – na njemu poprimaju cilindrični oblik i postaju izodijamerne do dulje nego široke. Konstrikcija je izražena i stanice se jasno razlučuju. Apikalne stanice mogu biti veće od ostalih u trihomu ili se ne razlikovati po obliku i veličini (Slika 18.i). Nisu primijećeni aerotopi i kaliptre. Nije zabilježeno kretanje. Nekridije zlatne boje primijećene su kod nekih sojeva (Slika 18.e). Kod svih su primijećeni izopolarni homocitični hormogoniji (Slika 19.c), a akinete nisu primijećene. Kod jednog je soja primijećeno lažno grananje.



Slika 17. Slike soja PMFCY033: (a) slika makroskopskih svojstava, (b) slika trihoma pri povećanju od 200×, (c) slika trihoma pri povećanju od 1000×.



Slika 18. Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY034, (d) PMFCY035, (g) PMFCY036. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b), (c) PMFCY034, (e) i (f) PMFCY035, (h) PMFCY036. Slika trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (i) PMFCY036.

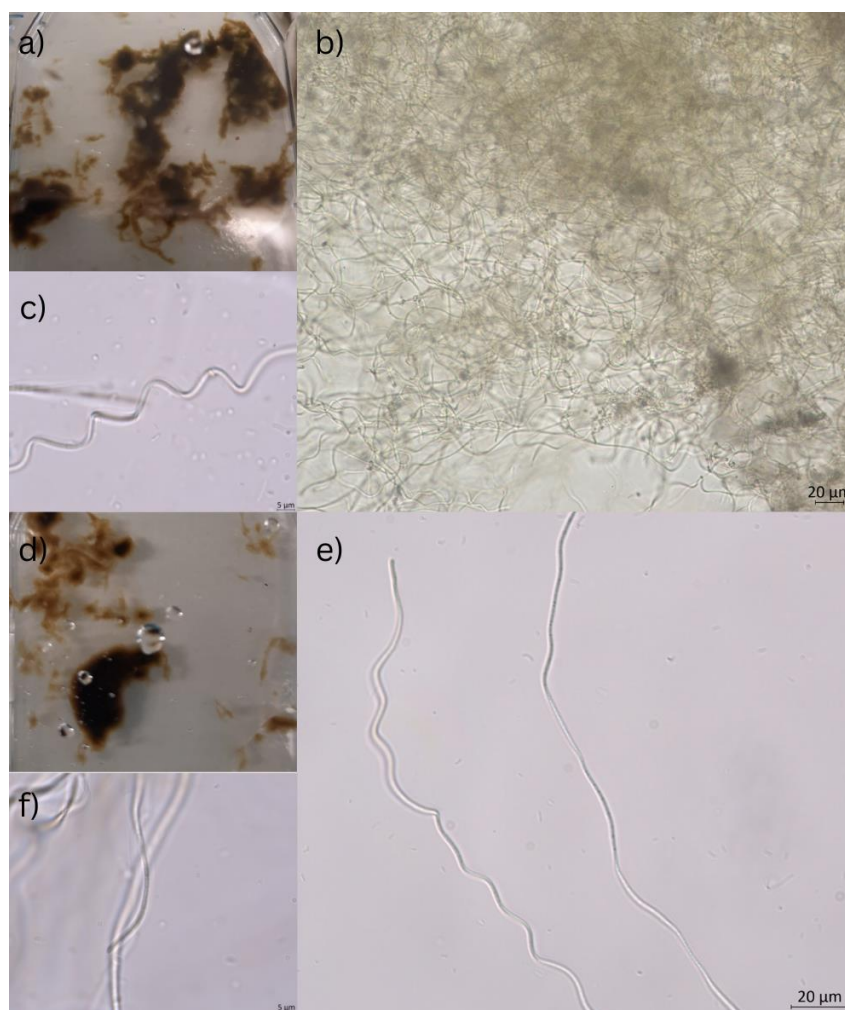


Slika 19. Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY053, (d) PMFCY054. Slike trihoma sojeva na povećanju od 200×: (b) i (c) PMFCY053, (e) i (f) PMFCY054.

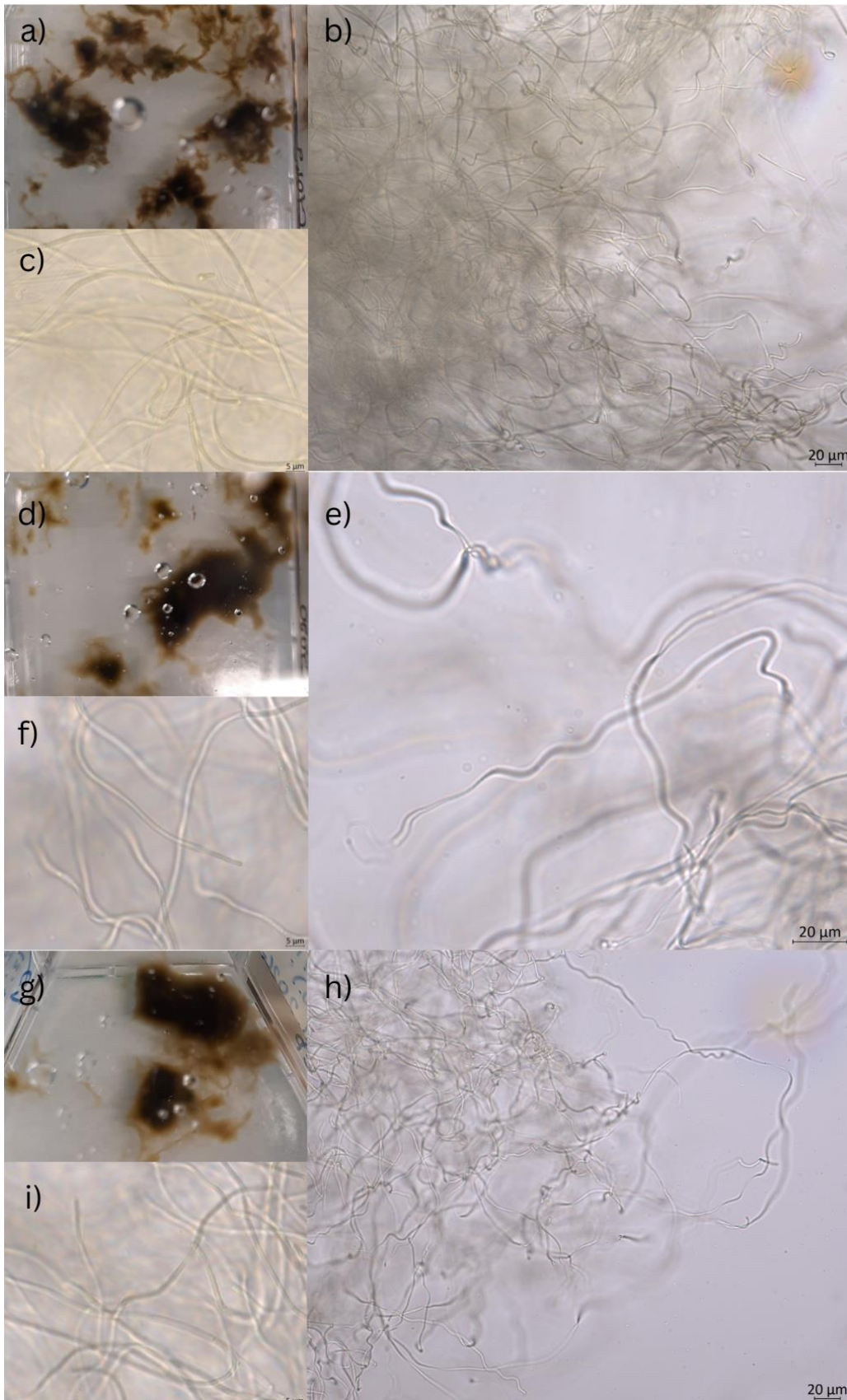
#### 4.1.4. Morfološki tip 4

Obraštaji sojeva morfološkog tipa 4 prikazani su na Slikama 20. – 22., pod oznakama a, d, g, a čine ih amorfne guste plutajuće nakupine. Kod jednog je soja zabilježen i rast na podlozi bočice. Nakupine su homogene i smečkaste do tamnozeleno boje. Rubovi su svjetliji te se na njima mogu raspoznati vlaknaste nakupine trihoma.

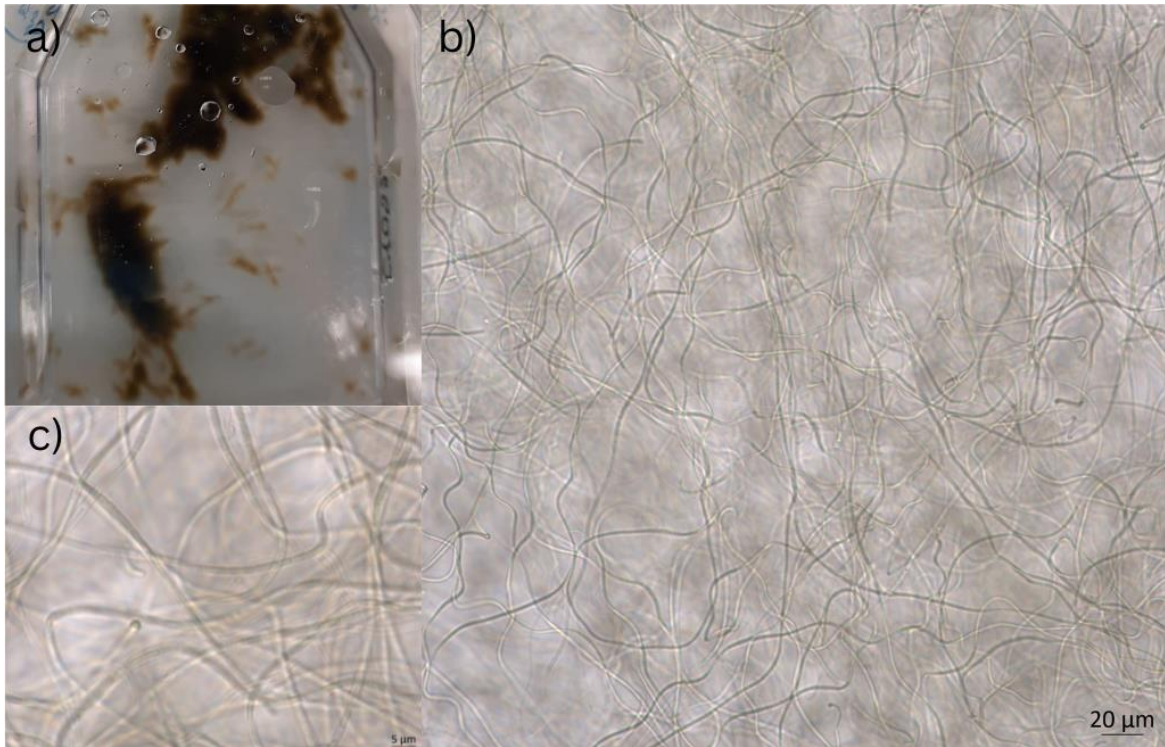
Trihomi sojeva morfološkog tipa 4 međusobno su isprepleteni u nepravilne guste mreže smečkaste do zelene boje (Slika 20. b, 21.b, h, 22.b). Trihomi su tanki i dugački te svaki ima svoju tanku i čvrstu ovojniju. Pružaju se ravno, mjestimično praveći lukove, a pojavljuju se i blago spiralni oblici (Slika 20.c). Trihomi su izopolarni i homocitični, smečkaste do zelene boje. Stanice su cilindričnog oblika, izodijamerne do višestruko dulje od široke (Slika 20.f, 21.c, i, 22.c). Razmaci između susjednih stanica izraženi su pa se na manjim povećanjima prepoznaje moniliformnost trihoma (Slika 20.e, 21.e). Apikalne stanice ne razlikuju se po veličini i obliku od ostalih u trihomu (Slika 20.e, 21.c, f, i), ali vrh im je zaobljen. Nisu primijećene kaliptre, akinete, aerotopi, nekridije i hormogoniji, kao ni kretanje ili grananje trihoma.



Slika 20. Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY047, (d) PMFCY048. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b) PMFCY047, (e) PMFCY048. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (c) PMFCY047, (f) PMFCY048.



Slika 21.: Slike makroskopskih svojstava sojeva: (a) PMFCY049, (d) PMFCY050, (g) PMFCY051. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 200×: (b) PMFCY049, (e) PMFCY050, (h) PMFCY051. Slike trihoma sojeva pri povećanju od 1000×: (c) PMFCY049, (f) PMFCY050, (i) PMFCY051.



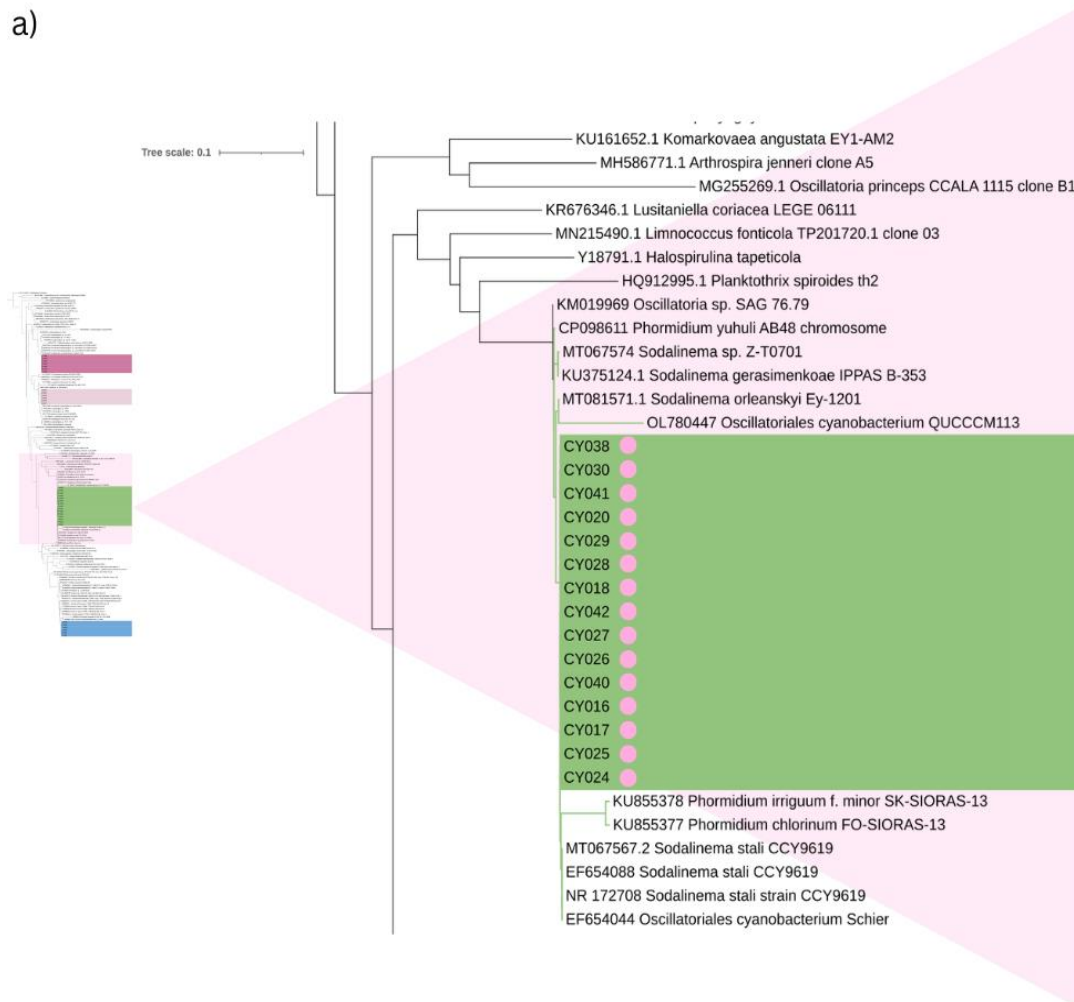
Slika 22. Slike soja PMFCY052: (a) slika makroskopskih svojstava, (b) slika trihoma pri povećanju od 200×, (c) slika trihoma pri povećanju od 1000×.

## 4.2. Filogenetska analiza

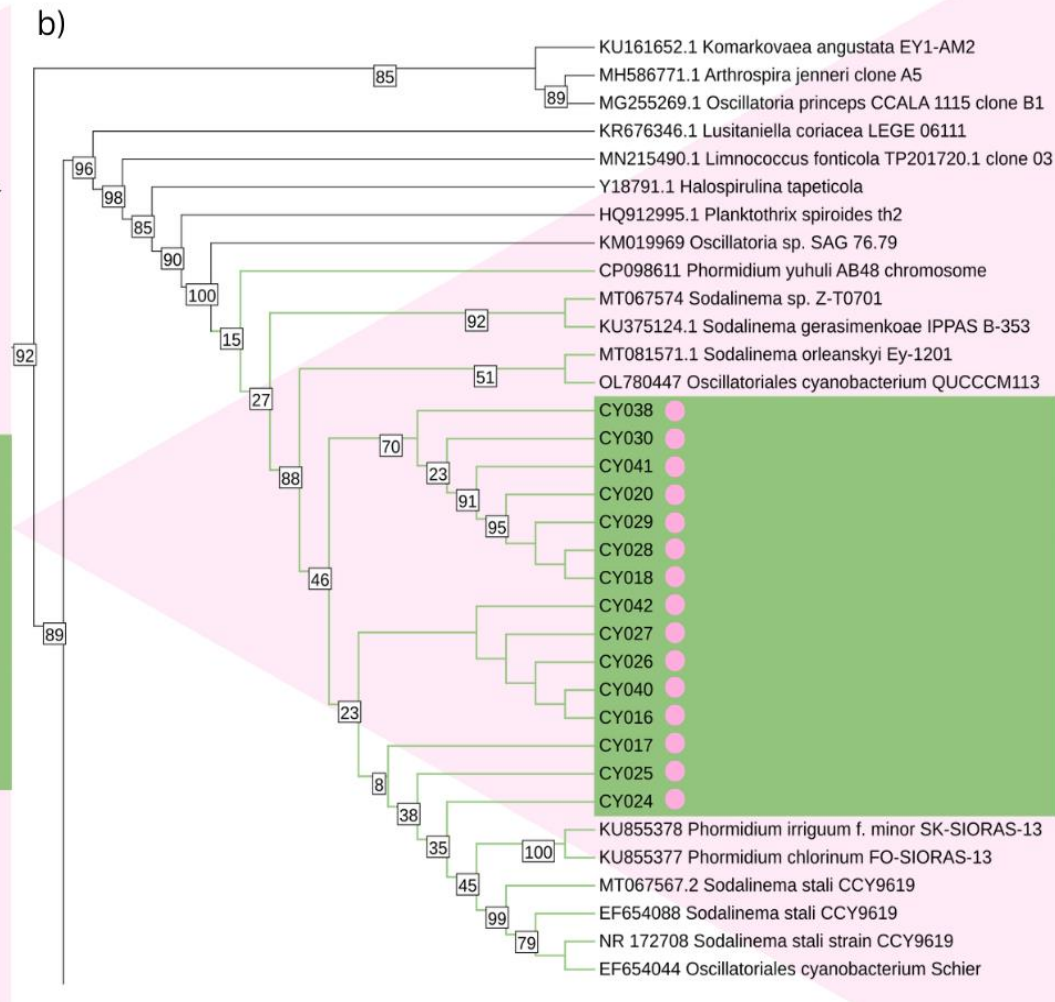
Podjela kultiviranih sojeva u četiri skupine na dobivenom filogenetskom stablu točno odgovara podjeli na temelju morfoloških značajki. Sojevi porijeklom iz uzoraka biofilma sakupljenih s kornjača (morfortipa 4) čine skupinu izdvojenu od sojeva porijeklom iz uzoraka biofilma sakupljenih s obalne zone (morfortipa 1 - 3). Sojevi morfortipa 1 grupirali su se u tri sestrinske skupine čije je odvajanje podržano *bootstrap* vrijednošću od 46, a u trećoj se nalaze i predstavnici reda Oscillatoriales te rodova *Sodalinema* i *Phormidium*. Njihov najbliži zajednički predak odvojio se od roda *Sodalinema*, a to je odvajanje podržano *bootstrap* vrijednošću od 88 (Slika 23.). Sojevi morfološkog tipa 2 grupirali su se u jednu skupinu. Njihova sestrinska skupina sastoji se od predstavnika roda *Salileptolyngbya* te reda Oscillatoriales. Ovo je odvajanje dobro podržano *bootstrap* vrijednošću od 99 (Slika 24.). Sestrinska skupina sojeva morfološkog tipa 3 sastoji se od heterocitnih vrsta *Nunduva sanctimaloensis* D.E. Berthold, Werner i Laughinghouse 2022 te *Rivularia halophila* Shalygin i Pietrasiak 2018. Sojevi morfološkog tipa 3 grupirali su se s predstavnicima roda *Nunduva*, a njihovo je odvajanje od tih predstavnika podržano malim *bootstrap* vrijednostima: od najdaljeg do najbližeg zajedničkog pretka na stablu one iznose 52, 44, 49 te 53. (Slika 25.). Sojevi izolirani s karapaksa kornjača, morfološkog tipa 4, grupirali su se zajedno, a sestrinska skupina im se sastoji od predstavnika rodova *Leptolyngbya* i *Pseudanabaena* te vrste *Leptothoe spongobia* Konstantinou i Gkelis 2019. Odvajanje ovih dviju skupina ima visoku podržanost s *bootstrap* vrijednošću od 98. Sojevi morfortipa 4 izdvojeni su od predstavnika roda *Leptothoe*, a ovo odvajanje također je podržano visokim *bootstrap* vrijednostima: od daljeg do bližeg zajedničkog pretka one iznose 100 i 98 (Slika 24.)



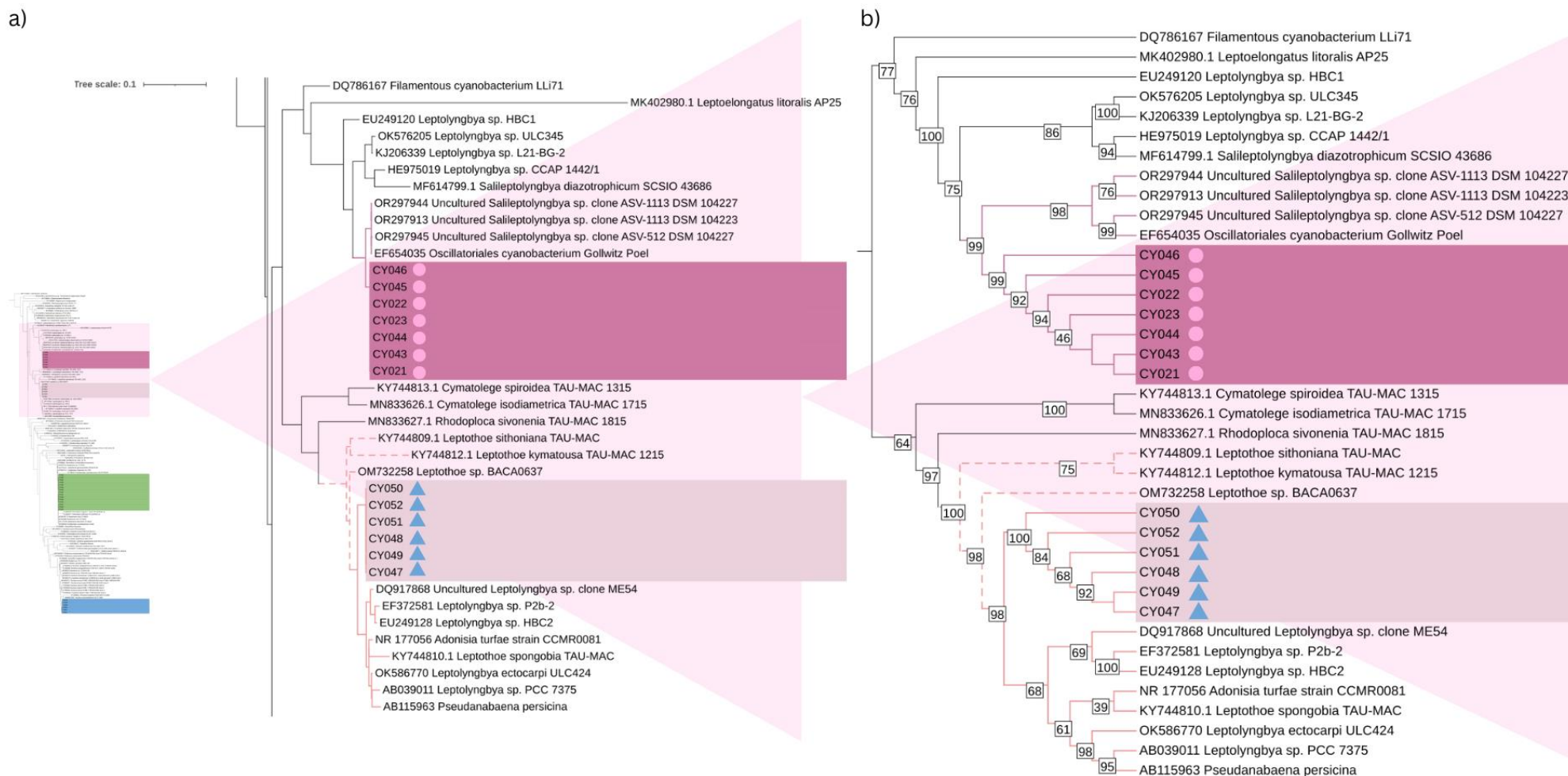
a)



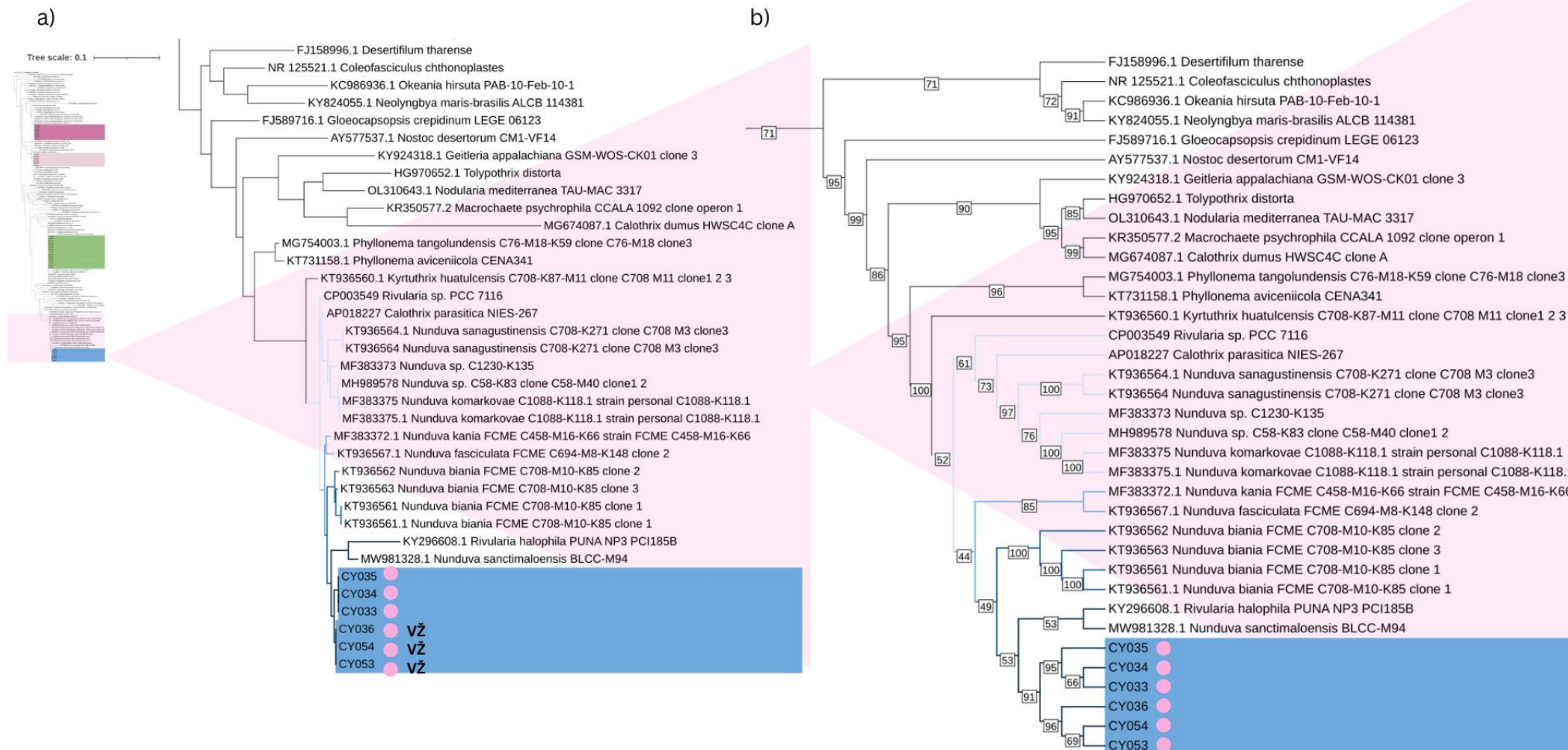
b)



Slika 23. (a) Kladogram reprezentativnih sekvenci cijanobakterija baziran na *Maximum Likelihood* analizi gena 16S rRNA s naznačenom dužinom grana. Imena taksona sastoje se od identifikacijskog broja sekvence u bazi podataka NCBI Gene Bank, imena roda ili vrste te oznake soja. (b) Detalj kladograma s naznačenim *bootstrap* vrijednostima. Skupini obojenoj zelenom bojom odgovara morfološki tip 1. Sojevi označeni krugom su epilitski iz zone supralitorala ili mediolitorala uvale Valdarke na Malom Lošinj. Grane s predstavnicima rodova najrodnijih sojevima morfotipa 1 označene su zelenom bojom.



Slika 24. (a) Kladogram reprezentativnih sekvenci cijanobakterija baziran na *Maximum Likelihood* analizi gena 16S rRNA s naznačenom dužinom grana. Imena taksona sastoje se od identifikacijskog broja sekvence u bazi podataka NCBI Gene Bank, imena roda ili vrste te oznake soja. (b) Detalj kladograma s naznačenim *bootstrap* vrijednostima. Skupini obojenoj tamnoružičastom bojom odgovara morfološki tip 2, a skupini obojenoj svjetloružičastom bojom odgovara morfološki tip 4. Sojevi označeni krugom su epilitski, a sojevi označeni trokutom su epizoički. Grane predstavnicima rodova najrodnijih sojevima morfotipa 2 označene su tamnoružičastom bojom. Cjelovite svjetloružičaste grane predstavljaju odvajanje predstavnika *Leptolyngbya* u skupinu sestrinsku sojevima morfotipa 4, a isprekidane svjetloružičaste grane izdvajanje sojeva morfotipa 4 iz roda *Leptothoe*.



Slika 25. (a) Kladogram reprezentativnih sekvenci cijanobakterija baziran na *Maximum Likelihood* analizi gena 16S rRNA s naznačenom dužinom grana. Imena taksona sastoje se od identifikacijskog broja sekvence u bazi podataka NCBI Gene Bank, imena roda ili vrste te oznake soja. (b) Detalj kladograma s naznačenim *bootstrap* vrijednostima. Skupini obojenoj plavom bojom odgovara morfološki tip 3. Sojevi označeni krugom su epilitski, pri čemu su oni bez oznake VŽ s uvale Valdarke, a oni s tom oznakom s uvale Veli Žal. Grane s predstavnicima rodova najrodnijih sojevima morfortipa 3 označene su plavom bojom.

## 5. RASPRAVA

U ovom radu izolirana su 34 soja cijanobakterija, od čega 28 iz epilitskih, a 6 iz epibiotskih staništa. Sojevi su prema morfološkim značajkama podijeljeni u 4 morfotipa kojima odgovaraju 4 grupe izdvojene filogenetskom analizom. Izrađeno je filogenetsko stablo na kojem su se pripadnici svakog morfotipa grupirali zajedno, a njihovi su najbliži srodnici bili drugačiji, od morfotipa 1 do 4 to su bili rodovi *Sodalinema*, *Salileptolyngbya*, *Nunduva* i *Leptothoe*. Važno je naglasiti da su se epibiotski rodovi odvojili od epilitskih filogenetski, a i morfologija im se značajno razlikovala.

### 5.1. Morfološki tip 1 i rod *Sodalinema*

Sojevi morfološkog tipa 1 mogu se prema morfologiji svrstati u rod *Sodalinema* čiji su predstavnici prvi put opisani 2018. godine (Cellamare i sur., 2018). Ovaj rod, prema klasifikaciji Strunecký i suradnika (2023), pripada porodici Oscillatoriaceae, redu Oscillatoriales.

Morfološke značajke roda *Sodalinema* opisane u dva rada (Samylina i sur., 2021; Cellamare i sur., 2018) uspoređene su sa značajkama sojeva morfološkog tipa 1 (Tablica S4.). Sojevi morfološkog tipa 1 dijele većinu morfoloških značajki s pripadnicima roda *Sodalinema*, kao i okoliš iz kojeg su izolirani, na primjer vrsta *Sodalinema stali* Samylina, Sinetova, Kupriyanova i Tourova 2021 izolirana je iz zone mediolitorala (Samylina i sur., 2021). Zajedničke značajke uključuju makroskopska svojstva, oblik nakupina trihoma, boju i polarnost trihoma, izgled ovojnice, oblik stanica, nakupine granula na polovima stanica, blagu konstrikciju, oblik apikalnih stanica, raspored tilakoida, prisutnost aerotopa, nezabilježena prisutnosti kaliptri, heterocita, akineta i grananja, razmnožavanje hormogonijima te sposobnost trihoma da se kreću klizanjem po površini. S druge strane, između pripadnika roda *Sodalinema* i sojeva morfotipa 1 postoji i nekoliko razlika. Prva je ta što sojevi morfotipa 1 imaju nešto kraće stanice od pripadnika roda *Sodalinema* čija se duljina stanica međusobno razlikuje među svojstama (Tablica S4). Duljina stanica vrste *Sodalinema gerasimenkoe* Samylina, Sinetova, Kupriyanova i Tourova 2021, koja se pojavljuje u sestrinskoj skupini sojeva morfotipa 1, varira između 2,4 i 3,2  $\mu\text{m}$  (Samylina i sur., 2021), što je bliže rasponu od 1,92 do 2,66  $\mu\text{m}$  zabilježenu kod sojeva u ovom radu. Druga je razlika prisutnost žutih granula na polovima stanica koja je opisana u radu Samylina i suradnika (2021), što nije zabilježeno kod sojeva morfotipa 1, ali niti kod vrsta *Sodalinema stali* (Samylina i sur. 2021) i *Sodalinema komarekii* Cellamare, Charlotte Duval, Touibi, Djediat i Cécile Bernard 2018 (Cellamare i sur. 2018). Varijabilnost određenih morfoloških značajki između različitih vrsta roda *Sodalinema* objašnjava obje razlike uočene između morfotipa 1 i pripadnika roda *Sodalinema*.

Osim morfoloških značajki, filogenetska analiza je podržala svrstavanje izoliranih sojeva morfotipa 1 s ostalim pripadnicima roda *Sodalinema*, međutim s niskom podržanošću (*bootstrap* vrijednost 27).

Rod *Phormidium* polifiletskog je podrijetla s evolucijskim linijama koje se isprepliću s rodом *Sodalinema* (Noonan i sur., 2024). Zbog bliske srodnosti ova dva roda, očekivano je pojavljivanje sojeva identificiranih kao *Phormidium* spp. među pripadnicima roda *Sodalinema* u sestrinskoj skupini sojeva

morfotipa 1. Međutim, sekvenca svojte *Phormidium irriguum* dodana je u NCBI bazu podataka prije opisivanja roda *Sodalinema* pa je moguće i da predstavlja ovaj rod, ali nije preimenovana nakon njegova izdvajanja iz roda *Phormidium*. Predstavnik *P. chlorinum* kasnije je premješten u rod *Kamptonema*. Sojevi morfotipa 1 smjestili su se unutar veće skupine predstavnika roda *Sodalinema*. Jedini predstavnik roda *Phormidium*, *P. yuhuli*, koji se uz prethodno navedene svojte pojavljuje na stablu, izdvojen je iz ove skupine, ali je zbog vrlo niske podržanosti (*bootstrap* vrijednost 15) moguće da se i u ovom slučaju zapravo radi o predstavniku roda *Sodalinema*. Navedeni pokazatelji upućuju kako i sestrinsku skupinu čine predstavnici roda *Sodalinema* te da sojevi morfotipa 1 pripadaju ovom rodu.

Tipska vrsta roda *Sodalinema komarekii* izolirana je iz plutajućih nakupina i obraštaja u slanom alkalnom vulkanskom jezeru na otoku u Indijskom oceanu (Cellamare i sur., 2018). Samylina i suradnici (2021) izolirali su nekoliko vrsta ovoga roda iz bentičkih obraštaja uzorkovanim u različitim staništima: hipersalinim jezerima, slanim i alkalnim jezerima te jezerima bogatim natrijevim karbonatom smještenim u Europi, Aziji te Africi. Vrstu *Sodalinema stali* izolirali su iz obraštaja uzorkovanog u mediolitoralnoj zoni mora. Proučavanjem fizikalnih uvjeta staništa iz kojih su uzeti uzorci, zaključili su da su pripadnici roda *Sodalinema* eurihalini te mogu nastanjivati niz vodenih sredina, od braktičkih do hiperasalinih, kao i niz alkalinih vodenih staništa pH vrijednosti u rasponu od 8 do 10 (Luchetta i sur., 2010). Salinitet i pH vrijednost (Luchetta i sur., 2010) Jadranskog mora nalaze se unutar ovih raspona. Zbog pogodnih okolišnih uvjeta i ranije zabilježene prisutnosti vrsta roda *Sodalinema* u staništima plićih obalnih zona (Samylina i sur., 2021), pronalazak u supralitoralalu Malog Lošinja bio je očekivan te je u ovom radu prvi put zabilježena prisutnost pripadnika roda u staništima Jadranskog mora.

## 5.2. Morfološki tip 2 i rod *Salileptolyngbya*

Sojevi koji pripadaju morfotipu 2 grupirali su se sa sojevima koji su identificirani kao pripadnici roda *Salileptolyngbya* s iznimno velikom podržanošću te *bootstrap* vrijednošću 99. U kladogramu se nalazi i sekvenca identificirana kao soj cijanobakterija koji pripada redu Oscillatoriales. U prijašnjim filogenetskim analizama ova je sekvenca grupirana u skupinu Pseudanabaenales (Siegesmund i sur., 2008) te s vrstom *Pseudanabaena persicina* (Reinke ex Gomont) Anagnostidis 2001 i pripadnikom roda *Leptolyngbya* (Pietrasiak i sur., 2019).

Prema najnovijoj klasifikaciji rod *Salileptolyngbya* pripada porodici Nodosilineaceae, redu Nodosilineales (Strunecký i sur., 2023). Rod je izdvojen iz filogenetski bliskog roda *Leptolyngbya* s tipskom vrstom *Salileptolyngbya diazotrophica* W.G.Zhou i J.Ling 2018, čije su monokulture uzgojene iz uzorka morske vode uzetog na dubini 200 metara u Južnom kineskom moru i okarakterizirane polifaznim pristupom (Zhou i sur., 2018). Proučavanjem njihove filogenije, točnije gena za 16S rRNA, ITS regije te gena *nifH*, morfologije, sekundarne strukture regije 16S-23S ITS te ekologije zaključeno je da se dovoljno razlikuju od najbližih srodnika, predstavnika rodova *Leptolyngbya* i *Phormidium*, te da ih se može izdvojiti u novi rod. U Tablica S5. prikazana je usporedba morfoloških značajki roda *Salileptolyngbya* i tipske vrste te u ovom radu okarakteriziranih sojeva morfološkog tipa 2. Morfologija

se slaže u gotovo svim kategorijama: boji i obliku trihoma, neprisutnosti grananja, kaliptri, aerotopa i heterocita, obliku stanica, širini ovojnice te su obje uspoređivane skupine monoliformne. Objе skupine rastu u slanom okolišu. Međutim, među uspoređivanim skupinama ima i nekoliko razlika. Na primjer, u sojevima morfološkog tipa 2 nije primijećena slojevitost ovojnice opisana u rodu *Salileptolyngbya*, što se djelomično može objasniti kao posljedica korištenih mikroskopskih tehnika. Naime, u ovom radu oni su promatrani pod svjetlosnim mikroskopom, a u radu Zhou i suradnika (2018) pod skenirajućim elektronskim mikroskopom koji omogućava dobivanje detaljnije slike ovojnice. Glavne razlike između sojeva iz ovog rada te onih opisanih u literaturi predstavljaju duljina stanica, čiji je raspon nešto manji kod sojeva u ovom radu, te prisutnost, odnosno neprisutnost hormogonija. Duljina stanica je promjenjiva značajka koja se može značajno mijenjati ovisno o fazi životnog ciklusa (Martins i sur., 2018). U monokulturama sojeva morfotipa 2 nisu primijećeni hormogoniji zabilježeni u literaturi kao način razmnožavanja u roda *Salileptolyngbya*. Promjene u okolišnim uvjetima, na primjer izlaganje određenim dijelovima spektra svjetlosti (Damerval i sur., 1991), mogu potaknuti razvitak hormogonija u prirodnim populacijama. Laboratorijske kulture rastu u stabilnim uvjetima, što može rezultirati izostankom ili smanjenim razvijanjem hormogonija. Nishizuka i Hashidoko (2018) navode kako je stvaranje hormogonija u kulturi pripadnika roda *Nostoc* ovisilo o koncentraciji agara u krutom mediju BG-11<sup>0</sup> te je pri koncentracijama od 1 % ili više izostalo. U ovome je radu korišten isti kruti medij s dodanim dušikom, BG-11, a koncentracija agara u njemu bila je 1,5 %. Ovo je možda bio razlog zašto hormogoniji nisu uočeni, iako je isti kruti medij s istom koncentracijom korišten pri opisivanju tipske vrste roda *Salileptolyngbya* (Zhou i sur., 2018). Uzimajući sve dostupne informacije, zaključujem da se ipak sojevi morfotipa 2 mogu svrstati u rod *Salileptolyngbya*.

Iako se sojeve morfotipa 2 prema morfološkoj analizi može svrstati u *Salileptolyngbya*, filogenetska analiza upućuje da se mogu potencijalno opisati kao nova grupa, s obzirom da je odvajanje sekvenci u posebnu grupu dobro podržano s *bootstrap* vrijednosti 99. Međutim, za opisivanje novog roda potrebno je primijeniti detaljnije analize koje uključuju i ostale gene osim gena za 16S rRNA.

Predstavnici roda *Salileptolyngbya* u radu Zhou i sur. (2018) su planktonski, čime se razlikuju od epilitskih predstavnika opisanih u ovom radu. Međutim, tipskoj vrsti najbliži sojevi u NCBI bazi podataka u vrijeme njezina opisivanja (s 97 %, 96,3 % te 85,9 % sličnosti) bili su litificirajući pripadnici roda *Leptolyngbya* izolirani s atola Kiritimati ili stromatolita na Bahamima (Zhou i sur., 2018). Rod *Salileptolyngbya* u nekoliko je radova zabilježen i među bentičkim vrstama na obalama diljem svijeta. Na primjer, iz uzoraka ovog roda sakupljenih na otoku Okinawa te na plaži u gradu Kagoshima (Japan), Ebihara i sur. (2021) te Kurisawa i sur. (2021) izolirali su farmaceutski značajne kemijske spojeve. Iako u radovima nisu navedeni opis i pozicija biofilma, prema fotografijama se može zaključiti da se radilo o uzorcima sa stijena. Rod *Salileptolyngbya* zabilježen je u bentičkim obraštajima obala Floride (S.A.D.) sa sezonskim proliferacijama (Berthold i sur., 2022b). Iz navedenog se može zaključiti da *Salileptolyngbya* ima široku rasprostranjenost te obitava u obalnoj zoni.

### 5.3. Morfološki tip 3 i rod *Nunduva*

Sojevi morfološkog tipa 3 pokazuju najveću sličnost s pripadnicima roda *Nunduva*. Ovaj je rod prvi put opisan u radu González-Resendiz i suradnika (2018), a pripada porodici Rivulariaceae, redu Nostocales. u Tablica S6. prikazana je usporedba morfoloških značajki morfotipa 3 te pripadnika roda *Nunduva*. Između dviju grupa postoji morfološko podudaranje u boji i obliku trihoma, polarnosti trihoma, izgledu ovojnice, obliku stanica, razmnožavanju i obliku homogonija, prisutnosti heterocita i akineta, nemogućnosti kretanja. Ove dvije skupine nastanjuju i staništa sa sličnim okolišnim uvjetima. Međutim, primijećena je i značajna razlika između sojeva morfotipa 3 te roda *Nunduva*. Naime, González-Resendiz i suradnici (2018) su ustvrdili da se rod *Nunduva* razlikuje od ostalih rodova porodice Rivulariaceae u redovitoj pojavi dvostrukog lažnog grananja na trihomima, zbog čega je izdvojen iz roda *Rivularia*. Kod dvije vrste promatrane u okolišnim uzorcima u tome radu dvostruko lažno grananje bilo je često, a kod dvije rijetko, ali mu se frekvencija povećala u čistim laboratorijskim kulturama. Dvostruko i jednostruko lažno grananje primijećeno je i kod svih kasnije opisanih vrsta roda *Nunduva* (Johansen i sur., 2021; Berthold i sur., 2022a). Lažno grananje primijećeno je samo na jednom trihomu jednog soja morfološkog tipa 3. Iz ovog se razloga ne može sa sigurnošću tvrditi da sojevi morfotipa 3 morfološki pripadaju rodu *Nunduva*.

Prema filogenetskoj analizi, sojevi morfotipa 3 mogu se svrstati u rod *Nunduva* s *bootstrap* vrijednošću 53. Među sekvencama roda *Nunduva* preuzetih iz NCBI baze, pojavljuje se i sekvenca identificirana kao *Rivularia halophila* Shalygin i Pietrasiak 2018. Ovo nije iznenađujuće s obzirom na filogenetsku bliskost dva roda.

Tipiska vrsta *Nunduva fasciculata* González-Resendiz, León-Tejera i J.R.Johansen 2018 izolirana je sa granitnih stijena supralitoralne i mediolitoralne zone na obali Tihog oceana. Dodatne dvije vrste te jedan soj opisani u istome radu također su epilitski te su izolirani s mediolitorala Tihog oceana, Meksičkog mora te portugalske obale. Samo je jedna vrsta, *Nunduva britannica* Hauer 2018, izolirana iz brakične vode estuarija (González-Resendiz i sur., 2018). Epilitske vrste *Nunduva komarkovae* González-Resendiz, León-Tejera i J. R. Johansen 2021 te *Nunduva sanagustinensis* González-Resendiz, León-Tejera i J. R. Johansen 2021 izolirane su sa granitnih stijena supralitorala i mediolitorala istočne i zapadne obale Meksika (Johansen i sur., 2021). Vrsta *Nunduva sanctimaloensis* Berthold, Werner i Laughinghouse 2022 izolirana je s mediolitorala francuske obale. Sve dosad opisane vrste roda *Nunduva* su epilitske te nastanjuju pliće zone morskih obala diljem svijeta, a u ovom je radu prvi put zabilježena njegova prisutnost u staništima Jadranskog mora.

### 5.4. Morfološki tip 4 i rod *Leptolyngbya*

Sojevi morfološkog tipa 4 grupirali su se zajedno sa 100 %-tnom podržanošću te pokazuju najveću srodnost s različitim pripadnicima rodova *Leptolyngbya* i *Leptothoe*. U skupini *Leptolyngbya* pojavljuje se i sekvenca identificirana kao vrsta neslužbenog imena (McNeill i sur., 2012) *Adonisia turfae* (Walter i sur., 2020). Na temelju filogenetske analize gena za 16S rRNA ova je vrsta grupirana

s predstavnicima roda *Leptolyngbya*, dok je u analizama čitavog genoma grupirana s potpuno drugačijim vrstama (Walter i sur., 2020). Na temelju toga, mogu pretpostaviti da je do grupiranja vrste *A. turfae* s rodom *Leptolyngbya* na stablu u ovom radu došlo uslijed nedovoljne specifičnosti sekvence. Za sekvencu identificiranu kao *Pseudanabaena persicina*, koja se u NCBI bazi podataka pojavljuje uz pripadnike roda *Leptolyngbya*, nije opisano kako je vrsta identificirana pa je moguće da se, ako je determinacija bila isključivo morfološka, ovdje zapravo radi o predstavniku roda *Leptolyngbya*.

*Leptolyngbya* je izdvojen kao zaseban rod u radu Anagnostidisa i Komáreka (1988). Detaljno ga je opisao Komárek 1992. godine, a opis se može naći u sklopu mrežne stranice CyanoDB baze podataka (Hauer i Komárek, 2022). U Tablica S7. uspoređena je morfologija roda *Leptolyngbya* i morfološkog tipa 4. U Tablica S7. također je uvršten i morfološki opis pripadnika ovog roda pronađenih u supralitoralu Dugog otoka (Brandes i sur., 2015). Kako su cijanobakterije poznate po morfološkoj promjenjivosti u morfologiji i ekologiji, korisno je usporediti morfologiju s geografski najbližim opisanim pripadnikom. Morfologija sojeva morfološkog tipa 4 u većini se značajki poklapa s opisom Komáreka (Hauer i Komárek, 2022), odnosno u svim se značajkama poklapa s opisom predstavnika s Dugog otoka (Brandes i sur., 2015). U sojeva morfološkog tipa 4 nije primijećeno sužavanje prema polovima, ali i u roda *Leptolyngbya* to je rijetko primijećeno (Hauer i Komárek, 2022). Ovojnica se teško vizualizirala na mikroskopu korištenom u ovome radu pa je moguće da njezino otvaranje na apikalnom kraju nije primijećeno usprkos prisutnosti. Znakovita morfološka razlika je nepostojanje hormogonija u morfološkom tipu 4 u odnosu na literaturni opis (Hauer i Komárek, 2022). Razvijanje hormogonija u laboratorijskim kulturama ovisi o više čimbenika, stoga na temelju ove razlike nije moguće zaključiti da sojevi morfotipa 4 ne pripadaju rodu *Leptolyngbya*.

*Leptothoe* je rod izdvojen iz roda *Leptolyngbya* 2019. godine na temelju razlika u genetici, morfologiji, sekundarnim strukturama regije DNA 16S rRNA – ITS, ekologiji te fiziologiji. Tipska vrsta te još dvije svoje istog roda izolirane su s morske spužve (Konstantinou i sur., 2019). U Tablica S7. uspoređene su njihove morfološke značajke s morfološkim značajkama sojeva morfotipa 4. Ove dvije skupine dijele većinu morfoloških značajki te se razlikuju u boji trihoma. Boja trihoma može znatno varirati među različitim vrstama istog roda, kao i unutar populacija iste vrste. Kao i u vrsta roda *Leptothoe*, u sojeva morfotipa 4 nisu primijećene stanice s manjom duljinom nego širinom te granule i karboksisomi u stanicama. Prisutnost granula i karboksisoma u sojevima morfotipa 4 nije bilo moguće utvrditi radi korištenja svjetlosnog mikroskopa u morfološkim analizama. Također, u sojevima morfotipa 4 nisu primijećeni hormogoniji što nije začuđujuće s obzirom da prisutnost hormogonija u laboratorijskoj kulturi ovisi o brojnim čimbenicima te je moguće da postoje u prirodnim populacijama.

Sojevi morfotipa 4 mogu se prema morfologiji svrstati u oba roda, *Leptolyngbya* i *Leptothoe*. Komárek 1992. godine u opisu roda *Leptolyngbya* (Hauer i Komárek, 2022) navodi da duljina stanica ovog roda može biti nekoliko puta veća od njezine širine. Međutim, u novijem radu isti autor (Komárek i Johansen, 2015b), ispravlja ovaj navod i napominje da je veća duljina stanice od širine rijetka pojava



kod *Leptolyngbya* te da se, ukoliko soj posjeduje ovakvu morfološku značajku, vjerojatno radi o nekom drugom rodu. Prema tome, vjerojatnije je da sojevi morfotipa 4 predstavljaju rod *Leptothoe*.

Prema filogenetskoj analizi, sojevi morfotipa 4 grupirani su zajedno sa 100 %-tnom podržanošću. Njihovo odvajanje od oba roda dobro je podržano – odvajanje od *Leptolyngbya bootstrap* vrijednošću 98, a od *Leptothoe bootstrap* vrijednostima 98 i 100. Visoke *bootstrap* vrijednosti ukazuju na različitost sekvenci gena za 16S rRNA kod ove tri skupine. Moguće je da sojevi morfotipa 4 ne pripadaju niti jednom od navedena dva roda već predstavljaju zaseban rod u kojeg ova regija DNA još nije sekvencirana. Porodica Leptolyngbyaceae iznimno je bogata rodovima i vrstama, a redovito joj se pridodaju novi predstavnici, izolirani iz prirodnih populacija (Kim i sur., 2022; Rasouli-Dogaheh i sur., 2022).

Rod *Leptolyngbya* prethodno je zabilježen u povremeno potopljenim udubinama obale Sakarun na Dugom otoku (Brandes i sur., 2015) te na karapaksu i koži glavatih želvi koje nastanjuju Mediteransko more (Kanjer i sur., 2022). Rod *Leptothoe* bio je prisutan na karapaksu glavatih želvi iz Jadranskog mora (Kanjer i sur., 2024), što je u skladu s rezultatima ovog diplomskog rada.

## 5.5. Rodovi i staništa iz kojih su izolirani

Sojevi izolirani s karapaksa glavatih želvi (sojevi morfotipa 4) grupirali su se zasebno od epilitskih sojeva na filogenetskom stablu. Također, najbliži srodnici ovih sojeva razlikuju se od najbližih srodnika epilitskih sojeva. Postavlja se pitanje jesu li sojevi morfotipa 4 obligatni epizooički organizmi ili se mogu naći i u drugim staništima. Ako se pretpostavi da pripadaju rodu *Leptolyngbya*, svakako ne predstavljaju specijalističke organizme. *Leptolyngbya* je rod zabilježen kao dio epilitskih obraštaja različitih staništa u mnogim dijelovima svijeta pa tako i u supralitoralnoj zoni središnjeg Jadranskog mora, i to u povremeno potopljenim udubinama obale Sakarun na Dugom otoku u rasponu saliniteta od 20 ‰ do 240 ‰ (Brandes i sur., 2015). S druge strane, sve dosad opisane vrste roda *Leptothoe* žive na životinjskom supstratu, a njihovi predstavnici izolirani su s različitih vrsta spužvi nađenih u infralitoralnoj zoni grčkog poluotoka, na dubinama od 9,6 m i 19,5 m (Konstantinou i sur., 2019). Prema tome, ako se pretpostavi da njemu pripadaju sojevi morfotipa 4, moglo bi se zaključiti da zaista jesu obligatno epizooički organizmi. Međutim, u radu Avalona i suradnika (2024) ovaj je rod izoliran iz obraštaja uzorkovanog s koraljnog grebena u Crvenom moru te iz obraštaja uzorkovanog sa stijene na otoku São Vincente u Atlantskom oceanu, a determiniran je pomoću polifaznog pristupa, pa to pitanje ostaje otvoreno. Moguće je da ovi rodovi nastanjuju karapakse glavatih želvi oportunistički, a do kolonizacije dolazi tijekom hranjenja kornjača. Naime, adultne i subadultne jedinice kornjača hrane se bentičkim organizmima litorala (Casale i sur., 2008), pri čemu prevrću supstrat (Lazar i ostali, 2011). U radu Kanjer i suradnika (2024) navedeno je kako je moguće da zbog prevrtanja pri hranjenju dođe do kolonizacije karapaksa bentičkim cijanobakterijama.

Epilitski rodovi izolirani u ovome radu su *Sodalinema*, *Salileptolyngbya* te *Nunduva*. Rodovi *Sodalinema* i *Nunduva* recentno su opisani rodovi s tek nekoliko opisanih vrsta (Cellamare i sur., 2018; González-Resendiz i sur., 2018; Johansen i sur., 2021; Samyina i sur., 2021; Berthold i sur., 2022a). Zasad nisu zabilježeni epizooički pripadnici ovih rodova. S druge strane, prisutnost roda *Salileptolyngbya* zabilježena je na svim adultnim jedinkama i kod 80 % subadultnih jedinki glavatih želvi nađenih uz istočnu obalu Jadranskog mora (Kanjer i sur., 2024). I u ovom je slučaju vjerojatno riječ o kolonizaciji prilikom hranjenja glavatih želvi. Sojevi morfotipa 3 čine sestrinsku skupinu pripadnicima roda *Nunduva*, no zanimljivo je da su se međusobno također grupirali u dvije sestrinske skupine, ovisno o uvali s kojih su uzorkovani. Dakle, iako sojevi obje uvale pripadaju istome rodu, postoji razlika u 16S genu dviju populacija. Rod *Nunduva* jedini se pojavljuje na obje uzorkovane uvale. Razlog tomu je što je u uvali Veli Žal uzet samo jedan tip obraštaja, a svaki je od tri epilitska roda izoliran iz morfološki drugačijeg obraštaja.

## 5.6. Pitanja i preporuke za buduća istraživanja

Pitanja koja se otvaraju nakon dobivenih rezultata u ovom istraživanju mogu se podijeliti u dvije skupine: pitanja koja se odnose na istraživana staništa te pitanja koja se odnose na izolaciju i opisivanje novih sojeva cijanobakterija.

Opisivanjem 34 cijanobakterijska epilitska soja zone supralitorala i mediolitorala sjevernoistočnog Jadranskog mora te karapaksa glavatih želvi, koji pripadaju četirima različitim rodovima, nameće se pitanje bioraznolikosti tih ekoloških niša. Istočna obala Jadranskog mora gotovo je neistražena po ovome pitanju, a naročito njezin sjeverni dio (Tablica 1.). Ovaj rad predstavlja jedno od prvih istraživanja ove tematike, a opisan je samo mali dio bioraznolikosti istraživanih područja i to samo kvalitativnim pristupom. Za dobivanje cjelovite slike njihove bioraznolikosti potrebna su dugotrajnija istraživanja, s mnogo većim brojem uzoraka te načinom određivanja brojnosti taksona u prirodnim staništima (Zhu i sur., 2019).

U determinaciji sojeva izoliranih u ovome radu, iako je ona temeljena na morfologiji i filogeniji, ostalo je nekoliko neriješenih pitanja. Na primjer, sojevi morfotipa 4 morfološki i filogenetski odgovarali su dvama rodovima, *Leptolyngbya* i *Leptothoe*, a pripadnost sojeva morfotipa 3 nije morfološki mogla biti potvrđena zbog izostanka lažnog granjanja u njihovim monokulturama. Za rješavanje ovih i sličnih nedoumica, korisno je u polifaznu karakterizaciju uključiti što više različitih tipova svojstava izoliranog soja – na primjer, opis ultrastrukture stanice, ekologije ili fiziologije soja. Druga preporuka za daljnja istraživanja je korištenje više lokusa u filogenetskoj analizi. Naime, pri razdvajanju rodova molekularnim metodama preporuča se korištenje gena za 16S rRNA (Mareš, 2018), koji je korišten u tu svrhu i u ovome radu, ali mnogi radovi za dodatnu potvrdu uključuju i druge lokuse, na primjer gene *rpoC1* i *rbcL* (Martins i sur., 2019) ili gen *nifH* za rodove koji vežu dušik (Zhou i sur., 2018), kako bi dobili što detaljnije i podržanije filogenetsko stablo.

Korist ovog rada je promocija korištenja polifaznog pristupa pri karakterizaciji izoliranih sojeva, kojim se služilo samo u nekoliko istraživanja cijanobakterija na Jadranu, te tek u posljednjih desetak godina (Tablica 1.).

Relativno nedavno izdvajanje roda *Salileptolyngbya* pridodaje značaju ovog rada kao dodatnog izvora sekvenci, budući da u bazi podataka NCBI Gene Bank postoji samo 12 unosa ovog roda. Također, morfološki opisi rodova *Salileptolyngbya* i *Leptothoe* u ovome radu, uz one Zhou i suradnika (2018), odnosno Konstantinou i suradnika (2019), jedini su dostupni u znanstvenoj literaturi.

## 6. ZAKLJUČAK

U sklopu ovoga rada izolirano je 28 epilitskih sojeva cijanobakterija iz supralitoralne i mediolitoralne zone dviju obala na otoku Malom Lošinju u sjevernom Jadranskom moru. Također je izolirano 6 epizoičkih sojeva s karapaksa dviju jedinki glavatih želvi pronađenih u sjevernom Jadranu i smještenih u Centru za oporavak morskih kornjača u Aquariumu Pula. Izolirani sojevi promatrani su pod svjetlosnim mikroskopom te su zabilježene njihove morfološke značajke. Prema njima su podijeljeni u 4 morfotipa. Sekvenciran je gen za 16S rRNA, a na temelju sekvenci je izrađeno filogenetsko stablo. Sojevi svakog morfotipa grupirali su se u izdvojene filogenetske grupe. Svakom je morfotipu determiniran rod – najbliži srodnik na filogenetskom stablu – te je opisano slaže li se njegova morfologija s morfologijom pripisanog roda. U radu je pružen i detaljan opis postupka izolacije sojeva iz uzoraka te kultivacije njihovih monokultura, s istaknutim posebnostima u rukovanju svakim od 34 soja.

Zaključci rada na temelju postavljenih hipoteza su sljedeći:

1) U zonama supralitorala i mediolitorala dviju uvala Malog Lošinja zabilježena je prisutnost rodova *Sodalinema*, *Nunduva* te *Salileptolyngbya*. Prisutnost svakog od ova tri roda na istočnoj obali Jadranskog mora roda zabilježena je prvi put, iako su rodovi već poznati kao bentički organizmi istraživanih zona litorala. Stoga je potvrđena prva hipoteza da će se u radu pronaći svojte cijanobakterija još nezabilježene na području Jadranskog mora.

2) S karapaksa glavatih želvi nađenih u sjevernom Jadranskom moru izolirani su predstavnici roda *Leptothoe*. Ovaj je rod već zabilježen kao jedan od najzastupljenijih na karapaksu glavatih želvi Jadranskog mora prema broju sekvenci dobivenih iz uzoraka, te je prisutan na jedinkama svih dobnih skupina. Potvrda njegove prisutnosti u skladu je s postavljenom drugom hipotezom da će se na karapaksu glavatih želvi Mediteranskog mora pronaći sojevi zabilježeni u prethodnim istraživanjima.

3) Sojevi izolirani iz zone supralitorala i mediolitorala mora morfološki su se i taksonomski razlikovali od sojeva izoliranih s karapaksa glavatih želvi. Ovaj je zaključak u skladu s postavljenom hipotezom da će se kulture cijanobakterija iz supralitorala i mediolitorala razlikovati po morfologiji i taksonomskoj pripadnosti od onih uzgojenih iz epizoičkih obraštaja glavatih želvi.

Morfologija i filogenija poklapale su se u sojeva morfotipa 1, koji su determinirani kao predstavnici roda *Sodalinema*. Sojevi morfotipa 2 morfološki mogu pripasti rodu *Salileptolyngbya*, ali je njihovo odvajanje od njega na filogenetskom stablu dovoljno dobro podržano da je moguće da čine zasebni rod, čije sekvence još nisu dostupne. Sojevi morfotipa 3 filogenetski pripadaju rodu *Nunduva*, ali im nedostaje ključna morfološka značajka koja ovaj rod odvajaju od roda *Rivularia*. Sojevi morfotipa 4 filogenetski i morfološki mogu pripasti dvama rodovima, *Leptothoe* i *Leptolyngbya*, ali su zbog prisutnosti stanica veće duljine nego širine svrstani u rod *Leptothoe*. Kako bi se riješile ove nesuglasice, potrebno je osim morfoloških ispitati još neka svojstva izoliranih sojeva te uključiti više lokusa u filogenetsku analizu.

## 7. LITERATURA

- Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S. i Totti, C. (2016): Effects of the bloom of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* on the microphytobenthos community in the northern Adriatic Sea. **Harmful Algae** 55: 179–190.
- Adamec, F., Kaftan, D. i Nedbal, L. (2005): Stress-induced filament fragmentation of *Calothrix elenkinii* (Cyanobacteria) is facilitated by death of high-fluorescence cells. **Journal of Phycology** 41(4): 835–839.
- Adams, D. G., Ashworth, D. i Nelmes, B. (1999): Fibrillar Array in the Cell Wall of a Gliding Filamentous Cyanobacterium. **Journal of Bacteriology** 181(3): 884–892.
- Agarwal, P., Soni, R., Kaur, P., Madan, A., Mishra, R., Pandey, J., Singh, S., i Singh, G. (2022): Cyanobacteria as a Promising Alternative for Sustainable Environment: Synthesis of Biofuel and Biodegradable Plastics. **Frontiers in Microbiology** 13: 939347.
- Aguilera, A., Klemenčič, M., Sueldo, D. J., Rzymyski, P., Giannuzzi, L. i Martin, M. V. (2021): Cell Death in Cyanobacteria: Current Understanding and Recommendations for a Consensus on Its Nomenclature. **Frontiers in Microbiology** 12: 631654.
- Alcott, L. J., Mills, B. J. W., Bekker, A. i Poulton, S. W. (2022): Earth's Great Oxidation Event facilitated by the rise of sedimentary phosphorus recycling. **Nature Geoscience** 15(3): 210–215.
- Alduina, R., Gambino, D., Presentato, A., Gentile, A., Sucato, A., Savoca, D., Filippello, S., Visconti, G., Caracappa, G., Vicari, D. i Arculeo, M. (2020): Is *Caretta Caretta* a Carrier of Antibiotic Resistance in the Mediterranean Sea? **Antibiotics** 9(3): 116.
- Anagnostidis, K. i Komárek, J. (1988): Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 3 - Oscillatoriales. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie** supplementarni volumeni 50-53: 327–472.
- Antonaru, L. A., Selinger, V. M., Jung, P., Di Stefano, G., Sanderson, N. D., Barker, L., Wilson, D. J., Büdel, B., Canniffe, D. P., Billi, D. i Nürnberg, D. J. (2023): Common loss of far-red light photoacclimation in cyanobacteria from hot and cold deserts: A case study in the *Chroococciopsidales*. **ISME Communications** 3(1): 113.
- Apprill, A., Robbins, J., Eren, A. M., Pack, A. A., Reveillaud, J., Mattila, D., Moore, M., Niemeyer, M., Moore, K. M. T. i Mincer, T. J. (2014): Humpback Whale Populations Share a Core Skin Bacterial Community: Towards a Health Index for Marine Mammals? **PLoS ONE** 9(3): e90785.
- Avalon, N. E., Reis, M. A., Thornburg, C. C., Williamson, R. T., Petras, D., Aron, A. T., Neuhaus, G. F., Al-Hindy, M., Mitrevska, J., Ferreira, L., Morais, J., El Abiead, Y., Glukhov, E., Alexander, K. L., Vulpanovici, F. A., Bertin, M. J., Whitner, S., Choi, H., Spengler, G., Blinov, K., Almohammadi, A. M., Shaala, L. A., Kew, W. R., Paša - Tolić, Lj., Youssef, D. T. A., Dorrestein, P. C., Vasconcelosin, V., Gerwick, L., McPhail, K. L. i Gerwick, W. H. (2024): Leptochelins A-C, Cytotoxic Metallophores Produced by Geographically Dispersed Leptothoe Strains of Marine Cyanobacteria. **ChemRxiv**: doi:10.26434/chemrxiv-2024-nhrn8.

- Bartoš, O., Chmel, M. i Swierczková, I. (2024): The overlooked evolutionary dynamics of 16S rRNA revises its role as the “gold standard” for bacterial species identification. **Scientific Reports** 14(1): 9067.
- Bauer, F., Wolfschlaeger, I., Geist, J., Fastner, J., Schmalz, C. W. i Raeder, U. (2023): Occurrence, Distribution and Toxins of Benthic Cyanobacteria in German Lakes. **Toxics** 11(8): 643.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Seghal Kiran, G., Selvin, J., Soares Correa de Souza, R., van Overbeek, L., Singh, B. K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A. i Schloter, M. (2020): Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. **Microbiome** 8(1): 103.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P. i Falkowski, P. (2003): Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in Microbiology** 154(3): 157–164.
- Berthold, D. E., Werner, V. R., Lefler, F. W., Simon, I. P. i Laughinghouse IV, H. D. (2022a): The novel marine cyanobacterium *Nunduva sanctimaloensis* sp. Nov. (Nostocales, Cyanobacteria) from rocky shores and its reproduction through modified monocytes. **Fottea** 22(2): 192–203.
- Berthold, D.E., Lefler, F.W., Bertin, M., Zimba, P.V., Barbosa, M. i Laughinghouse IV, H.D. (2022b): Novel diversity of benthic cyanobacterial proliferations from the coasts of Florida (USA). 11th U.S. Symposium on Harmful Algae.
- Blasi, M. F., Rotini, A., Bacci, T., Targusi, M., Ferraro, G. B., Vecchioni, L., Alduina, R. i Migliore, L. (2021): On *Caretta caretta*'s shell: First spatial analysis of micro- and macro-epibionts on the Mediterranean loggerhead sea turtle carapace. **Marine Biology Research** 17(7–8): 762–774.
- Boden, J. S., Konhauser, K. O., Robbins, L. J. i Sánchez-Baracaldo, P. (2021): Timing the evolution of antioxidant enzymes in cyanobacteria. **Nature Communications** 12(1): 4742.
- Brandes, M., Albach, D. C., Vogt, J. C., Mayland-Quellhorst, E., Mendieta-Leiva, G., Golubic, S. i Palinska, K. A. (2015): Supratidal Extremophiles—Cyanobacterial Diversity in the Rock Pools of the Croatian Adria. **Microbial Ecology** 70(4): 876–888.
- Campbell, E. L., Hagen, K. D., Chen, R., Risser, D. D., Ferreira, D. P. i Meeks, J. C. (2015): Genetic Analysis Reveals the Identity of the Photoreceptor for Phototaxis in Hormogonium Filaments of *Nostoc punctiforme*. **Journal of Bacteriology** 197(4): 782–791.
- Casale, P., Abbate, G., Freggi, D., Conte, N., Oliverio, M. i Argano, R. (2008): Foraging ecology of loggerhead sea turtles *Caretta caretta* in the central Mediterranean Sea: Evidence for a relaxed life history model. **Marine Ecology Progress Series** 372: 265–276.
- Casamatta, D. A., Vis, M. L. i Sheath, R. G. (2003): Cryptic species in cyanobacterial systematics: A case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. **Aquatic Botany** 77(4): 295–309.
- Castenholz, R.W., Wilmotte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J.B., Iteman, I. i Hoffmann, L. (2001): Phylum BX. Cyanobacteria. U: D.R. Boone, R.W. Castenholz i G.M. Garrity (ur.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. New York, Springer, str. 473–599.

- Cellamare, M., Duval, C., Drelin, Y., Djediat, C., Touibi, N., Agogu , H., Leboulanger, C., Ader, M., i Bernard, C. (2018): Characterization of phototrophic microorganisms and description of new cyanobacteria isolated from the saline-alkaline crater-lake Dziani Dzaha (Mayotte, Indian Ocean). **FEMS Microbiology Ecology** 94(8): fiy108.
- Cibic, T., Franzo, A., Celussi, M., Fabbro, C. i Del Negro, P. (2012): Benthic ecosystem functioning in hydrocarbon and heavy-metal contaminated sediments of an Adriatic lagoon. **Marine Ecology Progress Series** 458: 69–87.
- Cibic, T., Baldassarre, L., Cerino, F., Comici, C., Fornasaro, D., Kralj, M. i Giani, M. (2022): Benthic and Pelagic Contributions to Primary Production: Experimental Insights From the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). **Frontiers in Marine Science** 9: 877935.
- Costa, N. B., Kolman, M. A. i Giani, A. (2016): Cyanobacteria diversity in alkaline saline lakes in the Brazilian Pantanal wetland: A polyphasic approach. **Journal of Plankton Research** 38(6): 1389-1403.
- Damerval, T., Guglielmi, G., Houmard, J. i De Marsac, N. T. (1991): Hormogonium Differentiation in the Cyanobacterium *Calothrix*: A Photoregulated Developmental Process. **The Plant Cell** 3(2): 191–201.
- De Souza, P. O., Sinhor, V., Crizel, M. G., Pires, N., Sanches Filho, P. J., Picoloto, R. S., Duarte, F. A., Pereira, C. M. P. i Mesko, M. F. (2022): Bioremediation of chromium and lead in wastewater from chemistry laboratories promotes by cyanobacteria. **Bioresource Technology Reports** 19: 101161.
- Ding, Y., Gan, N., Li, J., Sedmak, B. i Song, L. (2012): Hydrogen peroxide induces apoptotic-like cell death in *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) in a dose-dependent manner. **Phycologia** 51(5): 567–575.
- Downes, S., Firth, L. B. i Knights, A. M. (2023): Epibionts provide their basibionts with associational resistance to predation but at a cost. **Marine Environmental Research** 186: 105941.
- Drews, G. i Weckesser, J. (1982): Function, structure and composition of cell walls and external layers. **The biology of cyanobacteria** 19: 333–359.
- Dvoř k, P., Casamatta, D. A., Poul ckov , A., Hařler, P., Ondřej, V. i Sanges, R. (2014): *Synechococcus*: 3 billion years of global dominance. **Molecular Ecology** 23(22): 5538–5551.
- Ebihara, A., Iwasaki, A., Miura, Y., Jeelani, G., Nozaki, T. i Suenaga, K. (2021): Isolation and Total Synthesis of Bromoiesol sulfates, Antitrypanosomal arylethers from a *Salileptolyngbya* sp. Marine Cyanobacterium. **The Journal of Organic Chemistry** 86(17): 11763–11770.
- Fay, P. (1969): Cell differentiation and pigment composition in *Anabaena cylindrica*. **Archiv f r Mikrobiologie** 67(1): 62–70.
- Ford, A. K., Visser, P. M., Van Herk, M. J., Jongepier, E. i Bonito, V. (2021): First insights into the impacts of benthic cyanobacterial mats on fish herbivory functions on a nearshore coral reef. **Scientific Reports** 11(1): 7147.
- Foster, R. A., Tienken, D., Littmann, S., Whitehouse, M. J., Kuypers, M. M. M. i White, A. E. (2022): The rate and fate of N<sub>2</sub> and C fixation by marine diatom-diazotroph symbioses. **The ISME Journal** 16(2): 477–487.

- Franzo, A., Cibic, T., Del Negro, P. i Solidoro, C. (2014): Microphytobenthic response to mussel farm biodeposition in coastal sediments of the northern Adriatic Sea. **Marine Pollution Bulletin** 79(1–2): 379–388.
- Gaget, V., Welker, M., Rippka, R. i De Marsac, N. T. (2015): A polyphasic approach leading to the revision of the genus *Planktothrix* (Cyanobacteria) and its type species, *P. agardhii*, and proposal for integrating the emended valid botanical taxa, as well as three new species, *Planktothrix paucivesiculata* sp. Nov. ICNP, *Planktothrix tepida* sp. Nov. ICNP, and *Planktothrix sarta* sp. Nov. ICNP, as genus and species names with nomenclatural standing under the ICNP. **Systematic and Applied Microbiology** 38(3): 141–158.
- Gaget, V., Almuhtaram, H., Kibuye, F., Hobson, P., Zamyadi, A., Wert, E. i Brookes, J. D. (2022): Benthic cyanobacteria: A utility-centred field study. **Harmful Algae** 113: p.102185.
- Garduno Ruiz, D., Goldblatt, C. i Ahm, A.-S. (2023): Climate shapes the oxygenation of Earth's atmosphere across the Great Oxidation Event. **Earth and Planetary Science Letters** 607: 118071.
- Garg, R. i Maldener, I. (2021): The Formation of Spore-Like Akinetes: A Survival Strategy of Filamentous Cyanobacteria. **Microbial Physiology** 31(3): 296–305.
- Gomont, M. M. (1893): Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocystées). **Annales des sciences naturelles. Botanique** 7: 263–368.
- González-Resendiz, L., Johansen, J. R., Alba-Lois, L., Segal-Kischinevzky, C., Escobar-Sánchez, V., Jimenez Garcia, L. F., Hauer, T. i León-Tejera, H. (2018): *Nunduva*, a new marine genus of Rivulariaceae (Nostocales, Cyanobacteria) from marine rocky shores. **Fottea** 18(1): 86–105.
- Grossman, A. R., Bhaya, D., Apt, K. E. i Kehoe, D. M. (1995): Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution. **Annual Review of Genetics** 29(1): 231–288.
- Gugger, M. F. i Hoffmann, L. (2004): Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 54(2): 349–357.
- Haberle, I., Hrustić, E., Petrić, I., Pritišanac, E., Šilović, T., Magić, L., Geček, S., Budiša, A. i Blažina, M. (2020): Adriatic cyanobacteria potential for cogeneration biofuel production with oil refinery wastewater remediation. **Algal Research** 50: p.101978.
- He, H., Luo, X., Jin, H., Gu, J., Jeppesen, E., Liu, Z. i Li, K. (2017): Effects of Exposed Artificial Substrate on the Competition between *Phytoplankton* and Benthic Algae: Implications for Shallow Lake Restoration. **Water** 9(1): 24.
- Hense, I. i Beckmann, A. (2006): Towards a model of cyanobacteria life cycle - Effects of growing and resting stages on bloom formation of N<sub>2</sub>-fixing species. **Ecological Modelling** 195(3-4): 205–218.
- Herrero, A., Stavans, J. i Flores, E. (2016): The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews** 40(6): 831–854.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q. i Vinh, L. S. (2018): UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. **Molecular Biology and Evolution** 35(2): 518–522.



- Hochman, A. (1997): Programmed Cell Death in Prokaryotes. **Critical Reviews in Microbiology** 23(3): 207–214.
- Hoffmann, L., Komárek, J. i Kaštovský, J. (2005): System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004. **Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie** supplementarni volumen 117: 95–115.
- Hrouzek, P., Ventura, S., Lukešová, A., Mugnai, M., Angela Turicchia, S. i Komárek, J. (2005): Diversity of soil *Nostoc* strains: Phylogenetic and phenotypic variability. **Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie** supplementarni volumen 117: 251–264.
- Ishida, T., Watanabe, M. M., Sugiyama, J. i Yokota, A. (2001): Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology Letters** 201(1): 79–82.
- Issa, A. A., Abd-Alla, M. H. i Ohyama, T. (2014): Nitrogen Fixing Cyanobacteria: Future Prospect. U: Ohyama, T. (ur.) *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. IntechOpen, str. 23–48.
- Jani, A. J., Bushell, J., Arisdakessian, C. G., Belcaid, M., Boiano, D. M., Brown, C. i Knapp, R. A. (2021): The amphibian microbiome exhibits poor resilience following pathogen-induced disturbance. **The ISME Journal** 15(6): 1628–1640.
- Jasser, I., Panou, M., Khomutovska, N., Sandzewicz, M., Panteris, E., Niyatbekov, T., Łach, Ł., Kwiatowski, J., Kokociński, M. i Gkelis, S. (2022): Cyanobacteria in hot pursuit: Characterization of cyanobacteria strains, including novel taxa, isolated from geothermal habitats from different ecoregions of the world. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 170: 107454.
- Johansen, J. R., González-Resendiz, L., Escobar-Sánchez, V., Segal-Kischinevsky, C., Martínez-Yerena, J., Hernández-Sánchez, J., Hernández-Pérez, G. i León-Tejera, H. (2021): When will taxonomic saturation be achieved? A case study in *Nunduva* and *Kyrtuthrix* (Rivulariaceae, Cyanobacteria). **Journal of Phycology** 57(6): 1699–1720.
- Jöhnk, K. D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P. M. i Stroom, J. M. (2008): Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. **Global Change Biology** 14(3): 495–512.
- Kahru, M., Elmgren, R., Kaiser, J., Wasmund, N. i Savchuk, O. (2020): Cyanobacterial blooms in the Baltic Sea: Correlations with environmental factors. **Harmful Algae** 92: 101739.
- Kanellopoulos, C., Lamprinou, V., Politi, A., Voudouris, P. i Economou-Amilli, A. (2022): Pioneer species of Cyanobacteria in hot springs and their role to travertine formation: The case of Aedipsos hot springs, Euboea (Evia), Greece. **The Depositional Record** 8(3): 1079–1092.
- Kanjer, L., Filek, K., Mucko, M., Lupić, M. Z., Frleta-Valić, M., Gračan, R. i Bosak, S. (2024): Growing older, growing more diverse: Sea turtles and epibiotic cyanobacteria. **bioRxiv**: doi: <https://doi.org/10.1101/2024.03.08.584065>
- Kanjer, L., Filek, K., Mucko, M., Majewska, R., Gračan, R., Trotta, A., Panagopoulou, A., Corrente, M., Di Bello, A. i Bosak, S. (2022): Surface microbiota of Mediterranean loggerhead sea turtles unraveled by 16S and 18S amplicon sequencing. **Frontiers in Ecology and Evolution** 10: 907368.

- Kehoe, D. M. (2010): Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 107(20): 9029–9030.
- Kendall, B., Reinhard, C. T., Lyons, T. W., Kaufman, A. J., Poulton, S. W. i Anbar, A. D. (2010): Pervasive oxygenation along late Archaean ocean margins. **Nature Geoscience** 3(9): 647–652.
- Khayatan, B., Meeks, J. C. i Risser, D. D. (2015): Evidence that a modified type IV pilus-like system powers gliding motility and polysaccharide secretion in filamentous cyanobacteria. **Molecular Microbiology** 98(6): 1021–1036.
- Khomutovska, N., Sandzewicz, M., Łach, Ł., Suska-Malawska, M., Chmielewska, M., Mazur-Marzec, H., Cegłowska, M., Niyatbekov, T., Wood, S. A., Puddick, J., Kwiatowski, J. i Jasser, I. (2020): Limited Microcystin, Anatoxin and Cylindrospermopsin Production by Cyanobacteria from Microbial Mats in Cold Deserts. **Toxins** 12(4): 244.
- Kieninger, A.-K. i Maldener, I. (2021): Cell–cell communication through septal junctions in filamentous cyanobacteria. **Current Opinion in Microbiology** 61: 35–41.
- Kim, D.-H., Lee, N.-J., Kim, J.-H., Yang, E.-C. i Lee, O.-M. (2022): Three New Plectolyngbya Species (Leptolyngbyaceae, Cyanobacteria) Isolated from Rocks and Saltern of the Republic of Korea. **Diversity** 14(12): 1013.
- Kolda, A., Ljubešić, Z., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Pikelj, K. i Kapetanović, D. (2020): Metabarcoding Cyanobacteria in coastal waters and sediment in central and southern Adriatic Sea. **Acta botanica Croatica** 79(2): 15–169.
- Komárek, J. (2016): A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: Principles and applications. **European Journal of Phycology** 51(3): 346–353.
- Komárek, J. (2020): Quo vadis, taxonomy of cyanobacteria. **Fottea** 20(1): 104–110.
- Komárek, J. i Anagnostidis, K. (1986): Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 2 - Chroococcales. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie** supplementarni volumen 43: 157–226.
- Komárek, J. i Anagnostidis, K. (1989): Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 4 - Nostocales. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie** supplementarni volumen 56: 247–345.
- Komárek, J. i Johansen, J.R. (2015a): Coccoid Cyanobacteria. U: Wehr, J. D., Sheath, R. G. i Kociolek, J.P. (ur.) *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. San Diego, Elsevier Inc. Academic Press, str. 75–133.
- Komárek, J. i Johansen, J.R. (2015b): Filamentous Cyanobacteria. U: Wehr, J. D., Sheath, R. G. i Kociolek, J.P. (ur.) *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. San Diego, Elsevier Inc. Academic Press, str.135–226.
- Konstantinou, D., Voultziadou, E., Panteris, E., Zervou, S., Hiskia, A. i Gkelis, S. (2019): *Leptothoe*, a new genus of marine cyanobacteria (Synechococcales) and three new species associated with sponges from the Aegean Sea. **Journal of Phycology** 55(4): 882–897.
- Kurisawa, N., Otomo, K., Iwasaki, A., Jeelani, G., Nozaki, T. i Suenaga, K. (2021): Isolation and Total Synthesis of Kinenzoline, an Antitrypanosomal Linear Depsipeptide Isolated from a Marine

- Salileptolyngbya* sp. Cyanobacterium. **The Journal of Organic Chemistry** 86(18): 12528–12536.
- Kuschke, S. G. (2022): What lives on and in the sea turtle? A literature review of sea turtle bacterial microbiota. **Animal Microbiome** 4(1): 52.
- Lazar, B., Gračan, R., Katić, J., Zavodnik, D., Jaklin, A. i Tvrtković, N. (2011): Loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) as bioturbators in neritic habitats: An insight through the analysis of benthic molluscs in the diet. **Marine Ecology** 32(1): 65–74.
- Lea, P. J. (1997): Primary Nitrogen Metabolism. U Dey, P.M. i Harborne, J. B. (ur.) *Plant Biochemistry*. Elsevier, str. 273–313.
- Liao, Y. i Rust, M. J. (2018): The Min Oscillator Defines Sites of Asymmetric Cell Division in Cyanobacteria during Stress Recovery. **Cell Systems** 7(5): 471–481.
- Luchetta, A., Cantoni, C. i Catalano, G. (2010): New observations of CO<sub>2</sub>-induced acidification in the northern Adriatic Sea over the last quarter century. **Chemistry and Ecology** 26(1): 1–17.
- Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., Lopez, R. i Butcher, S. (2024): The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. **Nucleic Acids Research**: gkae241.
- Malone, T. C. i Newton, A. (2020): The Globalization of Cultural Eutrophication in the Coastal Ocean: Causes and Consequences. **Frontiers in Marine Science** 7: 670.
- Mareš, J. (2018): Multilocus and SSU rRNA gene phylogenetic analyses of available cyanobacterial genomes, and their relation to the current taxonomic system. **Hydrobiologia** 811(1): 19–34.
- Mareš, J., Strunecký, O., Bučinská, L. i Wiedermannová, J. (2019): Evolutionary Patterns of Thylakoid Architecture in Cyanobacteria. **Frontiers in Microbiology** 10: 277.
- Martins, M. D., Machado de Lima, N. M. i Branco, L. H. Z. (2019): Polyphasic approach using multilocus analyses supports the establishment of the new aerophytic cyanobacterial genus *Pycnacronema* (Coleofasciculaceae, Oscillatoriales). **Journal of Phycology** 55(1): 146–159.
- Martins, B. M. C., Tooke, A. K., Thomas, P. i Locke, J. C. W. (2018): Cell size control driven by the circadian clock and environment in cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 115(48): E11415–E11424.
- McNeill, J., Barrie, F., Buck, W., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D., Herendeen, P., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme van Reine, W., Smith, G., Wiersema, J. i Turland, N. (2012): International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code). U: International Association for Plant Taxonomy (ur.) *Regnum vegetabile* 154. Königstein, Koeltz Botanical Books, str. 1–240.
- Mejdandžić, M., Ivanković, T., Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Pfannkuchen, D. M., Hrenović, J. i Ljubešić, Z. (2015): Colonization of diatoms and bacteria on artificial substrates in the northeastern coastal Adriatic Sea. **Acta Botanica Croatica** 74(2): 407–422.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A. i Lanfear, R. (2020): IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution** 37(5): 1530–1534.

- Monteagudo, L. i Moreno, J. L. (2016): Benthic freshwater cyanobacteria as indicators of anthropogenic pressures. **Ecological Indicators** 67: 693–702.
- Montgomery, B. L. (2015): Light-dependent governance of cell shape dimensions in cyanobacteria. **Frontiers in Microbiology** 6: 514.
- Moreira, D., Tavera, R., Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Couradeau, E., Gérard, E., Fonta, C. L., Novelo, E., Zivanovic, Y. i López-García, P. (2017): Description of *Gloeomargarita lithophora* gen. Nov., sp. Nov., a thylakoid-bearing, basal-branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal for *Gloeomargaritales* ord. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 67(3): 653–658.
- Mullineaux, C. W., Mariscal, V., Nenninger, A., Khanum, H., Herrero, A., Flores, E. i Adams, D. G. (2008): Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. **The EMBO Journal** 27(9): 1299–1308.
- Murray, B., Ertekin, E., Dailey, M., Soulier, N. T., Shen, G., Bryant, D. A., Perez-Fernandez, C. i DiRuggiero, J. (2022): Adaptation of Cyanobacteria to the Endolithic Light Spectrum in Hyper-Arid Deserts. **Microorganisms** 10(6): 1198.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O. i Jannasch, H. W. (1995): Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Archives of Microbiology** 164(3): 165–172.
- Neilson, A., Rippka, R. i Kunisawa, R. (1971): Heterocyst formation and nitrogenase synthesis in *Anabaena* sp.: A kinetic study. **Archiv Für Mikrobiologie** 76(2): 139–150.
- Nishizuka, H. i Hashidoko, Y. (2018): Comparison of Nostocyan hormogonium induction and its motility on solid plates between agar and gellan gum at varying gel matrix concentrations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 82(3): 525–531.
- Noonan, A. J. C., Dofher, K., Kieft, B., Koch, M., Qiu, Y. i Hallam, S. J. (2024): *Sodalinema*. U: Whitman, W. B. (ur.) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. New Jersey, Wiley, doi: <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm02079>
- Novotny, A., Serandour, B., Kortsch, S., Gauzens, B., Jan, K. M. G. i Winder, M. (2023): DNA metabarcoding highlights cyanobacteria as the main source of primary production in a pelagic food web model. **Science Advances** 9(17): eadg1096.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. i Muyzer, G. (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 63(8): 3327–3332.
- Olejarz, J., Iwasa, Y., Knoll, A. H. i Nowak, M. A. (2021): The Great Oxygenation Event as a consequence of ecological dynamics modulated by planetary change. **Nature Communications** 12(1): 3985.
- Orcutt, K. M., Rasmussen, U., Webb, E. A., Waterbury, J. B., Gundersen, K. i Bergman, B. (2002): Characterization of *Trichodesmium* spp. by Genetic Techniques. **Applied and Environmental Microbiology** 68(5): 2236–2245.

- Oren, A., Mareš, J. i Rippka, R. (2022): Validation of the names *Cyanobacterium* and *Cyanobacterium stanieri*, and proposal of Cyanobacteriota phyl. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 72(10): 005528.
- Palinska, K. A., Abed, R. M. M., Vogt, J. C., Radtke, G. i Golubic, S. (2017): Microbial Endoliths on East Adriatic Limestone Coast: Morphological vs. Molecular Diversity. **Geomicrobiology Journal** 34(10): 903–915.
- Panrace, C., Barny, M.-A., Ueoka, R., Calteau, A., Scalvenzi, T., Pédrón, J., Barbe, V., Piel, J., Humbert, J.-F. i Gugger, M. (2017): Insights into the *Planktothrix* genus: Genomic and metabolic comparison of benthic and planktic strains. **Scientific Reports** 7(1): 41181.
- Papadopoulos, K. P., Economou, C. N., Tekerlekopoulou, A. G. i Vayenas, D. V. (2020): A Cyanobacteria-Based Biofilm System for Advanced Brewery Wastewater Treatment. **Applied Sciences** 11(1): 174.
- Perez, R., Forchhammer, K., Salerno, G. i Maldener, I. (2016): Clear differences in metabolic and morphological adaptations of akinetes of two *Nostocales* living in different habitats. **Microbiology** 162(2): 214–223.
- Perez, R., Wörmer, L., Sass, P. i Maldener, I. (2018): A highly asynchronous developmental program triggered during germination of dormant akinetes of filamentous diazotrophic cyanobacteria. **FEMS Microbiology Ecology** 94(1): fix131.
- Pietrasiak, N., Osorio-Santos, K., Shalygin, S., Martin, M. P. i Johansen, J. R. (2019): When Is A Lineage A Species? A Case Study In *Myxocorys* gen. nov. (Synechococcales: Cyanobacteria) With The Description of Two New Species From The Americas. **Journal of Phycology** 55(5): 976–996.
- Quiblier, C., Wood, S., Echenique-Subiabre, I., Heath, M., Villeneuve, A. i Humbert, J.-F. (2013): A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – Ecology, toxin production and risk management. **Water Research** 47(15): 5464–5479.
- Raabová, L., Kovacik, L., Elster, J. i Strunecký, O. (2019): Review of the genus *Phormidesmis* (Cyanobacteria) based on environmental, morphological, and molecular data with description of a new genus *Leptodesmis*. **Phytotaxa** 395(1): 1–16.
- Rasouli-Dogaheh, S., Komárek, J., Chatchawan, T. i Hauer, T. (2022): *Thainema* gen. nov. (Leptolyngbyaceae, Synechococcales): A new genus of simple trichal cyanobacteria isolated from a solar saltern environment in Thailand. **PLoS ONE** 17(1): e0261682.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. i Stanier, R. Y. (1979): Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology** 111(1): 1–61.
- Robinson, N. J., Majewska, R., Lazo-Wasem, E. A., Nel, R., Paladino, F. V., Rojas, L., Zardus, J. D. i Pinou, T. (2016): Epibiotic Diatoms Are Universally Present on All Sea Turtle Species. **PLoS ONE** 11(6): e0157011.
- Ramos, B., Muñoz-Martín, M. Á., Chamizo, S., Fernández-Valbuena, L., Mendoza, D., Perona, E., Cantón, Y. i Mateo, P. (2019): Polyphasic evaluation of key cyanobacteria in biocrusts from the most arid region in Europe. **PeerJ** 7: e6169.

- Ross, C., Santiago-Vázquez, L. i Paul, V. (2006): Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology** 78(1): 66–73.
- Ross, A. A., Rodrigues Hoffmann, A. i Neufeld, J. D. (2019): The skin microbiome of vertebrates. **Microbiome** 7(1): 79.
- Roush, D. i Garcia-Pichel, F. (2020): Succession and Colonization Dynamics of Endolithic Phototrophs within Intertidal Carbonates. **Microorganisms** 8(2): 214.
- Ruocco, N., Mutalipassi, M., Pollio, A., Costantini, S., Costantini, M. i Zupo, V. (2018): First evidence of *Halomicronema metazoic* (Cyanobacteria) free-living on *Posidonia oceanica* leaves. **PLoS ONE** 13(10): e0204954.
- Samylina, O. S., Sinetova, M. A., Kupriyanova, E. V., Starikov, A. Y., Sukhacheva, M. V., Dziuba, M. V. i Tourova, T. P. (2021): Ecology and biogeography of the ‘marine *Geitlerinema*’ cluster and a description of *Sodalinema orleanskyi* sp. Nov., *Sodalinema gerasimenkoeae* sp. Nov., *Sodalinema stali* sp. Nov. And *Baaleninema simplex* gen. Et sp. Nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria). **FEMS Microbiology Ecology** 97(8): fiab104.
- Schirrmeister, B. E., Antonelli, A. i Bagheri, H. C. (2011): The origin of multicellularity in cyanobacteria. **BMC Evolutionary Biology** 11(1): 45.
- Schulz-Vogt, H. N., Angert, E. R. i Garcia-Pichel, F. (2007): Giant Bacteria. U Wiley: (ur.) Encyclopedia of Life Sciences. Wiley, 10.1002/9780470015902.a0020371.
- Sessions, A. L., Doughty, D. M., Welander, P. V., Summons, R. E. i Newman, D. K. (2009): The Continuing Puzzle of the Great Oxidation Event. **Current Biology** 19(14): R567–R574.
- Shih, P. M., Hemp, J., Ward, L. M., Matzke, N. J. i Fischer, W. W. (2017): Crown group Oxyphotobacteria postdate the rise of oxygen. **Geobiology** 15(1): 19–29.
- Siegesmund, M. A., Johansen, J. R., Karsten, U. i Friedl, T. (2008): *Coleofasciculus* Gen. Nov. (Cyanobacteria): Morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. **Journal of Phycology** 44(6): 1572–1585.
- Slim, K., Fadel, A., Atoui, A., Lemaire, B. J., Vinçon-Leite, B. i Tassin, B. (2014): Global warming as a driving factor for cyanobacterial blooms in Lake Karaoun, Lebanon. **Desalination and Water Treatment** 52(10–12): 2094–2101.
- Stal, L. J. (2012): Cyanobacterial Mats and Stromatolites. U: Whitton, B. A. (ur.) Ecology of Cyanobacteria II. Dordrecht, Springer, str. 65–125.
- Strunecký, O., Ivanova, A. P. i Mareš, J. (2023): An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis. **Journal of Phycology** 59(1): 12–51.
- Tamulonis, C., Postma, M. i Kaandorp, J. (2011): Modeling Filamentous Cyanobacteria Reveals the Advantages of Long and Fast Trichomes for Optimizing Light Exposure. **PLoS ONE** 6(7): e22084.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R. i Willemotte, A. (2003): Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): A

- Morphological and Molecular Approach. **Applied and Environmental Microbiology** 69(9): 5157–5169.
- Temraleeva, A. D., Dronova, S. A., Moskalenko, S. V. i Didovich, S. V. (2016): Modern methods for isolation, purification, and cultivation of soil cyanobacteria. **Microbiology** 85(4): 389–399.
- Velichko, N. V., Emeljanova, M. S., Averina, S. G., Pinevich, A. A. i Pinevich, A. V. (2018): Taxonomic Attribution of “Oscillatoriales” Strains within the Bacteriological System of Cyanobacteria: Identification Algorithm for Operational Genera. **Microbiology** 87(3): 393–406.
- Vondrášková, A., Fibich, P., Lepš, J. i Kaštovský, J. (2017): Determinants of cyanobacterial species composition in the splash zone of two Croatian islands. **European journal of phycology** 52(2): 179–187..
- Walter, J. M., Coutinho, F. H., Leomil, L., Hargreaves, P. I., Campeão, M. E., Vieira, V. V., Silva, B. S., Fistarol, G. O., Salomon, P. S., Sawabe, T., Mino, S., Hosokawa, M., Miyashita, H., Maruyama, F., Van Verk, M. C., Dutilh, B. E., Thompson, C. C. i Thompson, F. L. (2020): Ecogenomics of the Marine Benthic Filamentous Cyanobacterium *Adonisia*. **Microbial Ecology** 80(2): 249–265.
- Waterbury, J. B. i Stanier, R. Y. (1978): Patterns of growth and development in pleurocapsalean cyanobacteria. **Microbiological Reviews** 42(1): 2–44.
- Wood, S. A., Kelly, L. T., Bouma-Gregson, K., Humbert, J., Laughinghouse, H. D., Lazorchak, J., McAllister, T. G., McQueen, A., Pokrzywinski, K., Puddick, J., Quiblier, C., Reitz, L. A., Ryan, K. G., Vadeboncoeur, Y., Zastepa, A. i Davis, T. W. (2020): Toxic benthic freshwater cyanobacterial proliferations: Challenges and solutions for enhancing knowledge and improving monitoring and mitigation. **Freshwater Biology** 65(10): 1824–1842.
- Yu, G., Zhu, M., Chen, Y., Pan, Q., Chai, W. i Li, R. (2015): Polyphasic characterization of four species of *Pseudanabaena* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from China and insights into polyphyletic divergence within the *Pseudanabaena* genus. **Phytotaxa** 192(1): 1–12.
- Zakar, T., Laczko-Dobos, H., Toth, T. N. i Gombos, Z. (2016): Carotenoids Assist in Cyanobacterial Photosystem II Assembly and Function. **Frontiers in Plant Science** 7: 295.
- Zhang, Y., Whalen, J. K., Cai, C., Shan, K. i Zhou, H. (2023): Harmful cyanobacteria-diatom/dinoflagellate blooms and their cyanotoxins in freshwaters: A nonnegligible chronic health and ecological hazard. **Water Research** 233: 119807.
- Zhou, W.-G., Ding, D.-W., Yang, Q.-S., Ahmad, M., Zhang, Y.-Z., Lin, X.-C., Zhang, Y.-Y., Ling, J. i Dong, J.-D. (2018): *Marileptolyngbya sina* gen. Nov., sp. Nov. and *Salileptolyngbya diazotrophicum* gen. Nov., sp. Nov. (Synechococcales, Cyanobacteria), species of cyanobacteria isolated from a marine ecosystem. **Phytotaxa** 383(1): 75.
- Zhu, B., Cao, H., Li, G., Du, W., Xu, G., Domingo, J. S., Gu, H., Xu, N., Duan, S. i Lu, J. (2019): Biodiversity and dynamics of cyanobacterial communities during blooms in temperate lake (Harsha Lake, Ohio, USA). **Harmful Algae** 82: 9–18.

## 8. ŽIVOTOPIS

Ela Pahor završila je preddiplomski sveučilišni studij Biologija na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u rujnu 2021. godine te trenutno na istom fakultetu pohađa Diplomski sveučilišni studij Ekologija i zaštita prirode, modul More.

Članica je Udruge studenata biologije – BIUS od 2019. godine, a od listopada 2020. do studenog 2023. godine u udruzi je vodila Sekciju za sisavce. Tijekom voditeljstva organizirala je brojne studentske projekte, među kojima se izdvajaju Istraživačko – edukacijski projekt „Dlakavi vodič za sisavce“ iz 2023. godine, Istraživačko - edukacijski projekt „Histria 2022.“ iz 2022. godine, Istraživačko- edukacijski projekt „Dabar i voda 2021“ iz 2021. godine te dva Istraživačko – edukacijska projekta „Mala škola mamalogije“ iz 2020. te 2021. godine.

Tijekom studiranja sudjelovala je u velikom broju terenskih istraživanja, među kojima su značajniji praćenje rasprostranjenosti pjegavog daždevnjaka u sklopu rada Javne ustanove – Maksimir od ožujka do srpnja 2023. godine te terenska istraživanja šišmiša instituta Oikon d.o.o.u srpnju i kolovozu 2023. godine, kao i nekoliko višednevnih terenskih istraživanja Udruge studenata biologije – BIUS. Također je volontirala na dva projekta Udruge Biom: „Dinara back to LIFE“ 2021. godine te „Učka 360° Camp – Bring home the butterflies!“ 2019. godine.

Ela Pahor na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja u Zagrebu 2024. godine izložila je poster pod nazivom „Determination Key For Mammal Species Using Hair Morphology“. Također je bila aktivni izlagač na stručnoj konferenciji Maksimalno na strani prirode Javne ustanove – Maksimir u Zagrebu 2023. godine, s posterom pod nazivom „Studentska stručna praksa – naše iskustvo i zašto je korisna“. Jedan je od autora postera „Utjecaj dabrovih brana na zajednicu makrozoobentosa i kakvoću vode“ izloženog na Konferenciji studenata biologije, ekologije i zaštite životne sredine u Novom Sadu 2022. godine.

Ela Pahor iskusna je u pisanju stručnih i znanstvenih izvještaja te pripremi i izvođenju istraživačkih i edukacijskih projekata. Tečno komunicira na engleskom jeziku, a njezino znanje pripada kategoriji C1 prema Zajedničkom europskom referentnom okviru za jezike. Posjeduje napredno znanje u korištenju programa paketa Microsoft Office, funkcionalno znanje u korištenju programa QGIS i Geneious Prime te osnovno znanje u korištenju programa PRIMER v7.



## 9. PRILOZI

**Tablica S1.** Izrada 1000 mL tekućih hranjivih podloga BG-11/ BG-110 te MN za uzgoj monokultura cijanobakterija morskih staništa.

**Tablica S2.** Informacije o uzorkovanim kornjačama; CCL = *curved carapace length*.

**Tablica S3.** Za svaki je soj napisana oznaka uzorka iz kojeg je izoliran, datumi provedenih radnji u postupku izolacije, datum izolacije DNA, te optimalni medij za rast soja. Za svaki je soj također navedeno je li opisan morfološki, početnice s kojima je skevenciranje bilo uspješno/ neuspješno te regije čije su sekvence dobivene – ovo je označeno oznakom + za uspjeh i oznakom – za neuspjeh. Podebljali datumi kod soja predstavljaju zasebnu liniju pokušaja izolacije čiste kulture, iz uzoraka u mediju MN, od koje se u većini slučajeva odustalo. Naime, kod svih sojeva medij BG-11/ BG-110 pokazao se boljim za rast te se izolacija nastavila iz ovih uzoraka. Sojevi s oznakom mk u stupcu morfološki opis predstavljaju miješane kulture. Sojevi s oznakom n u stupcu morfološki opis su oni s nedovoljnom biomasom za opisivanje morfologije ili ekstrakciju DNA.

**Tablica S4.** Usporedba morfoloških značajki sojeva morfotipa 1 i roda *Sodalinema*. Navedeni su radovi u kojima su opisane korištene morfološke značajke roda *Sodalinema*. Za svaku je morfološku značajku u posljednjem stupcu označeno je li ista/ slična ili različita između sojeva morfotipa 1 i roda *Sodalinema* te su postojeće razlike objašnjene.

**Tablica S5.** Usporedba morfoloških značajki sojeva morfotipa 2 i roda *Salileptolyngbya*. Naveden je rad u kojem su opisane korištene morfološke značajke roda *Salileptolyngbya*. Za svaku je morfološku značajku u posljednjem stupcu označeno je li ista/ slična ili različita između sojeva morfotipa 2 i roda *Salileptolyngbya* te su postojeće razlike objašnjene.

**Tablica S6.** Usporedba morfoloških značajki sojeva morfotipa 3 i roda *Nunduva*. Naveden je rad u kojem su opisane korištene morfološke značajke roda *Nunduva*. Za svaku je morfološku značajku u posljednjem stupcu označeno je li ista/ slična ili različita između sojeva morfotipa 3 i roda *Nunduva* te su postojeće razlike objašnjene.

**Tablica S7.** Usporedba morfoloških značajki sojeva morfotipa 4 te rodova *Leptolyngbya* i *Leptothoe*. Navedeni su radovi u kojima su opisane korištene morfološke značajke rodova *Leptolyngbya* i *Leptothoe*. Za svaku je morfološku značajku u posljednjem stupcu označeno je li ista/ slična ili različita između sojeva morfotipa 4 te rodova *Leptolyngbya* i *Leptothoe*, a postojeće su razlike objašnjene.

**Slika S1.** Slijed radnji u upostavljaju monokulture sojeva. Svakom je soju u legendi s desne strane slike pripisana boja, a linija te boje predstavlja slijed radnji pri njegovoj izolaciji.

Tablica S1. Izrada 1000 mL tekućih hranjivih podloga BG-11/ BG-11<sub>0</sub> te MN za uzgoj monokultura cijanobakterija morskih staništa.

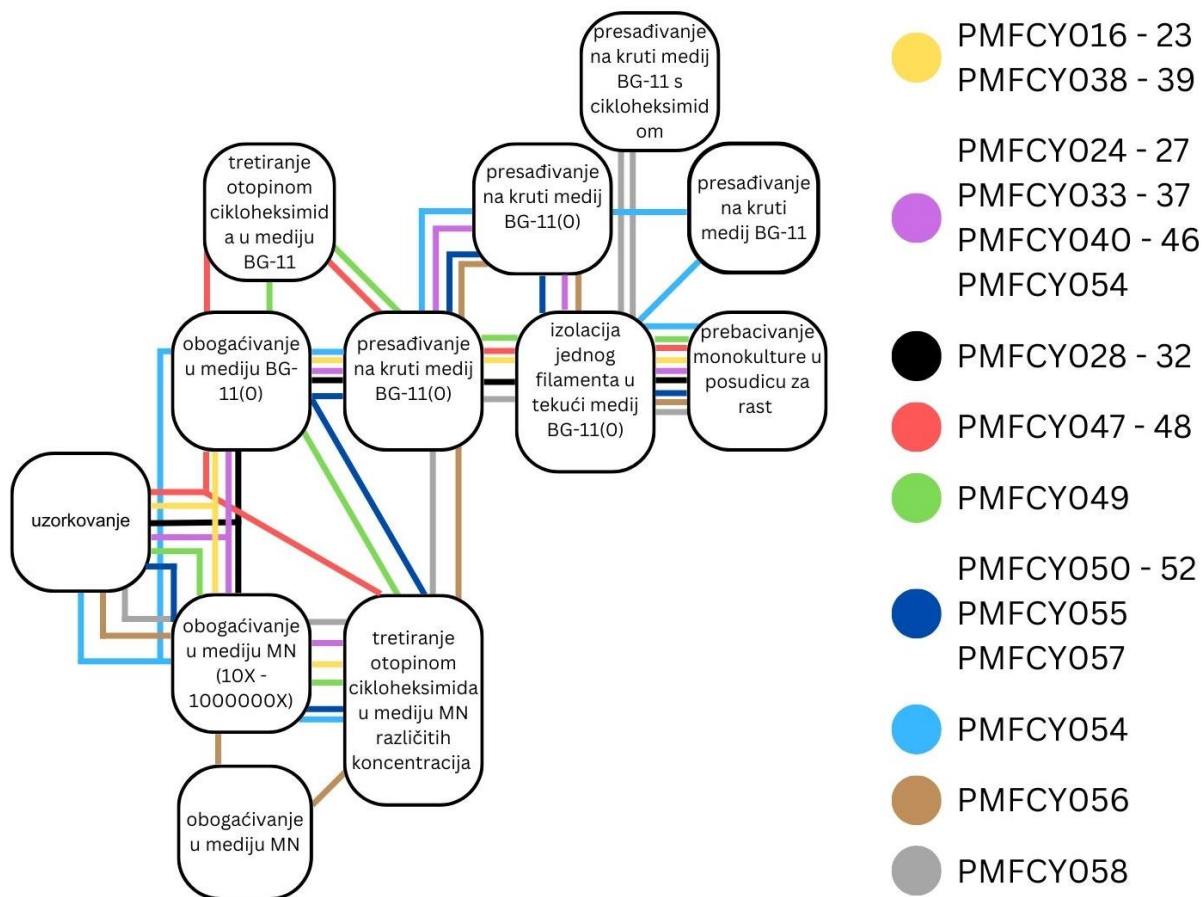
|  | BG-11/ BG-11 <sub>0</sub>                    |                                   |   | MN   |
|--|--|-----------------------------------|---|--|
| kemijski spoj  | konačna masa u hranjivoj podlozi (g)         | koncentracija radne otopine (g/L) | masa/ volumen radne otopine koja/koji se dodaje hranjivoj podlozi | masa/ volumen koja/ koji se dodaje hranjivoj podlozi |
| akvarijske soli                                      | 35   | /                                 | 35 g  | 26,25 g  |
| mikroelementi  | /  | /                                 | 1 mL  | 1 mL otopine mikroelemenata A5                       |
| NaNO <sub>3</sub> *                                  | 1,5  | 150                               | 10 mL   | 0,75 g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O  | 0,04   | 4                                 | 10 mL   | 0,02 g   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 0,075  | 7,5                               | 10 mL   | 0,04 g   |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                | 0,036  | 3,6                               | 10 mL   | 0,02 g   |
| EDTA – Na <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O           | 0,001  | 0,1                               | 10 mL   | 0,5 mg   |
| limunska kiselina monohidrat/ limunska kiselina**    | 0,006  | 0,6                               | 10 mL   | 3 mg   |
| amonijev željezo citrat                              | 0,006  | 0,6                               | 10 mL   | 3 mg   |
| NaHCO <sub>3</sub> / NaCO <sub>3</sub> **            | 0,15   | 54                                | 2,8 mL  | 0,02 g   |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> · 10H <sub>2</sub> O | 0,054  | 5,4                               | 10 mL   | /  |
| milliQ voda  | /  | /                                 | do 1000 mL  | do 1000 mL   |
| <b>otopina mikroelemenata A5</b>                     |  |                                   |   |  |
| kemijski spoj  | masa/ volumen koja/ koji se dodaje u otopinu |                                   |   |  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 2,86 g                                       |                                   |   |  |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 1,81 g                                       |                                   |   |  |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0,222 g                                      |                                   |   |  |
| NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0,39 g                                       |                                   |   |  |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                 | 0,079 g                                      |                                   |   |  |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 49,4 mg                                      |                                   |   |  |
| destilirana voda                                     | 1000 mL                                      |                                   |   |  |

\*ne dodaje se u izradi medija BG-110M

\*\*prvi kemijski spoj koristi se u izradi hranjive podloge BG-11/ BG-11<sub>0</sub>, a drugi u izradi hranjive podloge MN.

Tablica S2. Informacije o uzorkovanim kornjačama; CCL = *curved carapace length*.

| ID uzorka | ID kornjače | ime kornjače   | lokacija pronalaska               | ime oporavišta        | datum primitka kornjače u oporavište | datum uzorkovanja | mjesto uzorkovanja na tijelu | spol | dob               | CCL (cm) | masa (g) |
|-----------|-------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------------------|------|-------------------|----------|----------|
| TB 245    | ID 132      | Silvia         | Liznjan, Istarska županija        | Aquarium Pula         | 3.3.2023.                            | 3.4.2023.         | karapaks                     | N/A  | juvenilna jedinka | 27       | 2,4      |
| TB 241    | ID 130      | Anika          | Iuka Sv. Martin, Mali Lošinj      | Aquarium Pula         | 26.1.2023.                           | 3.4.2023.         | karapaks                     | N/A  | juvenilna jedinka | 60       | 25,7     |
| TB 243    | ID 131      | Tin            | Mali Lošinj                       | Aquarium Pula         | 20.2.2023.                           | 3.4.2023.         | karapaks                     | N/A  | juvenilna jedinka | 39       | 6,5      |
| TB 249    | ID 134      | Claudio        | Šišan, Svetica, Istarska županija | Aquarium Pula         | 16.3.2023.                           | 3.4.2023.         | karapaks                     | N/A  | juvenilna jedinka | 35       | 4,6      |
| TB 237    | ID 128      | Karlo Heinz    | Rovinj                            | Aquarium Pula         | 2.10.2022.                           | 3.4.2023.         | karapaks                     | N/A  | juvenilna jedinka | 38       | 6,6      |
| TB 239    | ID 129      | Otto           | Mali Lošinj                       | Aquarium Pula         | 18.1.2023.                           | 3.4.2023.         | karapaks                     | N/A  | juvenilna jedinka | 50       | 14,6     |
| TB 247    | ID 133      | Jerko          | PP Telašćica                      | Aquarium Pula         | 9.3.2023.                            | 3.4.2023.         | karapaks                     | N/A  | juvenilna jedinka | 31,5     | 3,5      |
| TB 251    | ID 135      | CC Lošinj 2305 | Iuka Sv. Martin, Mali Lošinj      | Institut Plavi svijet | 3.5.2023.                            | 3.5.2023.         | karapaks                     | N/A  | juvenilna jedinka | /        | /        |



Slika S1. Slijed radnji u upostavljanju monokulture sojeva. Svakom je soju u legendi s desne strane slike pripisana boja, a linija te boje predstavlja slijed radnji pri njegovoj izolaciji.

Tablica S3. Za svaki je soj napisana oznaka uzorka iz kojeg je izoliran, datumi provedenih radnji u postupku izolacije, datum izolacije DNA, te optimalni medij za rast soja. Za svaki je soj također navedeno je li opisan morfološki, početnice s kojima je skevenciranje bilo uspješno/ neuspješno te regije čije su sekvence dobivene – ovo je označeno oznakom + za uspjeh i oznakom – za neuspjeh. Podebljali datumi kod soja predstavljaju zasebnu liniju pokušaja izolacije čiste kulture, iz uzoraka u mediju MN, od koje se u većini slučajeva odustalo. Naime, kod svih sojeva medij BG-11/ BG-11<sub>0</sub> pokazao se boljim za rast te se izolacija nastavila iz ovih uzoraka. Sojevi s oznakom mk u stupcu morfološki opis predstavljaju miješane kulture. Sojevi s oznakom n u stupcu morfološki opis su oni s nedovoljnom biomasom za opisivanje morfologije ili ekstrakciju DNA.

| ime kulture | izvor kulture | datum obogaćivanja uzoraka u tekućem mediju |                           | datum tretiranja uzorka cikloheksimi dom | datum presađivanja uzorka u kruti medij BG-11/ BG-11 <sub>0</sub> | datum presađivanja uzorka u tekući medij BG-11/ BG-11 <sub>0</sub> | datum izolacije kulture u posudicu za rast | datum ekstrakcije DNA | medij za rast kulture | morfološki opis | 27F | 359F | 979F | 1092R | 1492R | 23S30R | dobivena regija ITS | dobiven gen za 16S |   |
|-------------|---------------|---|---------------------------|--|---|--|--|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----|------|------|-------|-------|--------|---------------------|--------------------|---|
|             |               | MN  | BG-11/ BG-11 <sub>0</sub> |  |   |  |  |                       |                       |                 |     |      |      |       |       |        |                     |                    |   |
| PMFCY016    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 10.10.2023.                                | 23.11.2023.           | BG-11                 | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  |   |
| PMFCY017    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 10.10.2023.                                | 23.11.2023.           |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY018    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 10.10.2023.                                | 23.11.2023.           |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY019    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 10.10.2023.                                | 23.11.2023.           |                       | +               | -   | +    | -    | -     | -     | -      | -                   | -                  | - |
| PMFCY020    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 10.10.2023.                                | 23.11.2023.           |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY021    | ML5           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 10.10.2023.                                | 23.11.2023.           |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY022    | ML5           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 10.10.2023.                                | 23.11.2023.           |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY023    | ML5           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 10.10.2023.                                | 23.11.2023.           |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY024    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./<br>2.10.2023.   | 11.10.2023.  | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +   | -    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY025    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./<br>2.10.2023.   | 11.10.2023.  | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY026    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./<br>2.10.2023.   | 11.10.2023.  | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY027    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./<br>2.10.2023.   | 11.10.2023.  | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY028    | ML2           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | /  | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |
| PMFCY029    | ML2           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                | /  | 23.8.2023.  | 2.10.2023.   | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +   | +    | +    | +     | +     | +      | +                   | +                  | + |

Tablica S3. nastavak

| ime kulture | izvor kulture | datum obogaćivanja uzoraka u tekućem mediju |                          | datum tretiranja uzorka cikloheksimi dom | datum presađivanja uzorka u kruti medij BG-11/BG-11 <sub>0</sub> | datum presađivanja uzorka u tekući medij BG-11/BG-11 <sub>0</sub> | datum izolacije kulture u posudicu za rast | datum ekstrakcije DNA | medij za rast kulture | morfološki opis | dobiven gen za 16S dobivena regija ITS |      |      |       |       |        |   |   |   |
|-------------|---------------|---|--------------------------|--|--|---|--|-----------------------|-----------------------|-----------------|--|------|------|-------|-------|--------|---|---|---|
|             |               | MN  | BG-11/BG-11 <sub>0</sub> |  |  |   |  |                       |                       |                 | 27F                                    | 359F | 979F | 1092R | 1492R | 23S30R | + | - | + |
| PMFCY030    | ML2           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | /  | 23.8.2023.   | 2.10.2023.  | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             | BG-11                 | +               | +                                      | +    | +    | -     | +     | +      | + | + |   |
| PMFCY031    | ML2           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | 26.7.2023.                               | /  | 23.8.2023.  | 2.10.2023.                                 | 1.12.2023.            |                       | k               | m                                      | -    | -    | -     | -     | -      | - | - | - |
| PMFCY032    | ML2           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | /  | 23.8.2023.   | 2.10.2023.  | 1.12.2023.                                 | /                     |                       | k               | m                                      | -    | -    | -     | -     | -      | - | - | - |
| PMFCY033    | ML6           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./2.10.2023.  | 3.11.2023.  | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             | BG-11 <sub>0</sub>    | +               | +                                      | +    | +    | +     | +     | +      | + | + |   |
| PMFCY034    | ML6           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./2.10.2023.  | 3.11.2023.  | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +                                      | +    | +    | +     | +     | +      | + | + |   |
| PMFCY035    | ML6           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./2.10.2023.  | 3.11.2023.  | 1.12.2023.                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +                                      | +    | +    | +     | +     | +      | + | + |   |
| PMFCY036    | ML8           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./2.10.2023.  | 3.11.2023.  | 1.12.2024.                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +                                      | +    | +    | +     | +     | -      | + | + |   |
| PMFCY037    | ML8           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023                | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./2.10.2023.  | 3.11.2023.  | 1.12.2024.                                 | /                     |                       | n               | -                                      | -    | -    | -     | -     | -      | - | - |   |
| PMFCY038    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.   | 2.10.2023.  | 10.10.2023                                 | 28.2.2024.            | BG-11                 | +               | +                                      | -    | -    | -     | -     | +      | + | + |   |
| PMFCY039    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023.   | 2.10.2023.  | 10.10.2023                                 | /                     |                       | n               | -                                      | -    | -    | -     | -     | -      | - | - |   |
| PMFCY040    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./2.10.2023.  | 11.10.2023.   | 19.12.2023                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +                                      | +    | +    | +     | +     | +      | + | + |   |
| PMFCY041    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./2.10.2023.  | 11.10.2023.   | 19.12.2023                                 | 6.2.2024.             |                       | +               | +                                      | +    | +    | +     | +     | +      | + | + |   |
| PMFCY042    | ML4           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./2.10.2023.  | 11.10.2023.   | 19.12.2023                                 | 7.2.2024.             |                       | +               | +                                      | +    | +    | +     | +     | +      | + | + |   |
| PMFCY043    | ML1           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | <b>19.7.2023.</b>                        | 23.8.2023./2.10.2023.  | 16.11.2023.   | 19.12.2023                                 | 7.2.2024.             |                       | +               | +                                      | +    | +    | +     | +     | +      | + | + |   |

Tablica S3. nastavak

| ime kulture | izvor kulture | datum obogaćivanja uzoraka u tekućem mediju |                          | datum tretiranja uzorka cikloheksimidom              | datum presađivanja uzorka u kruti medij BG-11/BG-11 <sub>0</sub> | datum presađivanja uzorka u tekući medij BG-11/BG-11 <sub>0</sub> | datum izolacije kulture u posudicu za rast | datum ekstrakcije DNA | medij za rast kulture | dobiven gen za 16S rRNA dobivena regija ITS |       |       |      |      |     |                 |   |   |   |   |   |   |
|-------------|---------------|---|--------------------------|--|--|---|--|-----------------------|-----------------------|---|-------|-------|------|------|-----|-----------------|---|---|---|---|---|---|
|             |               | MN  | BG-11/BG-11 <sub>0</sub> |  |  |   |  |                       |                       | 23S30R                                      | 1492R | 1092R | 979F | 359F | 27F | morfološki opis |   |   |   |   |   |   |
| PMFCY044    | ML1           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | <b>19.7.2023.</b>                                    | 23.8.2023./2.10.2023.  | 16.11.2023.   | 19.12.2023.                                | 7.2.2024.             | BG-11                 | +   | +     | +     | +    | +    | +   | +               | + | + | + | + | + |   |
| PMFCY045    | ML1           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | <b>19.7.2023.</b>                                    | 23.8.2023./2.10.2023.  | 16.11.2023.   | 19.12.2023.                                | 7.2.2024.             |                       | +   | +     | +     | +    | +    | +   | +               | + | + | + | + | + | + |
| PMFCY046    | ML5           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.               | <b>19.7.2023.</b>                                    | 23.8.2023./2.10.2023.  | 15.11.2023.   | 10.1.2024.                                 | 7.2.2024.             |                       | +   | +     | +     | +    | +    | +   | +               | + | + | + | + | + | + |
| PMFCY047    | TB245         | <b>13.4.2023.</b>                           | 27.9.2023.               | <b>13.4.2023.</b><br>(MN)/<br>16.10.2023.<br>(BG-11) | 27.11.2023.  | 12.12.2023.   | 10.1.2024.                                 | 7.2.2023.             |                       | +   | +     | +     | +    | +    | +   | +               | + | + | + | + | + | + |
| PMFCY048    | TB245         | <b>13.4.2023.</b>                           | 27.9.2023.               | <b>13.4.2023.</b><br>(MN)/<br>16.10.2023.<br>(BG-11) | 27.11.2023.  | 12.12.2023.   | 10.1.2024.                                 | 7.2.2024.             |                       | +   | +     | +     | +    | +    | +   | +               | + | + | + | + | + | + |
| PMFCY049    | TB251         | 8.5.2023.<br>(razrjeđenje<br>100X)          | 27.9.2023.               | 1.6.2023.<br>(MN)/<br>16.10.2023.<br>(BG-11)         | 27.11.2023.<br>(s<br>cikloheksimidom)                            | 12.12.2023.   | 10.1.2024.                                 | 7.2.2024.             |                       | +   | +     | +     | +    | +    | +   | +               | + | + | + | + | + | + |
| PMFCY050    | TB251         | 8.5.2023.<br>(razrjeđenje<br>100X)          | 27.9.2023.               | 1.6.2023.<br>(MN)                                    | 10.10.2023./<br>3.11.2023.                                       | 13.12.2023.   | 10.1.2024.                                 | 7.2.2024.             |                       | +   | +     | +     | +    | +    | +   | +               | + | + | + | + | + | + |
| PMFCY051    | TB251         | 8.5.2023.<br>(razrjeđenje<br>100X)          | 27.9.2023.               | 1.6.2023.<br>(MN)                                    | 10.10.2023./<br>3.11.2023.                                       | 13.12.2023.   | 10.1.2024.                                 | 7.2.2024.             |                       | +   | +     | +     | +    | +    | +   | +               | + | + | + | + | + | + |
| PMFCY052    | TB251         | 8.5.2023.<br>(razrjeđenje<br>10X)           | 27.9.2023.               | 1.6.2023.<br>(MN)                                    | 10.10.2023./<br>3.11.2023.                                       | 13.12.2023.   | 10.1.2024.                                 | 7.2.2024.             |                       | +   | -     | +     | +    | +    | +   | -               | - | + | + | + | + | + |

Tablica S3. nastavak

| ime kulture | izvor kulture | datum obogaćivanja uzoraka u tekućem mediju |                              | datum tretiranja uzorka cikloheksimidom | datum presađivanja uzorka u kruti medij BG-11(0)     | datum presađivanja uzorka u tekući medij BG-11(0) | datum izolacije kulture u posudicu za rast | datum ekstrakcije DNA | medij za rast kulture | morfološki opis | 27F | 359F | 979F | 1092R | 1492R | 23S30R | dobivena regija ITS |   | dobiven gen za 16S rRNA |
|-------------|---------------|---|------------------------------|---|--|---|--|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----|------|------|-------|-------|--------|---------------------|---|-------------------------|
|             |               | MN  | BG-11/<br>BG-11 <sub>0</sub> |   |  |   |  |                       |                       |                 |     |      |      |       |       |        | +                   | + |                         |
| PMFCY053    | ML8           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                   | <b>19.7.2023.</b>                       | 23.8.2023./<br>2.10.2023.                            | 13.12.2023.                                       | 10.1.2024.                                 | 13.2.2024.            | BG-11 <sub>0</sub>    | +               | +   | -    | +    | +     | +     | -      | +                   | + |                         |
| PMFCY054    | ML8           | <b>13.7.2023.</b>                           | 26.7.2023.                   | <b>19.7.2023.</b>                       | 23.8.2023./<br>2.10.2023./<br>3.11.2023.             | 13.12.2023.                                       | 10.1.2024.                                 | 13.2.2024.            | BG-11 <sub>0</sub>    | +               | +   | +    | +    | +     | +     | -      | +                   | + |                         |
| PMFCY055    | TB251         | 8.5.2023.<br>(razrjeđenje<br>10X)           | 27.9.2023.                   | 1.6.2023.<br>(MN)                       | 10.10.2023./<br>3.11.2023.                           | 12.1.2024.  | 7.2.2024.                                  | 28.2.2024.            | BG-11                 | +               | -   | /    | /    | -     | /     | -      | -                   | - |                         |
| PMFCY056    | TB237         | 6.4.2023./<br>20.6.2023.                    | /                            | 7.7.2023.<br>(MN)                       | 2.10.2023./<br>12.12.2023.                           | 12.1.2024.  | 7.2.2024.                                  | 28.2.2024.            | BG-11                 | +               | -   | /    | /    | -     | /     | -      | -                   | - |                         |
| PMFCY057    | TB251         | 8.5.2023.<br>(razrjeđenje<br>10X)           | 27.9.2023.                   | 1.6.2023.<br>(MN)                       | 10.10.2023./<br>3.11.2023.                           | 12.1.2024.  | 7.2.2024.                                  | 28.2.2024.            | BG-11                 | +               | -   | /    | /    | -     | /     | -      | -                   | - |                         |
| PMFCY058    | TB251         | 8.5.2023.<br>(razrjeđenje<br>100X)          | /                            | 1.6.2023.<br>(MN)                       | 2.10.2023./<br>12.12.2023.<br>(s<br>cikloheksimidom) | 3.11.2023./<br>12.1.2024.                         | 7.2.2024.                                  | 28.2.2024.            | BG-11                 | +               | -   | /    | /    | -     | /     | -      | -                   | - |                         |



Tablica S4. Usporedba morfoloških značajki sojeva morfotipa 1 i roda *Sodalinema*. Navedeni su radovi u kojima su opisane korištene morfološke značajke roda *Sodalinema*. Za svaku je morfološku značajku u posljednjem stupcu označeno je li ista/ slična ili različita između sojeva morfotipa 1 i roda *Sodalinema* te su postojeće razlike objašnjene.

| <b>morfološka značajka</b>    | <i>Sodalinema</i> (Samylini i sur., 2021)   | <i>Sodalinema</i> (Cellamare i sur., 2018)   | <b>morfološki tip 1</b>  | <b>suglasnost morfologije</b>  |
|-------------------------------|---|--|--|--|
| <b>makro svojstva</b>         | smaragdno zeleni obraštaj; plutajuće nakupine ili tanak obraštaj na stijenci posudice   | smaragdno zeleni obraštaj; plutajuće nakupine ili tanak obraštaj na površini stromatolita            | svjetozeleni do tamnozeleni obraštaj, tirkizna nijansa; plutajuće nakupine ili tanak obraštaj na stijenci posudice                               | da   |
| <b>oblik nakupina trihoma</b> | solitarni ili položeni paralelno  | solitarni  | solitarni oblici isprepleteni u nepravilnim mrežama ili položeni paralelno   | da   |
| <b>boja trihoma</b>           | modrozeleni, blijedo modrozeleni, žutozeleni  | modrozeleni, žutoplavi   | tamnozeleni  | da   |
| <b>oblik trihoma</b>          | gotovo ravni, cilindrični   | gotovo ravni, cilindrični, u kulturi stvaraju snopove zavijene u krug                                | ravni ili blago valoviti, cilindrični, u gustim dijelovima nakupina stvaraju lukove, polukružno se zavijaju, a primijećena su i kružna namatanja | da   |
| <b>polarnost trihoma</b>      | izopolarni, blago suženi prema polovima   | izopolarni, blago suženi prema polovima  | izopolarni, primijećeni trihomi blago suženi prema polovima  | da   |
| <b>ovojnica</b>               | bez ovojnice ili prisutna tanka i čvrsta ovojnica, bezbojna; nakupine mogu biti okružene amorfnim bezbojnim sluzavim omotačem   | tanke i čvrste, rub difuzan  | tanka i čvrsta   | da (nije primijećen amorfan omotač kod sojeva morfološkog tipa 1)    |
| <b>oblik stanica</b>          | cilindrične, izodijamerne do dulje nego široke (nakon diobe mogu biti šire od dugačke)  | dulje nego široke (nekada i dva puta)  | cilindrične, izodijamerne, ali pojavljuju se i oblici s većom duljinom/ širinom od širine/ duljine   | da   |
| <b>sadržaj stanica</b>        | 1 do 2 granule cijanoficina s jedne ili obje strane poprečnih staničnih stijenci; žute granule oko poprečnih staničnih stijenci | sa svake strane poprečnih staničnih stijenci refraktne granule, granule cijanoficina te karboksisomi | primijećene granule na polovima stanica  | nisu primijećene žute granule na polovima stanica sojeva morfotipa 1 |
| <b>širina stanica</b>         | 2,0 – 4,6 μm  | 2,4 – 3 μm   | 2,68 – 3,63 μm   | da   |
| <b>duljina stanica</b>        | (2,3)2,6 – 5,7 μm   | 3,2 – 4,9 μm   | 1,92 – 2,66 μm   | nešto manja u sojevima morfološkog tipa 1                            |
| <b>konstrukcija</b>           | nema ili blaga  | blaga  | blaga  | da   |

Tablica S4. nastavak

| <b>morfološka značajka</b>    | <i>Sodalinema</i> (Samylina i sur., 2021)                            | <i>Sodalinema</i> (Cellamare i sur., 2018)                           | <b>morfološki tip 1</b>  | <b>suglasnost morfologije</b> |
|-------------------------------|--|--|--|-------------------------------|
| <b>apikalna stanica</b>       | zaobljene na vrhu (hemisferične), često s velikim polarnim aerotopom | zaobljene na vrhu (hemisferične), često s velikim polarnim aerotopom | hemisferične, primijećeni trihomi s polarnim aerotopom u apikalnoj stanici | da                            |
| <b>raspored tiakoida</b>      | parijetalan sa središnjim snopom                                     | parijetalan  | parijetalan  | da                            |
| <b>kaliptra</b>               | ne   | /  | ne   | da                            |
| <b>razmnožavanje</b>          | hormogonijima ili fragmentacijom trihoma bez nastanka nekridija      | /  | hormogonijima  | da                            |
| <b>prisutnost aerotopa</b>    | da   | da   | da   | da                            |
| <b>prisutnost heterocista</b> | ne   | ne   | ne   | da                            |
| <b>prisutnost akineta</b>     | ne   | ne   | ne   | da                            |
| <b>grananje</b>               | ne   | ne   | ne   | da                            |
| <b>kretanje</b>               | klizanje   | klizanje   | klizanje   | da                            |
| <b>okoliš</b>                 | različiti slani vodeni okoliši                                       | vulkansko jezero (alkalino i slano)                                  | supralitoral morske obale  | da                            |

Tablica S5. Usporedba morfoloških značajki sojeva morfotipa 2 i roda *Salileptolyngbya*. Naveden je rad u kojem su opisane korištene morfološke značajke roda *Salileptolyngbya*. Za svaku je morfološku značajku u posljednjem stupcu označeno je li ista/ slična ili različita između sojeva morfotipa 2 i roda *Salileptolyngbya* te su postojeće razlike objašnjene.

| <b>morfološka značajka</b>    | <i>Salileptolyngbya diazotrophica</i><br>(Zhou i sur., 2018) | <i>Salileptolyngbya</i><br>(Zhou i sur., 2018) | <b>morfološki tip 2</b>   | <b>suglasnost morfologije</b>                                |
|-------------------------------|--|--|---|--|
| <b>boja trihoma</b>           | modrozeleno  | modrozeleno                                    | smeđozeleno, tamnozeleno  | da   |
| <b>oblik trihoma</b>          | ravni ili zavojiti   | ravni ili zavojiti                             | ravni ili zavojiti, neki se skupljaju u krug  | da   |
| <b>grananje</b>               | ne   | ne   | ne  | da   |
| <b>ovojnica</b>               | debela i čvrsta  | debela i slojevita                             | široka i čvrsta   | nije primijećena slojevitost ovojnice kod sojeva morfotipa 2 |
| <b>oblik stanica</b>          | cilindrične i izduljene                                      | /  | cilindrične i izodijamerne; pojavljuju se oblici dulji nego široki te širi nego dugački | da   |
| <b>duljina stanica</b>        | 1.53 – 2.37 µm   | /  | 1.18 – 1.65 µm  | nešto manja kod sojeva morfotipa 2                           |
| <b>širina stanica</b>         | 0.93 – 1.44 µm   | /  | 0.92 – 1.38 µm  | da   |
| <b>konstrukcija</b>           | izražena   | izražena                                       | monoliformni  | da   |
| <b>apikalna stanica</b>       | zaobljena  | zaobljena                                      | ne razlikuje se ili zaobljena   | da   |
| <b>kaliptra</b>               | nema   | /  | nema  | da   |
| <b>raspored tilakoida</b>     | parijetalan  | /  | /   | /  |
| <b>razmnožavanje</b>          | hormogonijima  | hormogonijima                                  | nisu primijećeni hormogoniji  | ne   |
| <b>prisutnost aerotopa</b>    | ne   | /  | ne  | da   |
| <b>prisutnost heterocista</b> | ne   | /  | ne  | da   |
| <b>okoliš</b>                 | /  | slani okoliš                                   | slani okoliš  | da   |

Tablica S6. Usporedba morfoloških značajki sojeva morfotipa 3 i roda *Nunduva*. Naveden je rad u kojem su opisane korištene morfološke značajke roda *Nunduva*. Za svaku je morfološku značajku u posljednjem stupcu označeno je li ista/ slična ili različita između sojeva morfotipa 3 i roda *Nunduva* te su postojeće razlike objašnjene.

| <b>morfološka značajka</b>    | <i>Nunduva</i> (González-Resendiz i sur., 2018)  | <b>morfološki tip 3</b>   | <b>suglasnost morfologije</b> |
|-------------------------------|--|---|-------------------------------|
| <b>makro svojstva</b>         | snopovi filamenata izdignuti s podloge   | trodimenzionalne nakupine u obliku čuperaka   | da                            |
| <b>boja trihoma</b>           | tamnozeleni do smečkasto zeleni  | tamnozeleni   | da                            |
| <b>oblik trihoma</b>          | suženi prema jednom polu, na njemu se može razviti hijalini nastavak                       | trihomi se postepeno sužavaju od bazalnog prema terminalnom polu, na terminalni pol nastavlja se hijalina struktura s poprečnim pregradama                      | da                            |
| <b>polarnost trihoma</b>      | nakon fragmentacije izopolarni, a kasnije se razvijaju u heteropolarne                     | hormogoniji izopolarni, trihomi heteropolarni   | da                            |
| <b>ovojnica</b>               | lamelasta, tanka ili široka, bezbojna do smečkastožuta, zaobljena ili otvorena na polovima | čvrsta i široka, zaobljena ili otvorena na polovima, bezbojna   | da                            |
| <b>oblik stanica</b>          | šire nego dugačke do gotovo izodijamerne   | diskoidne, višestruko šire nego dugačke, a smanjuju se prema zašiljenom polu – na njemu poprimaju cilindrični oblik i postaju izodijamerne do dulje nego široke | da                            |
| <b>konstrukcija</b>           | može se nazirati ili ne mora   | izražena  | da                            |
| <b>razmnožavanje</b>          | hormogonijima  | homogonijima  | da                            |
| <b>prisutnost heterocista</b> | bazalne ili interkalarne, solitarne ili serijski grupirane (do 3)                          | bazalne ili interkalarne, solitarne   | da                            |
| <b>prisutnost akineta</b>     | ne   | ne  | da                            |
| <b>grananje</b>               | lažno  | primijećeno lažno grananje samo kod jednog soja   | djelomično                    |
| <b>kretanje</b>               | nije zabilježeno   | nije zabilježeno  | da                            |
| <b>okoliš</b>                 | na stijenama u morskom okolišu   | na stijenama u supralitoralnoj zoni morske obale  | da                            |

Tablica S7. Usporedba morfoloških značajki sojeva morfotipa 4 te rodova *Leptolyngbya* i *Leptothoe*. Navedeni su radovi u kojima su opisane korištene morfološke značajke rodova *Leptolyngbya* i *Leptothoe*. Za svaku je morfološku značajku u posljednjem stupcu označeno je li ista/ slična ili različita između sojeva morfotipa 4 te rodova *Leptolyngbya* i *Leptothoe*, a postojeće su razlike objašnjene.

| <b>morfološka značajka</b>    | <b><i>Leptolyngbya</i> (Hauer i Komárek, 2022)</b>  | <b><i>Leptolyngbya</i> sp. (Brandes i sur., 2015)</b> | <b><i>Leptothoe</i> (Konstantinou i sur., 2019)</b>   | <b>morfološki tip 4</b>   | <b>suglasnost morfologije</b>   |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|
| <b>makro svojstva</b>         | /   | /   | ružičasto – crveni do crvenosmeđi obraštaj, vezan za podlogu  | smečkasto - tamnozelen  | da  |
| <b>oblik nakupina trihoma</b> | solitarni, isprepleteni u nakupine  | /   | isprepleteni u guste nepravilne nakupine  | nepravilne guste mreže  | da  |
| <b>boja trihoma</b>           | blijeda modroplava, sivkasta, maslinasto zelena, žuta ili crvenkasta  | bezbojni do blijedo zeleni                            | crvenkasti do smeđi   | smečkasto – zelene boje   | djelomično (boja trihoma sojeva morfotipa 4 razlikuje se od boje trihoma roda <i>Leptothoe</i> )  |
| <b>oblik trihoma</b>          | dugački i tanki, stvaraju lukove, valoviti ili jako spiralni, cilindrični, rijetko blago suženi prema polovima                    | /   | tanki, od ravnih do valovitih oblika; u vrsti <i>Leptothoe kymatousa</i> Konstantinou i Gkelis 2019 primijećeni nepravilno spiralni i spiralni oblici | dugački i tanki, ravni, mjestimično prave lukove, rijetko blago spiralni oblici | da (u sojevima morfotipa 4 nije primijećeno blago sužavanje prema polovima kao kod roda <i>Leptolyngbya</i> )                             |
| <b>polarnost trihoma</b>      | izopolarni  | /   | izopolarni  | izopolarni  | da  |
| <b>ovojnica</b>               | čvrsta i tanka, bezbojna, otvorena na apikalnom kraju, pripijena uz trihom ili malo udaljena, rijetko u istu položena dva trihoma | tanka   | tanka i čvrsta, bezbojna  | tanka i čvrsta, pripijena uz trihom   | djelomično poklapanje s rodnom <i>Leptolyngbya</i> (nije primijećena otvorenost na apikalnom kraju); poklapanje s rodnom <i>Leptothoe</i> |
| <b>oblik stanica</b>          | izodijamerne ili dulje nego široke (do nekoliko puta), cilindrične  | izodijamerne do produljene                            | od dulje nego široke do šire nego dugačke, ovisno o vrsti   | izodijamerne ili dulje nego široke (do nekoliko puta), cilindrične              | da (nisu primijećene stanice kraće nego široke kao u rodu <i>Leptothoe</i> )  |
| <b>sadržaj stanica</b>        | homogen   | /   | parijetalni tilakoidi; karboksosomi i polifosfatne granule  | homogen   | djelomično (nisu primijećene granule i karboksosomi u sojevima morfotipa 4 kao kod roda <i>Leptothoe</i> )                                |

Tablica S7. nastavak

| <b>morfološka značajka</b>    | <b><i>Leptolyngbya</i> (Hauer i Komárek, 2022)</b>  | <b><i>Leptolyngbya</i> sp. (Brandes i sur., 2015)</b>     | <b><i>Leptothoe</i> (Konstantinou i sur., 2019)</b>                 | <b>morfološki tip 4</b>   | <b>suglasnost morfologije</b>                                     |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|
| <b>širina trihoma</b>         | 0,5 – 3,2 µm  | 1 – 2,1 µm  | 0,8 – 2,9 µm  | 1,30 – 1,56 µm  | pripada u raspon  |
| <b>konstrukcija</b>           | ima ili nema  | /   | blaga do izražena   | monoliformni  | da  |
| <b>apikalna stanica</b>       | zaobljene ili konične   | /   | zaobljene   | ne razlikuju se po obliku i veličini od ostalih u trihomu, ali vrh im je zaobljen | da  |
| <b>kaliptra</b>               | nema  | /   | nema  | nema  | da  |
| <b>razmnožavanje</b>          | simetričnom binarnom diobom, hormogonijima  | /   | hormogonijima   | nisu primijećeni hormogoniji  | nisu primijećeni hormogoniji u sojevima morfotipa 4               |
| <b>prisutnost aerotopa</b>    | ne  | /   | /   | ne  | da  |
| <b>prisutnost heterocista</b> | ne  | /   | ne  | ne  | da  |
| <b>prisutnost akineta</b>     | ne  | /   | /   | ne  | da  |
| <b>lažno grananje</b>         | veoma rijetko   | /   | ne  | ne  | da  |
| <b>kretanje</b>               | imotilni  | /   | nije zabilježeno kretanje   | imotilni  | da  |
| <b>okoliš</b>                 | epilitski morski sojevi; epizoički oblici na spužvama i koraljnim grebenima (Konstantinou i sur., 2019) | povremeno potopljeni supralitoralni bazeni na Dugom otoku | morska bentička staništa – epilitski, epizooički i epifitski sojevi | karapaks glavatih želvi   | oba roda imaju epizooičke pripadnike, iako ne na glavatim želvama |

